

**“Búsqueda de biomarcadores sistémicos para la
enfermedad pulmonar obstructiva crónica”**

TESIS

Que para obtener el grado académico de

MAESTRO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

en la especialidad de

BIOTECNOLOGIA PRODUCTIVA

PRESENTA:

BIOL. MA. GUADALUPE GONZÁLEZ PALOMAR

GUADALAJARA, JAL. JULIO 2012.

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ASISTENCIA EN TECNOLOGÍA Y
DISEÑO DEL ESTADO DE JALISCO, A. C.**

Guadalajara, Jalisco, México.

Dirigida por:

Dr. Moisés Martínez Velázquez
(CIATEJ)

Y

Asesorada por:

Dr. Rodolfo Hernández Gutiérrez
(CIATEJ)

Dr. Ernesto Prado Montes de Oca
(CIATEJ)



Guadalajara, Jalisco, a 16 de Julio del 2012

CONSEJO GENERAL DE POSGRADO

PICYT-CIDESI

Querétaro

Los abajo firmantes, miembros del Comité Tutorial de la estudiante **Ma. Guadalupe González Palomar**, una vez leída y revisada la Tesis titulada **“BÚSQUEDA DE BIOMARCADORES SISTÉMICOS PARA LA ENFERMEDAD PULMONAR OBSTRUCTIVA CRÓNICA”**, aceptamos que la referida tesis revisada y corregida sea presentada por la alumna para aspirar al grado de Maestro en Ciencia y Tecnología en la opción terminal de Biotecnología productiva durante el examen de grado correspondiente.

Y para que así conste firmamos la presente a los dieciséis días del mes de julio de 2012.

Dr. Moisés Martínez Velázquez

Tutor Académico

Dr. Rodolfo Hernández Gutiérrez

Tutor en Planta

Dr. Ernesto Prado Montes de Oca

Asesor



Guadalajara, Jalisco, a 19 de Julio de 2012

CONSEJO GENERAL DE POSGRADO

PICYT-CIDESI

Querétaro

Los abajo firmantes, miembros del Jurado de Examen de la estudiante Ma. Guadalupe González Palomar, una vez leída y revisada la tesis titulada **"BUSQUEDA DE BIOMARCADORES SISTEMICOS PARA LA ENFERMEDAD PULMONAR OBSTRUCTIVA CRONICA"**, aceptamos que la referida tesis revisada y corregida sea presentada por el alumno para aspirar al grado de Maestro en Ciencia y Tecnología en la opción terminal de Biotecnología Productiva durante el examen correspondiente.

Y para que así conste firmamos la presente a los diecinueve días del mes de julio del año 2012.

Dra. Ana María Puebla Pérez

Presidente

Dra. Sara Elisa Herrera Rodríguez

Secretaria

Dra. Viviana Matilde Mesa Cornejo

Vocal

Dra. Ikuri Álvarez Maya

Vocal

Dr. Moisés Martínez Velázquez

Vocal

AGRADECIMIENTOS

Al Fondo Sectorial de Investigación en Salud y Seguridad Social SSA/IMSS/ISSTE-CONACYT, por el apoyo otorgado al proyecto 2008-1-87628: "Análisis de la expresión de biomarcadores seleccionados específicos de cáncer de pulmón, y desarrollo de una prueba de ELISA prototipo para el diagnóstico de la enfermedad".

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico otorgado, No. de becario: 240171.

Al Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco por darme la oportunidad de realizar mis estudios de maestría en esta institución, lo cual contribuye en mi formación profesional.

A las instituciones de salud pública: Hospital General Regional clínica 46 (HGR clínica 46), Hospital Civil de Guadalajara "Fray Antonio Alcalde" (HCG "Fray Antonio Alcalde"), en Guadalajara Jal, por permitir el reclutamiento de los pacientes con EPOC y personas fumadoras así como la toma de muestras biológicas en ambos grupos.

A los Neumólogos Francisco Sánchez Llamas del Hospital Civil "Fray Antonio Alcalde", Marco Antonio Padilla Solís de la clínica 46. Por su apoyo con el reclutamiento de pacientes con EPOC.

Al director del proyecto, Dr. Moisés Martínez Velázquez por aceptarme en su proyecto como estudiante, y por todos sus consejos para mi formación, quien es digno ejemplo de constancia y dedicación al trabajo en la investigación.

A mis sinodales, por el aporte de su experiencia e interés en la revisión del documento de Tesis para el enriquecimiento de la misma.

A mi compañera y quien considero una amiga Gisela Leal Pacheco, gracias por todo tu apoyo siempre y por darme la oportunidad aprender contigo.

A mi compañero José Miguel Flores Fernández, por el apoyo recibido durante la maestría.

A Pati, a usted señora Ale, a chuyita, por ser apoyo y compañía en esta etapa de mi vida.

DEDICATORIA

A la memoria de mi madre, de quien aprendí el amor

Por el trabajo y los valores de la vida.

A mi esposo Francisco Javier, por toda su paciencia,

Amor y comprensión.

A mis hijas Heidi y Yazmín, motores que impulsan mi

Vida y todos mis proyectos, por su infinito amor recibido.

A mi padre, y mis hermanos, que llevo en el corazón.

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN.....	1
2.	ANTECEDENTES.....	4
2.1	Definición de la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC).....	4
2.2	Epidemiología.....	4
2.2.1	Prevalencia.....	5
2.2.2	Morbilidad.....	7
2.2.3	Mortalidad.....	8
2.3	Factores de riesgo.....	9
2.3.1	Contaminación o factores ambientales.....	9
2.3.2	Enfermedades.....	10
2.3.3	Factores genéticos.....	11
2.3.4	Otros.....	13
2.4	Patogenia de la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC).....	14
2.5	Historia Natural.....	17
2.6	Progresión de la EPOC, hábito tabáquico y función pulmonar.....	19
2.7	Clasificación de la EPOC.....	22
2.7.1	Clasificación espirométrica.....	23
2.8	Sintomatologías.....	24
2.8.1	Síntomas de acuerdo a la gravedad de la enfermedad.....	25
2.9	Proceso para el diagnóstico.....	26
2.9.1	Métodos de diagnóstico.....	27

2.9.2	Tratamiento.....	32
2.9.3	Biomarcadores en la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC).....	35
3.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	41
4.	JUSTIFICACIÓN.....	42
5.	HIPÓTESIS.....	43
6.	OBJETIVOS.....	44
6.1	Objetivo General.....	44
6.2	Objetivos Específicos.....	44
7.	METODOLOGÍA.....	45
7.1	Diseño del estudio.....	46
7.2	Diseño de los grupos de estudio.....	46
7.3	Intervenciones.....	47
7.4	Consideraciones éticas.....	48
7.5	Definiciones.....	48
7.6	Obtención de la muestra.....	48
7.7	Cuantificación de las proteínas biomarcadoras en suero.....	48
7.7.1	Principio general de la técnica de ELISA.....	49
7.8	Cálculo de la concentración.....	52
7.9	Análisis estadístico.....	53
8.	RESULTADOS.....	55
8.1	Datos de la población en estudio.....	55
8.2	Cuantificación de proteínas en suero	61

9.	DISCUSIÓN.....	70
10.	CONCLUSIONES.....	80
11.	PERSPECTIVAS.....	81
	REFERENCIAS.....	82
	ANEXOS.....	94

ÍNDICIDE DE FIGURAS

Figura 1.	Prevalencia de la EPOC en Latinoamérica.....	6
Figura 2.	Posibles resultados de los hijos, cuando ambos padres tienen un alelo normal (M) y uno alterado (Z o S)	12
Figura 3.	Patogenia de la EPOC.....	14
Figura 4.	Interrelaciones entre la inflamación y la EPOC.....	15
Figura 5.	Historia Natural de la EPOC.....	18
Figura 6.	Diagrama de Fletcher y Peto.....	20
Figura 7.	Distribución de la exposición diferencial a tóxicos en pacientes con EPOC.....	57
Figura 8.	Distribución de pacientes, según el grado de VEF1.....	58
Figura 9.	Distribución de pacientes con EPOC, según la presencia de comorbilidad.....	59
Figura 10.	Distribución de la concentración de las proteínas APO-AI, TGFβ1, NSE, CEA y YKL-40	63
Figura 11.	Distribución de la proteína C reactiva (CRP) considerando la variable comorbilidad.....	64
Figura 12.	Distribución de la proteína de Unión a Retinol (RBP) y de la proteína Transferrina (TF) en pacientes con EPOC, con presencia de Nódulo Pulmonar Solitario (NPS) y en pacientes con EPOC, con ausencia de Nódulo Pulmonar Solitario.....	66

ÍNDICE DE TABLAS Y CUADROS

Tabla 1.	Clasificación de la gravedad de la EPOC.....	23
Tabla 2.	Datos clínicos y demográficos de pacientes con EPOC y fumadores.....	56
Tabla 3.	Datos clínicos de pacientes con EPOC.....	60
Tabla 4.	Concentración de proteínas inflamatorias, de remodelación de tejido y asociadas a tumor en pacientes con EPOC y fumadores.....	62
Tabla 5.	Diferencias significativas en la concentración de proteínas; considerando la variable, comorbilidad presencia/ausencia en pacientes con EPOC.....	63
Tabla 6.	Diferencias significativas en la concentración de proteínas; en pacientes con EPOC considerando la variable, presencia/ausencia de Nódulo Pulmonar solitario (NPS).....	65
Tabla 7.	Diferencias significativas respecto a la concentración de proteínas inflamatorias, de remodelación de tejido y asociadas a tumor, en pacientes con EPOC, considerando las variables: Índice Tabáquico, grado de obstrucción, tratamiento, sexo y edad, en pacientes con EPOC.....	67
Cuadro 1.	Implicaciones de los alelos con respecto al desarrollo de síntomas.....	13
Cuadro 2.	Estándares para el diagnóstico y manejo de los individuos con déficit de alfa-antitripsina.....	32

ABREVIATURAS

APO A1	Apolipoproteína A1
AT	Alfa 1- Antitripsina
ATS	American Thoracic Society
BNP	Péptido Natriurético Cerebral
CA-125	Antígeno de Cáncer-125
CEA	Antígeno Carcinoembrionario
CRP	Proteína C reactiva
Cyfra 21-1	Fragmento de Citoqueratina 19
DLCO	La capacidad de difusión de monóxido de carbono
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EPOC	Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica
ERS	European Respiratory Society
FEV₁	Volumen espiratorio forzado al primer segundo
FVC	Capacidad vital forzada
GOLD	The Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease
HP	Hipertensión Pulmonar
HPT	Haptoglobina
ICAM-1	Molécula de adhesión soluble intracelular
IL13	Interleucina 13
IL6	Interleucina 6
IL8	Interleucina 8
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
INEGI	Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática
ISSSTE	Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado
MMP-1	Metaloproteinasa de Matriz-1
MMP-9	Metaloproteinasa de Matriz-9

MPIF-1	Factor inhibitorio progenitor mieloides
NIH	Institutos Nacionales de Salud
NPS	Nódulo Pulmonar solitario
NSE	Enolasa Específica de Neuronas
Paq/año	Paquetes/ año
PARC	La citocina pulmonar regulada y activada
pEc	pacientes con EPOC con presencia de comorbilidad
PLATINO	Proyecto Latinoamericano de Investigación en Obstrucción Pulmonar
PREPOCOL	Prevalencia de la EPOC en Colombia
RBP	Proteína de Unión a Retinol
TAC	Tomografía Axial Computarizada
TF	Transferrina
TNF α	Factor de Necrosis Tumoral α
uPA	Activador de Plasminógeno tipo urocinasa
VEMS	Volumen de aire espirado durante el primer segundo

RESUMEN

La Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC), se caracteriza por una limitación progresiva al flujo aéreo, asociada a una respuesta inflamatoria anormal de los pulmones a gases o partículas tóxicas inhaladas, siendo el tabaquismo el principal factor etiológico. Se encuentra entre las 10 principales causas de morbi-mortalidad en el mundo. Actualmente existe un interés por desarrollar mejores estrategias de diagnóstico, pronóstico, manejo y prevención de la enfermedad. Una opción es la búsqueda y validación de biomarcadores, para una evaluación más completa y clínicamente más relevante de la EPOC. En este estudio se midieron los niveles en suero de 15 proteínas implicadas en inflamación, remodelación tisular y asociadas a tumor, por el método de ELISA, en un total de 58 pacientes con EPOC y 28 fumadores, con el objetivo de identificar biomarcadores candidatos sistémicos de la EPOC. Las diferencias entre los grupos fueron evaluadas con la prueba de Mann-Whitney y Kruskal- Wallis. Un valor de $p < 0.05$ fue considerado significativo. Las proteínas APO-A1, TGF β 1, YKL-40, CEA, NSE, CRP y RBP, presentaron una concentración significativamente más elevada en el suero de pacientes con EPOC, en comparación con los fumadores control. Aunque solamente la proteína CRP se ha utilizado en la práctica clínica asociándose a un estado inflamatorio en pacientes con afecciones pulmonares como EPOC y asma, recientemente se han visto implicadas en la EPOC proteínas como YKL-40 y APO-A1, como componentes del sistema de defensa innato y asociadas a remodelación de tejido. Por lo tanto, su evaluación pudiera mejorar la valoración de la EPOC.

ABSTRACT

Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) is characterized by progressive airflow limitation associated with an abnormal inflammatory response of lungs to inhaled toxic gases or particles, smoking being the main etiologic factor. COPD is among the 10 leading causes of morbidity and mortality worldwide. Currently, there is an interest in developing better strategies for diagnosis, prognosis, management and prevention of the disease. One option is the searching and validation of biomarkers, for a more complete and clinically relevant assessment of COPD. In this study we measured serum levels of 15 proteins involved in inflammation, tissue remodeling and tumor-associated, by the ELISA method, in 58 COPD patients and 28 smokers, with the aim of identifying candidate systemic biomarkers of COPD. Differences between groups were evaluated using the Mann-Whitney and Kruskal-Wallis tests. p -value <0.05 was considered significant. Proteins APO-A1, TGF β 1, YKL-40, CEA, NSE, CRP and RBP, showed a significantly higher concentration in the serum of COPD patients, when compared to smokers. CRP has been used in clinical practice to assess inflammation in patients with lung conditions like COPD and asthma, however, proteins such as YKL-40 and APO-A1 have been recently implicated in COPD, as innate defense system components and associated with tissue remodeling. Therefore, their evaluation could improve the assessment of COPD.

1. INTRODUCCIÓN

La Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC) muestra dimensiones y tendencia propias de un problema de salud pública, escalando de manera progresiva las listas de mortalidad general. Muchos individuos padecen esta enfermedad durante muchos años y mueren prematuramente a causa de ella o de sus complicaciones. Actualmente se encuentra entre las 10 principales causas de morbilidad y mortalidad, con más de 600 millones de personas afectadas y cerca de 3 millones de muertes por esta enfermedad al año (Murray y cols. 1996; Sin y cols. 2009). La tendencia actual la coloca como la cuarta causa de mortalidad y se espera que alcance el tercer lugar como causa de muerte en el mundo, para el 2020 (Murray y col. 1996). El número de casos de EPOC en América Latina es también elevado, con un estimado de 95,000 muertes, en el año 2000. En México, como en los demás países de Latinoamérica, la EPOC es una enfermedad sobresaliente por su morbi-mortalidad, con una prevalencia calculada de 7.8% en personas mayores de 40 años de edad (Meneses y cols. 2009). Sin embargo, a pesar de todos estos datos, la EPOC permanece subdiagnosticada en nuestro país, no sólo en los estadios tempranos de la enfermedad sino también en los tardíos (Montes de Oca y cols. 2011). Este fenómeno es explicable si se toma en cuenta que el uso del espirometro, el instrumento con el que se diagnóstica la EPOC, es poco utilizado, y además el estudio PLATINO ha comprobado que el utilizar exclusivamente el índice espirométrico, puede conducir tanto a un porcentaje elevado de falsos positivos en personas mayores de 50 años, como a un porcentaje elevado de falsos negativos en adultos jóvenes (Hnizdo y cols. 2000).

Debido a lo anterior, se ha planteado la necesidad de desarrollar nuevas estrategias para el diagnóstico, pronóstico, manejo y prevención de la EPOC. En este contexto, se ha iniciado la búsqueda y validación de biomarcadores, con el objetivo de encontrar una señal característica de la enfermedad, que pueda ser utilizada para el diagnóstico, seguimiento de la enfermedad, predicción del futuro de los resultados clínicos y la evaluación del efecto de las intervenciones terapéuticas. Sin embargo, el descubrimiento de biomarcadores en la EPOC se ha encontrado con algunos obstáculos. Uno de ellos ha sido la dificultad para acceder a muestras de tejido pulmonar adecuado para la identificación de biomarcadores, debido a la necesidad de utilizar procedimientos invasivos como la broncoscopia, además de la poca sensibilidad de las pruebas (por ejemplo, aliento exhalado condensado, gases volátiles exhalados, aire espirado condensado, etc.), cuyos parámetros están a menudo por debajo del nivel de detección, así como las dificultades de la normalización de las mediciones de fuentes menos invasoras (por ejemplo esputo inducido) (Cazzola y cols. 2008). Estudios recientes han demostrado que la EPOC es una enfermedad sistémica, y esto ha originado un cambio en la orientación hacia el descubrimiento de biomarcadores que puedan ser detectados en muestras de sangre (Sin y cols. 2009). Se sabe que en los sujetos con EPOC, la respuesta inflamatoria no se limita a los pulmones, sino que ocurre una inflamación de tipo sistémica, con circulación de mediadores de inflamación, de mediadores de estrés oxidativo sistémico, de neutrófilos y linfocitos activados, así como un aumento en los niveles plasmáticos de proteínas de fase aguda inflamatoria (Gan y cols. 2004). La inflamación sistémica ha sido implicada en la patogénesis de la mayoría de las manifestaciones extrapulmonares de la EPOC, como la pérdida de peso, disfunción de los músculos esqueléticos, enfermedades cardiovasculares, depresión, osteoporosis, reducción de la tolerancia al ejercicio, etc. (Eid y cols 2001).

Los biomarcadores en suero o plasma serían muy útiles debido a que las muestras de sangre se obtienen con facilidad y sus mediciones pueden ser fácilmente estandarizadas.

Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue medir los niveles en suero de un grupo de proteínas implicadas en la inflamación, remodelación tisular y asociadas a tumor en un intento por identificar biomarcadores candidatos sistémicos de la EPOC.

2. ANTECEDENTES

2.1 Definición de la Enfermedad pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC)

La EPOC es frecuente, prevenible y tratable. Se caracteriza por la presencia de obstrucción crónica al flujo aéreo, por lo general de manera progresiva y parcialmente reversible, asociada a una reacción inflamatoria pulmonar anómala y persistente a partículas o gases nocivos, principalmente al humo del tabaco y leña, que puede estar o no acompañada de síntomas (disnea, tos y expectoración), exacerbaciones, efectos extra-pulmonares y enfermedades concomitantes (Peces-Barba y cols. 2008).

2.2 Epidemiología

La EPOC es la única enfermedad crónica cuya morbi-mortalidad mantiene un incremento sostenido. Datos provenientes de estudios epidemiológicos realizados en distintas regiones del mundo permiten estimar la prevalencia global de EPOC en 10% para individuos mayores de 40 años (Mannino y cols. 2000).

La prevalencia, morbilidad y mortalidad de la EPOC varía entre países y aun entre distintos grupos del mismo país, pero generalmente se relaciona con el consumo de tabaco. Sin embargo, la exposición al humo de leña y otros combustibles de biomasa son un factor de riesgo para la enfermedad.

Puede estimarse que se producirá un aumento en la prevalencia e impacto de la enfermedad en las próximas décadas, debido a la exposición sostenida a los factores de riesgo (Halbert y cols. 2006).

2.2.1 Prevalencia

Los datos de prevalencia en Latinoamérica provienen de dos estudios: PLATINO (Menezes y cols. 2009) y PREPOCOL (Caballero y cols. 2008). PLATINO es un estudio epidemiológico sobre prevalencia de EPOC en individuos de 40 años y más, que fue realizado en cinco ciudades de Latinoamérica: Ciudad de México (México), San Pablo (Brasil), Montevideo (Uruguay), Santiago de Chile (Chile), y Caracas (Venezuela). PREPOCOL es un estudio epidemiológico de prevalencia realizado en cinco ciudades de Colombia (Fig. 1).

En estos estudios se determinaron las relaciones entre los valores de los parámetros espirométricos que también sirven en el diagnóstico de la EPOC:

FVC. Volumen total de aire que expulsa el paciente desde la inspiración máxima hasta la espiración máxima realizada en el menor tiempo posible. Su valor normal es superior al 80% del valor teórico.

FEV₁. Volumen de aire que se expulsa en el primer segundo de una respiración forzada. Su valor normal es mayor al 80% del valor teórico.

FEV₁/FVC. Su valor normal es mayor del 70%. Su valor postbroncodilatación < del 70% es diagnóstico de EPOC.

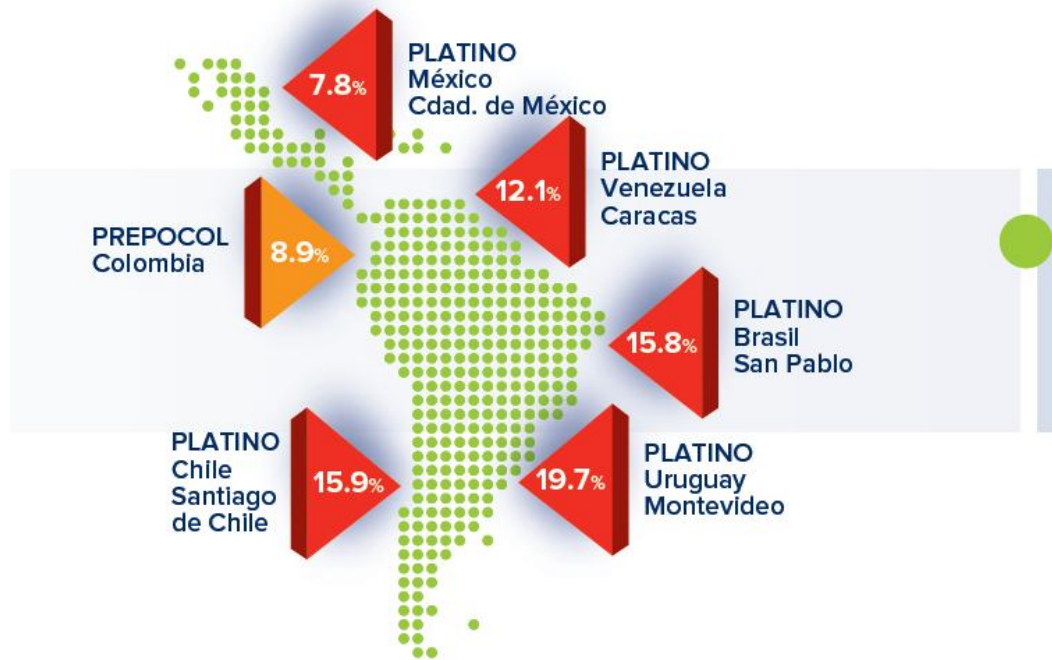


Figura 1. Prevalencia de la EPOC en Latinoamérica (Menezes y cols. 2009).

Utilizando como criterio diagnóstico la relación $VEF1/FVC$ (Volumen Espiratorio Forzado al primer segundo/Capacidad Vital Forzada) < 0.70 post-BD (Post Broncodilatador) la prevalencia global de la enfermedad en el estudio PLATINO fue de 14.3% (desde 7.8% en la Ciudad de México a 19.7% en Montevideo). El estudio PREPOCOL reportó una prevalencia media de 8.9% con un rango entre 6.2% en Barranquilla y 13.5% en Medellín, ilustrando las diferencias que puede haber en un mismo país.

El porcentaje de pacientes que permanecen sin diagnosticar (en este caso se nombrará como **sub-diagnóstico**) y el diagnóstico errado (falsos positivos, falsos negativos) constituyen un problema central en la EPOC.

En el estudio PLATINO, 89% de los individuos diagnosticados con EPOC no tenían diagnóstico previo de la enfermedad (sub-diagnóstico) y 64% de los individuos que manifestaban tener EPOC no tenían limitación al flujo aéreo (diagnóstico erróneo), lo que sugiere que la principal causa de diagnóstico erróneo es la subutilización (poca utilización) de la espirometría como herramienta diagnóstica. Solo 20% de los individuos encuestados en PLATINO se habían realizado una espirometría alguna vez en su vida (Menezes y cols. 2009).

Los estudios anteriormente mencionados proporcionan información acerca de la subestimación de la EPOC como problema médico, debido a la falta de conocimiento y diagnóstico de la enfermedad. Esta subestimación es variable entre los países dependiendo del conocimiento que sobre la enfermedad haya entre los profesionales de la salud y las autoridades sanitarias (Tálamo y cols. 2007).

2.2.2 Morbilidad

Los datos sobre morbilidad surgen de las consultas médicas, de las visitas a los servicios de urgencia y de las hospitalizaciones. Aunque la información sobre la morbilidad es menor y menos confiable que los datos sobre mortalidad, los pocos datos disponibles indican que la morbilidad debida a la EPOC aumenta con la edad y es mayor en hombres que en mujeres (Chapman y cols. 2004).

Debido a que usualmente la enfermedad no se diagnostica, ni recibe tratamiento en las etapas tempranas (*Estadio 1: EPOC Leve y Estadio 2: EPOC Moderada*), no queda registrada en las historias clínicas de estos pacientes.

La morbilidad por EPOC puede estar asociada a otras comorbilidades (p. ejemplo, enfermedades musculoesqueléticas, diabetes mellitus, etc.) que si bien no están directamente relacionadas con la EPOC, impactan sobre el estado de salud del paciente y pueden interferir con el tratamiento de la enfermedad.

En pacientes con enfermedad avanzada (*Estadio III: EPOC Grave y Estadio IV: EPOC Muy Grave*) la morbilidad puede ser atribuida erróneamente a otra patología (Schellevis y cols 1994).

2.2.3 Mortalidad

En cuanto a la mortalidad, la EPOC es responsable de al menos 2.9 millones de muertes anuales en el mundo. En la actualidad es la cuarta causa de muerte en el mundo y la que más rápido ha crecido en las economías avanzadas de Latinoamérica (Soriano y cols. 2007).

El incremento en la mortalidad ha sido sustancial en los últimos 30 años. En 1990 la tasa de decesos por EPOC ocupaba el sexto lugar, mientras que hoy se pronostica que se situará en el tercer lugar antes de 2020 (Pauwels y cols. 2004). Si se cumplen las expectativas, esta enfermedad se convertirá en la causa de muerte de más rápido crecimiento en las economías desarrolladas del mundo.

La causa principal de la enfermedad es el tabaquismo, pues el 90% de los casos de EPOC están relacionados con este hábito. Los cambios demográficos, sobre todo en los países en vías de desarrollo, donde la esperanza de vida está aumentando, conducirán a un aumento en el riesgo de que más personas cursen con esta enfermedad (López y cols. 2006).

En México, de acuerdo a las estadísticas que reporta el Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI), la mortalidad por EPOC actualmente se encuentra dentro de las 10 principales (INEGI, 2008).

2.3 Factores de riesgo

El principal factor de riesgo para la EPOC es el tabaquismo. En países en vías de desarrollo, factores como la exposición a biomasa (principalmente al humo de la leña para cocinar o calentar el ambiente), otras exposiciones ambientales y laborales, así como el antecedente de tuberculosis, tienen un impacto muy significativo sobre el riesgo de desarrollar EPOC (Zhou y cols. 2009, Eisner y cols. 2010).

2.3.1 Contaminación o factores ambientales

Tabaquismo: La prevalencia de tabaquismo varía ampliamente según las regiones. Los datos de PLATINO muestran que la prevalencia de tabaquismo varía considerablemente entre ciudades, desde 23.9% en San Pablo hasta 38.5% en Santiago de Chile, predominando en hombres, en quienes se observó la incidencia más alta de inicio del consumo entre 10-19 años de edad (Menezes y cols. 2009).

Es conocido que el riesgo para la EPOC es dosis-dependiente respecto al tabaco, incluyendo la exposición pasiva de individuos no fumadores. No obstante, el hecho de que no todos los fumadores desarrollen EPOC sugiere que el factor genético tiene un papel importante en este proceso (Zhou y cols. 2009).

Exposición a biomasa: La exposición a biomasa y el riesgo de enfermedad respiratoria es un problema creciente tanto en Latinoamérica (Dennis y cols. 1996), (Pérez-Padilla y cols. 1996) como en extensas regiones de Asia (Chapman y cols. 2004).

El estudio PREPOCOL encontró que individuos con una exposición al humo de leña mayor a 10 años, presentan un mayor riesgo de desarrollar EPOC.

Contaminación ambiental y exposición laboral: La exposición a gases, vapores o polvos orgánicos o inorgánicos derivados de procesos industriales, combustión de motores o calefacciones constituyen un factor de riesgo para la exacerbación de la EPOC (Hnizdo y cols. 2002).

2.3.2 Enfermedades

Antecedente de tuberculosis: Datos del estudio PLATINO muestran una prevalencia de EPOC de 30.7% entre los individuos con historia de tuberculosis, en comparación a 13% entre aquellos sin historia previa (Menezes y cols. 2007).

Infecciones respiratorias y tos recurrente en la infancia: Las infecciones del tracto respiratorio inferior en la infancia se asocian con la presencia de síntomas respiratorios en la edad adulta y aumento de la probabilidad de desarrollo de EPOC (Kerstjens y cols. 1997).

Los eventos respiratorios que ocurren en etapas tempranas de la vida limitan el desarrollo del aparato respiratorio y la función pulmonar y son un factor de riesgo independiente para la EPOC. En este sentido, la historia natural de la enfermedad podría empezar mucho antes de que el sujeto comenzara a fumar (Rennard y cols. 2008).

2.3.3 Factores genéticos

Déficit de Alfa-1 antitripsina (AAT): La deficiencia de la proteína alfa-1 antitripsina es un trastorno hereditario que se adquiere a través de una mutación en el gen *SERPINA1*¹ (este gen contiene las instrucciones para la síntesis de la proteína alfa-1 antitripsina). Dicha mutación puede conducir a una deficiencia en la síntesis de la proteína AAT o a una síntesis anormal de la misma, de tal manera que ésta no pueda desarrollar su función inhibidora de proteasas (sustancias producidas por los glóbulos blancos ante la presencia de infección o inflamación).

¹ El gen *SERPINA1* pertenece a una familia de genes llamados SERPINA (inhibidores de proteasas de serina). Se han identificado más de 120 mutaciones en este gen. La mutación más común que causa la deficiencia de la proteína AAT, reemplaza el aminoácido ácido glutámico con el aminoácido lisina en la posición 342 (escrito como Glu342Lys o E342K).

Esta condición se hereda en un patrón autosómico codominante (las dos versiones diferentes del gen pueden ser expresadas, y ambas versiones pueden contribuir al rasgo genético). El alelo más común del gen *SERPINA1*, llamado M, produce niveles normales de la proteína AAT, otras versiones por ejemplo el alelo S y el alelo Z, producen niveles bajos de la proteína (Fig. 2, Cuadro 1). Los individuos que son portadores de la combinación SZ tienen un mayor riesgo de desarrollar enfermedad pulmonar, sobre todo si fuman.

Niveles por debajo de los 80 mg son indicativos de que existe una deficiencia severa de AAT. Entre las manifestaciones clínicas más comunes que causa el déficit de AAT se encuentran la enfermedad pulmonar (las personas con esta enfermedad desarrollan generalmente los primeros signos y síntomas entre los 20 y 30 años) y la enfermedad hepática (David y cols. 2004). Del 1 a 3% de los pacientes que padecen EPOC, tienen deficiencia de la proteína AAT (Stoller y cols. 2005).

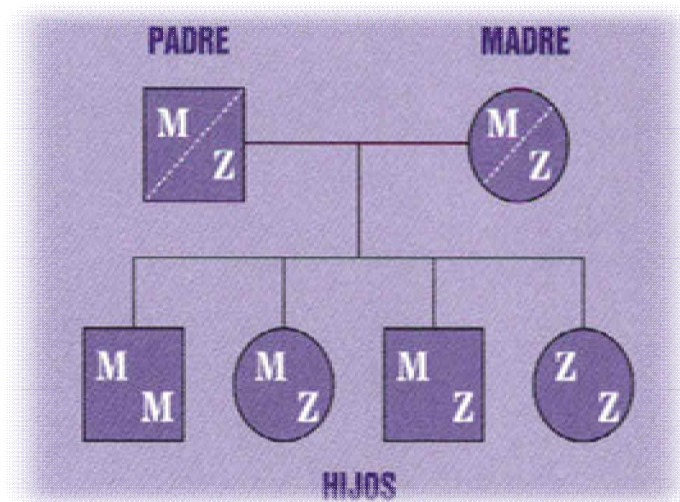


Figura 2. Posibles resultados de los hijos cuando ambos padres tienen un alelo normal (M) y uno alterado (Z o S).

CUADRO 1. Implicaciones de los alelos con respecto al desarrollo de síntomas

Normal (MM)	No tiene el trastorno y no es portador de genes AAT deficientes.
Portador (MZ)	Deficiencia de AAT leve o moderada. Podría desarrollar síntomas de enfermedad y es portador de un gen AAT alterado.
Portador (MS)	No se tiene claro si existe riesgo para desarrollar síntomas de enfermedad, pero es portador de un gen AAT alterado. (Aunque la mayoría de los estudios no indican que tenga un riesgo mayor de enfermedad.)
Alfa-1 (ZZ) (SZ)	Deficiencia de AAT moderada a severa que podría desarrollar síntomas de enfermedad y es portador de dos genes AAT alterados.
Alfa-1 (SS)	No está claro si tiene riesgo de desarrollar síntomas de enfermedad, pero es portador de dos genes AAT alterados.

Tomado del documento "Guide to Interpretation of Alpha-1 Antitrypsin Phenotypes" del Dr. Mark L. Brantly (2006).

2.3.4 Otros

Se han descrito factores socioeconómicos, geográficos y medioambientales, tanto dentro como fuera del hogar, al igual que ocupacionales asociados al desarrollo de EPOC. En el estudio PLATINO se observó una mayor prevalencia en hombres, en mayores de edad, en aquellos con menor educación, menor índice de masa corporal y mayor exposición al tabaquismo (López y cols. 2010).

2.4 Patogenia de la EPOC

La EPOC es una enfermedad inflamatoria que afecta a la vía aérea en todas sus dimensiones, los alveolos y la circulación pulmonar. El sitio principal de afectación son los bronquios de diámetro menor a 2 mm y el esqueleto elástico de los pulmones (Hogg y cols. 2004). El daño de estas estructuras es precoz en la evolución de la enfermedad y lleva a todas las alteraciones funcionales del aparato respiratorio y sus manifestaciones clínicas. Al mismo tiempo, y por diversos mecanismos, se activan manifestaciones sistémicas de la enfermedad que provocan efectos extra-pulmonares (osteomusculares, nutricionales, cardiovasculares, etc.) (Cosio y cols. 2009; Barnes y cols. 2009), (Fig. 3).

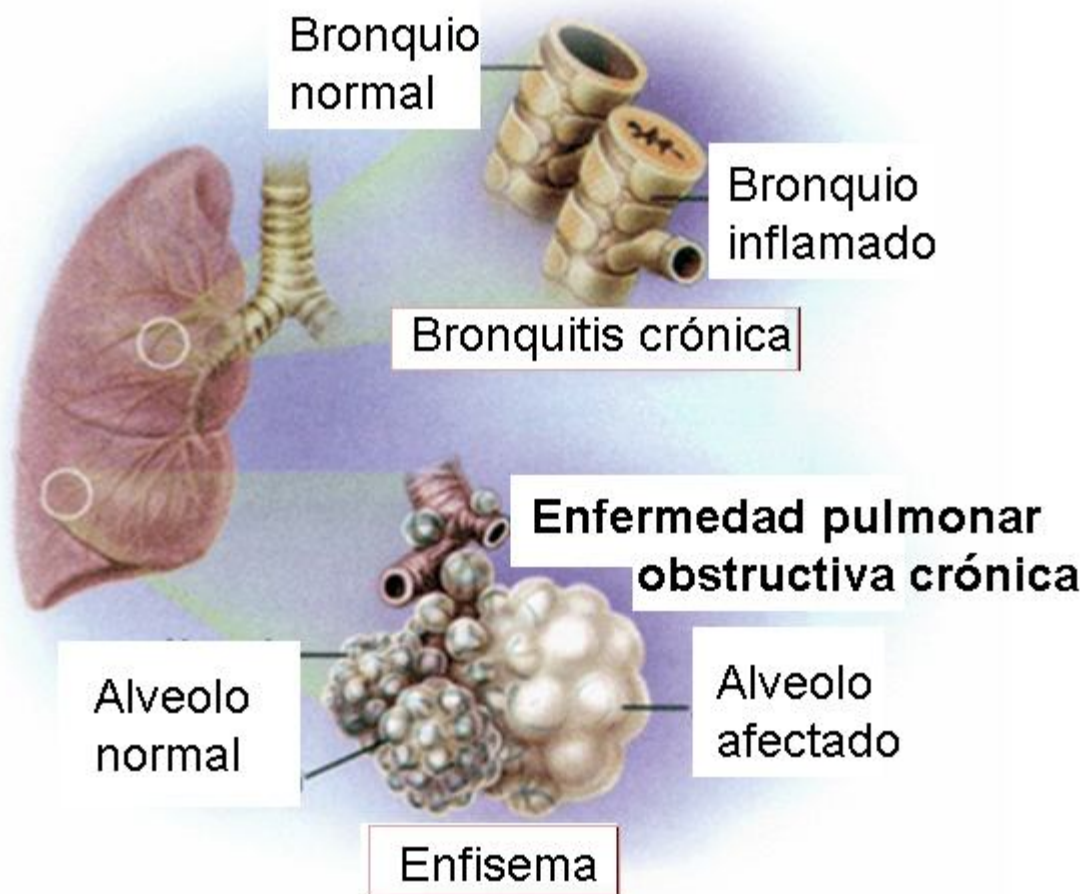


Figura 3. Patogenia de la EPOC (Hogg y cols. 2004).

El desorden respiratorio caracterizado en la EPOC implica: el desarrollo progresivo e irreversible de la limitación al flujo aéreo, la destrucción del parénquima pulmonar y la pérdida del retroceso elástico peribronquial, secundario a una respuesta inflamatoria de tipo crónica, como resultado de la inhalación de partículas o gases tóxicos, más relacionado con el humo del tabaco (Barnes, 2000).

Los mecanismos asociados a la patogenia de la EPOC mejor estudiados son los provocados por el humo del cigarrillo mientras que todavía hay muy pocos trabajos relacionados con la inhalación de productos derivados de la combustión de biomasa u otros inhalantes. Los diferentes agresores inhalados desencadenan un proceso inflamatorio crónico persistente en el tiempo (Macnee y cols. 2007). La interrelación entre la inflamación producida por los agentes nocivos del cigarrillo y las infecciones respiratorias contribuye a potenciar el daño (Fig. 4).



Figura 4. Interrelaciones entre la inflamación y la EPOC (Macnee y cols. 2007)

El resultado final de la inflamación crónica es el engrosamiento de la pared bronquial con disminución del calibre y la destrucción alveolar con agrandamiento de los espacios aéreos. Las consecuencias funcionales son la obstrucción al flujo aéreo, el colapso espiratorio del árbol bronquial y la pérdida del retroceso elástico. La inflamación es un mecanismo activo y progresivo con picos de aumento durante las exacerbaciones de la EPOC. La desactivación de este mecanismo es cada vez más difícil a medida que la enfermedad progresa y se establece el daño estructural (Scanlon y cols. 2000).

El efecto de dejar de fumar es más efectivo en las etapas tempranas de la enfermedad. Si bien las lesiones de la vía aérea y el parénquima pulmonar suelen coexistir, la distribución y combinación de las mismas son variables en diferentes zonas del aparato respiratorio y de un sujeto a otro. Los estudios con imágenes muestran que hay pacientes con daño predominante en la vía aérea y otros con daño predominante en los alveolos. Las mujeres tienen más compromiso bronquial y los hombres más compromiso alveolar en igualdad de exposición y esto es más notable en las personas que siguen fumando (Kohansal y cols. 2009).

Los pacientes con EPOC tienen además evidencias de inflamación sistémica con aumento en la sangre circulante de citocinas (IL-8, $TNF\alpha$, IL-6), quimiocinas (CXCL8), proteínas de fase aguda, como la Proteína C Reactiva (PCR) y cambios en el número y la funcionalidad de las células circulantes (neutrófilos, monocitos, linfocitos) (Barnes y cols. 2009). No está bien establecida la relación de estos cambios con otros efectos extra-pulmonares importantes de la enfermedad como la pérdida de peso y masa muscular o enfermedades concomitantes como la enfermedad coronaria.

El curso clínico se caracteriza por una lenta evolución que puede llegar a incapacitar al paciente para realizar actividades de la vida diaria, y se acompaña de episodios de empeoramiento de los síntomas (exacerbaciones) que pueden obligar al enfermo a consultar los servicios de urgencias y/o internarse. Este comportamiento explica el enorme impacto sobre la calidad de vida de los pacientes y el altísimo costo para los sistemas de salud (Scanlon y cols. 2000). El diagnóstico temprano o en etapas iniciales es de importancia fundamental para intentar modificar oportunamente el curso clínico de la EPOC.

2.5 Historia natural

La EPOC es una enfermedad progresiva que inicia con cambios inflamatorios tempranos en los pacientes que están expuestos en forma crónica a sustancias o gases nocivos, especialmente a inhalación directa del humo del cigarrillo, que lleva a un deterioro más rápido de la función pulmonar que los no expuestos. Aunque no todos los pacientes presentan un deterioro similar relativo a la dosis inhalada, sí hay una relación de severidad de daño con la cantidad de cigarrillos fumados (Macnee y cols. 2007).

La exposición crónica al humo de leña como combustible para cocinar también ha demostrado ser un factor importante para desarrollar EPOC en mujeres de estrato socioeconómico bajo, según la Iniciativa Global para el Diagnóstico, Manejo y Prevención de la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (GOLD, 2009).

En México, la leña (preferente a otras formas de biomasa sólida) es utilizada como el combustible doméstico primario en 69% de los hogares en el medio rural, lo cual es alarmante (Menezes y cols. 2007).

La EPOC sigue una historia natural variable, y aunque se ha dicho que sólo 15 a 20% de fumadores desarrollan la enfermedad, hoy en día se reconoce que el porcentaje puede ser mayor, pues se sabe que los síntomas clínicos aparecen en forma más tardía que las alteraciones funcionales, y estas aparecen posteriormente a los cambios inflamatorios, lo cual hace que muchos pacientes no sean diagnosticados hasta que la enfermedad sea clínicamente aparente y esté moderadamente avanzada (Caballero, 2003), (Fig. 5).

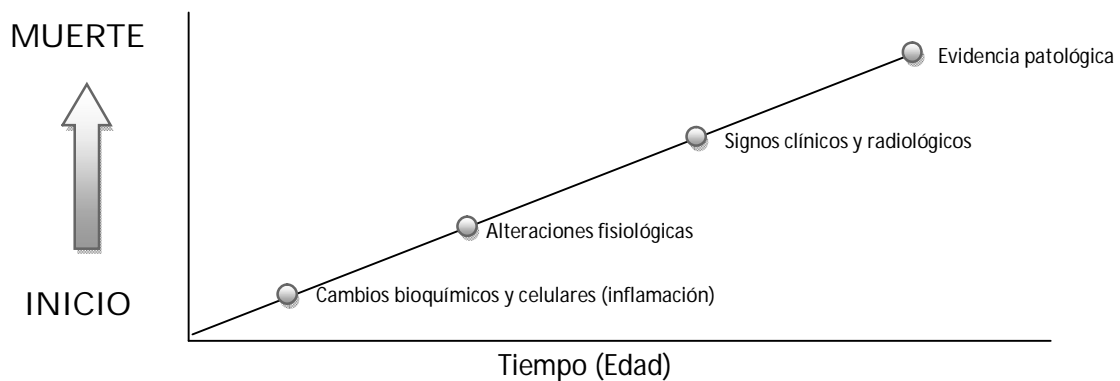


Figura 5. Historia natural de la EPOC (Caballero, 2003).

Además, se deben tomar en cuenta las diferencias genéticas personales y los factores de riesgo presentes, para estimar la posibilidad de desarrollar la enfermedad.

Fletcher y Peto (1977), realizaron un estudio con 792 hombres sanos de 30 a 59 años, a los que les dieron seguimiento durante 8 años, y encontraron una disminución de la función pulmonar, medida mediante el volumen espiratorio forzado al primer segundo (VEF1), de 25ml/año en no fumadores, en contraste con una pérdida de 50 ml/año en fumadores. Los afectados tuvieron una disminución de aproximadamente 100 ml/año, desarrollando posteriormente síntomas respiratorios y obstrucción severa.

2.5 Progresión de la EPOC, hábito tabáquico y función pulmonar.

En el diagrama de Fletcher y Peto (Fig. 6), los “fumadores susceptibles” pueden tener una caída acelerada de la función pulmonar, que suele manifestarse clínicamente como EPOC, a partir de la cuarta década de la vida. En aquellos pacientes con enfermedad leve a moderada que dejan de fumar en forma temprana, disminuye la velocidad de caída del volumen espiratorio forzado en el primer segundo (VEF1) y la mortalidad, mientras que en aquellos que persisten en el hábito tabáquico, la enfermedad progresa de forma más acelerada (Anthonisen y cols. 2002).

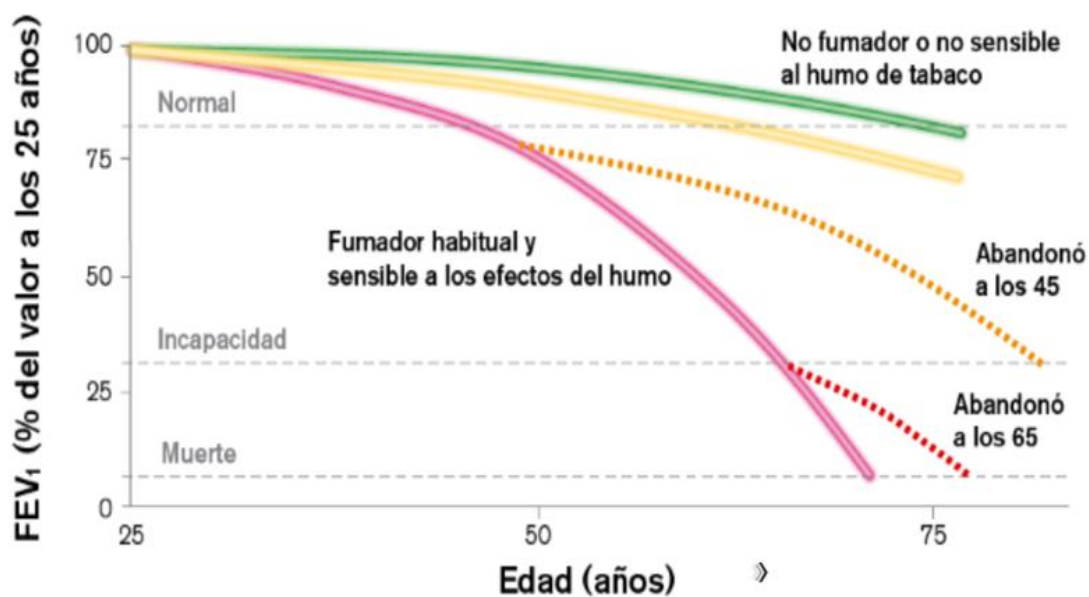


Figura 6. Diagrama de Fletcher y Peto (Fletcher y Peto, 1977).

Posterior a este estudio, se han conducido estudios de seguimiento de poblaciones en su función pulmonar, los cuales han permitido entender la evolución natural de la enfermedad.

Anthonisen y cols. (2002), hicieron un seguimiento por 5 años en fumadores asintomáticos y posteriormente lograron observar que la función pulmonar (VEF1) disminuía mayormente en personas que después de ser diagnosticadas con EPOC seguían teniendo el hábito tabáquico.

Simmons y cols. (2005), estudiaron fumadores con EPOC moderada y leve, y encontraron que los fumadores que disminuyeron completamente el consumo de cigarrillos tuvieron una mejoría leve de su función pulmonar.

Un factor importante en la progresión de la enfermedad y la mortalidad es la exacerbación (empeoramiento súbito del proceso patológico) de la EPOC. Los pacientes con función pulmonar mayormente comprometida tienen más probabilidad de tener exacerbación, y los periodos frecuentes de las exacerbaciones pueden contribuir en la disminución de la función pulmonar. El proceso de la exacerbación no tiene factor etiológico identificable, la mayoría parece ser ocasionada por infecciones virales o bacterianas. Durante la exacerbación la función pulmonar disminuye significativamente y generalmente se empieza a recuperar en un promedio de 6 días después del episodio (Seemungal y cols. 2000).

En resumen, se puede señalar que la EPOC es una enfermedad progresiva, que inicia con cambios inflamatorios, que llevan a la limitación del flujo aéreo por la inflamación bronquial y parenquimatosa con destrucción alveolar, disminución de la función pulmonar y de la capacidad de ejercicio, hecho agravado por el compromiso sistémico de la enfermedad, produciendo un impacto muy importante en la morbilidad, incapacidad laboral y muerte temprana de los pacientes. La medida más efectiva para disminuir la lesión pulmonar es la suspensión del consumo de cigarrillos, o de la exposición a partículas y gases nocivos.

2.7 Clasificación de la EPOC

La limitación al flujo de aire se mide por la espirometría, puesto que es la prueba de mayor disponibilidad y reproducibilidad para el estudio de la función pulmonar.

La espirometría es una técnica que mide los cambios que suceden en los volúmenes pulmonares durante la maniobra de inspiración máxima hasta una exhalación completa. Al mismo tiempo que se registra el máximo volumen espirado, éste se relaciona con el tiempo que dura la maniobra, con lo que es posible obtener una medida de flujo (GOLD, 2009).

Mediante el espirómetro se pueden registrar volúmenes y flujos. Los parámetros más utilizados son:

- *CVF ó VFC*: Corresponde al máximo volumen de aire espirado, con el máximo esfuerzo posible y se considera normal cuando es mayor o igual al 80% de su valor teórico predicho.

- *VEF1*: Es el volumen de aire que se expulsa durante el primer segundo de la espiración forzada. Se considera normal cuando es mayor o igual al 80% de su valor teórico.

2.7.1 Clasificación espirométrica

La iniciativa GOLD en 2009, propuso para efectos pedagógicos, una clasificación de la gravedad de la enfermedad de manera simplificada, en cuatro estadios, que están basados en la presencia de obstrucción definida como el valor de VEF1/CVF posbroncodilatador menor a 70%, y del valor absoluto de VEF1 posbroncodilatador (tabla 1).

TABLA 1. Clasificación de la gravedad de la EPOC.

Estadio I (leve)	FEV₁/ FVC < 0.7 FEV ₁ ≥ 80%
Estadio II (moderado)	FEV₁/ FVC < 0.7 FEV ₁ : ≥50% - <80%
Estadio III (grave)	FEV₁/ FVC < 0.7 FEV ₁ : ≥30% - <50%
Estadio IV (muy grave)	FEV₁/ FVC < 0.7 FEV ₁ : <30% o FEV ₁ : <50% + insuficiencia respiratoria crónica

Global Initiative for the Diagnosis, Management and Prevention of Obstructive Lung Diseases 2009.

2.8 Sintomatologías

La EPOC se caracteriza con frecuencia por un periodo asintomático por lo que pueden pasar varios años entre la aparición de la limitación al flujo aéreo y el desarrollo de las manifestaciones clínicas.

La disnea (dificultad respiratoria o falta de aire), tos y expectoración son los síntomas cardinales de la EPOC. Cuando la enfermedad progresa, aumenta la intensidad de la disnea, la tos, la expectoración y se hace más frecuente la presencia de sibilancias (sonido silbante y chillón durante la respiración que ocurre cuando el aire fluye a través de las vías respiratorias estrechas).

La disnea de esfuerzo es el motivo de consulta más frecuente y por lo general se asocia con diagnóstico tardío de la enfermedad; los pacientes con disnea grave y persistente generalmente tienen mayor grado de obstrucción y peor pronóstico (Schols y cols. 1993).

La tos crónica es frecuentemente productiva con expectoración mucosa de predominio matutino. A medida que la enfermedad progresa, la intensidad de la tos y la expectoración aumentan. Un volumen de expectoración excesivo sugiere la presencia de bronquiectasias (dilatación anormal e irreversible del árbol bronquial). La tos crónica y el aumento de la expectoración preceden frecuentemente en varios años al desarrollo de la limitación del flujo de aire, lo que ofrece una oportunidad única para identificar fumadores y otros individuos con factores de riesgo para desarrollar la enfermedad e intervenir en estadios más tempranos de la EPOC. Sin embargo, algunos individuos desarrollan una limitación importante al flujo de aire, sin presentar síntomas de tos ni de aumento de la expectoración (Vestbo y cols. 2006).

2.8.1 Síntomas de acuerdo a la gravedad de la enfermedad

Estadio I: EPOC leve - Caracterizado por limitación leve del flujo de aire ($FEV1/FVC < 0,70$, $FEV1 \geq 80\%$ del valor de referencia) y generalmente, pero no siempre, con tos crónica y aumento de la expectoración. En este estadio, el individuo puede ignorar que su función pulmonar es anormal.

Estadio II: EPOC moderada - Caracterizado por un mayor deterioro de la limitación del flujo de aire ($FEV1/FVC < 0,70$, $50\% \leq FEV1 < 80\%$ del valor de referencia) y en general por progresión de los síntomas y de la dificultad respiratoria, que se manifiesta característicamente durante el ejercicio. Este es el estadio en que los pacientes usualmente solicitan atención médica debido a la disnea o a una exacerbación de la enfermedad.

Estadio III: EPOC grave - Caracterizado por limitación importante del flujo de aire ($FEV1/FVC < 0,70$, $30\% \leq FEV1 < 50\%$ del valor de referencia), una disnea mayor, disminución de la capacidad para hacer ejercicio y exacerbaciones frecuentes que casi siempre impactan sobre la calidad de vida de los pacientes.

Estadio IV: EPOC muy grave - Caracterizado por una limitación del flujo de aire ($FEV1/FVC < 0,70$; $FEV1 < 30\%$ del valor de referencia o $FEV1 < 50\%$ en presencia de insuficiencia respiratoria). La insuficiencia respiratoria se define como una disminución de la presión parcial de oxígeno (PaO_2) menor de 60 mm Hg (8.0 kPa), con o sin una presión parcial de CO_2 ($PaCO_2$) mayor de 50 mm Hg (6.7 kPa), medidos a nivel del mar.

La insuficiencia respiratoria puede llevar a la aparición de *cor pulmonale* (insuficiencia cardíaca derecha), cuyos signos clínicos es la ingurgitación yugular y los edemas de los miembros inferiores. Los pacientes pueden tener EPOC muy grave (estadio IV) incluso si el *FEV1* es >30% del valor de referencia, si se acompañan de estas complicaciones. En este estadio, la calidad de vida relacionada con la salud se encuentra sustancialmente afectada y las exacerbaciones pueden poner en riesgo la vida de los pacientes. No siempre la intensidad de los signos clínicos se asocia con mayor gravedad de la enfermedad (GOLD 2009).

2.9 Proceso para el diagnóstico

No existe, por ahora, ningún método capaz de detectar la EPOC antes de que se produzcan lesiones irreversibles, ni existen pruebas que pronostiquen la enfermedad. Por otro lado, tampoco resulta fácil diagnosticarla en sus estadios tempranos, ya que en las primeras fases los síntomas son apenas perceptibles o se confunden con el envejecimiento, con procesos banales o simplemente el afectado se acostumbra a ellos y no les concede importancia. Muchos pacientes no acuden al médico hasta que manifiestan síntomas graves. Se estima que hasta el 50% de los americanos y el 75% de los europeos que padecen EPOC no han sido diagnosticados (Gan y cols. 2004).

Debido a su naturaleza progresiva, es fundamental el diagnóstico y tratamiento temprano de la EPOC a fin de evitar las complicaciones y reagudizaciones (agravamiento de los síntomas) asociados a la enfermedad.

El diagnóstico de la EPOC se basa en una evaluación de diversos factores:

- Factores de riesgo: tabaquismo y exposición a contaminantes
- Síntomas: tos persistente, disnea. Posteriormente se confirma mediante una espirometría.

2.9.1 Métodos de diagnóstico

Prueba de función pulmonar: Espirometría

Es una prueba sencilla, no invasiva, que consiste en soplar por un equipo, siguiendo las indicaciones precisas del técnico, para medir los flujos respiratorios, lo que permite medir el volumen del aire que se expulsa de los pulmones después de inspirar profundamente y permite descartar o confirmar la presencia de obstrucción al flujo aéreo de acuerdo a las guías vigentes, con una relación *FEV1/FVC* menor del 70%. En todas las guías, el grado de obstrucción espirométrica (*FEV1* expresado en porcentaje del valor predicho) es considerado para definir la gravedad de la EPOC, estadificando la severidad y el nivel de asistencia médica requerida (GOLD, 2009).

Sin embargo, se ha comprobado que el utilizar exclusivamente el índice $FEV1/FVC = 0.70\%$ para identificar a los sujetos con obstrucción al paso del aire, puede conducir a un sobrediagnóstico en mayores de 50 años, debido a que el proceso de envejecimiento afecta a los volúmenes pulmonares, así como a un problema importante de subdiagnóstico en adultos jóvenes, dado que la pérdida de la función pulmonar es un proceso a largo plazo y la enfermedad habitualmente se diagnostica en fases avanzadas hasta que el paciente refiere disnea o presenta un estado de exacerbación (Johannessen y cols. 2006).

Otra limitación bien conocida del índice *FEV1/FVC* es que sólo mide un aspecto de la enfermedad y no predice con precisión su progresión, especialmente en las primeras fases de la enfermedad (Hnizdo y cols. 2006). Tomando en cuenta que la EPOC no solo presenta manifestaciones pulmonares sino también extrapulmonares como: pérdida de la masa muscular, aumento del riesgo cardiovascular, osteoporosis, etcétera, es importante considerar ambas manifestaciones ya que interaccionan entre sí contribuyendo conjuntamente a la progresiva disminución en la capacidad de ejercicio y a la pérdida de la calidad de vida (Nishimura y cols. 2002).

Considerando que la EPOC es una enfermedad multidimensional, con una gran heterogeneidad fenotípica y que no puede ser representada adecuadamente sólo con el índice *FEV1*, se estableció el índice BODE que toma en cuenta el índice *FEV1*, la disnea, el índice de masa corporal y la prueba de la marcha de 6 min. No obstante, la mayoría de ellos tienen el inconveniente de ser poco específicos ya que son modificables por otras patologías y algunos dependen de la colaboración del paciente. Además, no son incluidos otros aspectos de la enfermedad como la hiperinsuflación pulmonar, los episodios de exacerbación y las comorbilidades, las cuales han demostrado ser relevantes dentro de la patogenia de la EPOC (Agustí y cols. 2003).

Prueba broncodilatadora

Es indispensable en la valoración inicial del paciente y puede ayudar a realizar un diagnóstico diferencial de otras enfermedades respiratorias como el asma. Consiste en realizar una espirometría en condiciones basales y otra, tras la administración de un broncodilatador inhalado (agonista β_2 de acción rápida; se utiliza habitualmente salbutamol 400 μ g).

Se considera una prueba positiva cuando el volumen espiratorio forzado al primer segundo (VEF1) aumenta más del 12% y en términos absolutos más de 200 ml.

Plestimografía

Es un examen que se realiza colocando brazaletes de presión sanguínea en las extremidades para medir la presión sistólica. Luego se conectan estos brazaletes a un instrumento para registrar el volumen del pulso (pletismógrafo), el cual muestra cada onda del pulso. En este examen se compara la presión sistólica entre las extremidades inferiores y superiores para ayudar a descartar alguna enfermedad que esté obstruyendo las arterias en las extremidades así como al diagnóstico diferencial de la EPOC con otros procesos pulmonares restrictivos, ya que permite valorar el grado de atrapamiento aéreo, es decir, el aire que permanece en los pulmones tras una espiración forzada.

Capacidad de difusión pulmonar de monóxido de carbono (DLCO).

La capacidad de difusión de *CO* mide el área pulmonar disponible para el intercambio de gases. Además, dado que el *CO* se une con gran avidez a la hemoglobina, no sólo examina el paso de *CO* a través de la membrana alvéolo-capilar, sino también su capacidad de combinarse con la hemoglobina. Existen dos métodos para realizar esta prueba: el de respiración única y el de equilibrio estable.

El primero, por su sencillez y rapidez, es el más utilizado en el laboratorio de Neumología. Consiste en la inhalación de una mezcla de gases que contiene *CO*, helio y aire, cuyas concentraciones se conocen. Esta inhalación debe efectuarse con una maniobra inspiratoria máxima, y posteriormente el sujeto debe retener la respiración durante 10 segundos, al cabo de los cuales realiza una espiración forzada. A partir de este gas espirado se calcula la cantidad de *CO* transferido al capilar (DLCO). La adición de helio en la mezcla permite conocer el volumen alveolar en el cual se ha difundido el *CO*.

La capacidad de difusión de CO se encuentra reducida en el enfisema pulmonar, en donde la destrucción de los tabiques alveolares ocasiona una disminución de la superficie de intercambio gaseoso, en las enfermedades vasculares del pulmón.

Gasometría arterial

Imprescindible para el diagnóstico y valoración inicial de la insuficiencia respiratoria que puede acompañar a la EPOC, en las etapas más avanzadas de la enfermedad. Está indicada su realización siempre que existan signos sugestivos de insuficiencia respiratoria o de insuficiencia cardiaca derecha, principalmente en casos de EPOC grave, muy grave y en algunos casos de EPOC moderada. También se realiza para decidir y controlar la oxigenoterapia continua domiciliaria.

Pruebas radiológicas

Radiografía de tórax: Se debe realizar en la valoración inicial de todo paciente, cuando aparezcan nuevos síntomas y en los episodios de agudización para confirmar o descartar complicaciones (neumonía o neumotórax).

Tomografía Axial Computarizada (TAC): No es una exploración que se hace de rutina en la EPOC. Sólo está indicada en algunos casos para el estudio de enfisema; si hay sospecha de bronquiectasias (dilataciones bronquiales); o para confirmar o descartar un carcinoma.

Determinación de Alfa-1 antitripsina

Está indicada principalmente en pacientes que desarrollan EPOC a una edad temprana (menos de 45 años) o en quienes tengan una historia familiar muy sugestiva, aunque las sociedades científicas recomiendan que todo paciente con EPOC tenga realizada esta determinación al menos una vez en su vida. Tiene un gran valor pronóstico y permite instaurar un tratamiento sustitutivo del déficit. También se utiliza como parte del estudio familiar en el consejo genético. Las pruebas para diagnosticar el déficit de la proteína AAT son las siguientes:

Nivel de AAT en la sangre: Los métodos más comunes para determinar los niveles de la proteína AAT en sangre son: Inmunodifusión Radial y Nefelometría², las personas con deficiencia de AAT tienen un nivel de AAT por debajo del nivel considerado “protector” (Cuadro 2).

² **La inmunodifusión radial:** La inmunodifusión se basa en la formación de bandas de precipitación Ag-Ac en medios semisólidos (generalmente de agarosa). La formación de inmunocomplejos se ve afectada por variables como: pH, temperatura, fuerza iónica del medio, características propias del Ac como afinidad y avidéz y, la más importante, la concentración relativa de Ag y Ac. La zona óptima de concentración para la formación del precipitado Ag-Ac se llama zona de equivalencia. Para la inmunodifusión radial se utiliza un antisuero específico a la agarosa que, a su vez, se vierte sobre placas. Se forman pozos en el gel y se colocan en ellos estándares de proteínas y problemas (antígenos). Para visualizar el resultado de la inmunodifusión, una vez terminada la difusión se lava el gel y se tiñe con colorantes para proteínas (ej. Negro amido o azul brillante de Coomassie).

La nefelometría: Mide la luz dispersada en dirección distinta a la luz emitida (generalmente con ángulos que oscilan entre 15 y 90°). Utiliza como instrumento el nefelómetro (en el que el detector se ubica con un ángulo que oscila entre 15 y 90° ej. a 90°). Para dar como resultado una concentración de proteína concreta, se compara la cantidad de luz dispersada o la tasa de aumento de dispersión con los valores de dichos parámetros en estándares proteicos conocidos.

CUADRO 2. Estándares para el diagnóstico y manejo de los individuos con déficit de alfa-1 antitripsina

Método	Parámetro Normal	Nivel Protector
Inmunodifusión Radial	150/200-350/400 mg/dl*§	80 mg/dl§*
Nefelometría	83/120-200/220 mg/dl*	50 mg/dl*; 11 µM†

AMERICAN JOURNAL OF RESPIRATORY CRITICAL CARE MEDICINE, 2003

*Valores obtenidos por medio de las normas comerciales disponibles.

§Valores comerciales más comunes (Behring Diagnostics).

†Valores obtenidos por medio de las normas del Registro Alfa-1 de los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos (NIH, por sus siglas en inglés)

2.9.2 Tratamiento

El tratamiento de la EPOC debe conseguir la mejora de los síntomas y la calidad de vida del paciente, así como prevenir la progresión, las complicaciones y las agudizaciones de la enfermedad, con el objetivo último de reducir la mortalidad.

Vacunas

Las infecciones respiratorias empeoran la EPOC, por ello se recomienda la vacuna anual contra la gripe y la vacuna antineumocócica cada 8-10 años como medida preventiva.

Medicamentos broncodilatadores

Los expertos recomiendan los broncodilatadores como tratamiento de primera línea, ya que los síntomas de la mayoría de los pacientes, como la disnea y/o la menor tolerancia al esfuerzo, mejoran sustancialmente con este tratamiento. Asimismo, los broncodilatadores disminuyen las agudizaciones y, en definitiva, mejoran la calidad de vida. Los hay de diferentes tipos:

Anticolinérgicos: Estos medicamentos también se administran por vía inhalada y pueden usarse junto con los beta2-adrenérgicos. Pueden ser:

- De acción corta (Bromuro de Ipratropio): Su mayor inconveniente es que la frecuencia de administración debe ser precisa, cada 4-6 horas, lo que dificulta el cumplimiento del tratamiento.

- De acción prolongada (tiotropio): Su principal ventaja es la dosis única diaria y su mayor potencia. Este broncodilatador reduce la obstrucción al flujo aéreo manteniendo su eficacia durante más de 24 horas. Ha demostrado disminuir la disnea, mejorar la tolerancia al ejercicio y reducir los episodios de exacerbación y hospitalizaciones de los pacientes con EPOC (Sutherland y cols. 2004).

Beta₂- adrenérgicos. Pueden ser:

- De acción corta (salbutamol, terbutalina). Actúan estimulando los receptores Beta₂ de los bronquios. Debido a su rapidez de acción (15-20 minutos) y a su vida media (3-6 horas), se recomienda utilizarlos a demanda (cuando debido a los síntomas se requiere) en fases leves de la enfermedad.

-De acción prolongada (salmeterol y formoterol). Tienen el mismo mecanismo de acción, pero su vida media es de 12 horas.

Metilxantinas (Teofilina). Se administran por vía oral y la dosis debe ajustarse en cada paciente en función de la respuesta y de sus concentraciones en sangre. Aunque fueron muy utilizadas hace años, hoy en día su utilización es muy limitada ya que son broncodilatadores débiles y tienen un riesgo elevado de producir efectos secundarios. Es un tratamiento de segunda línea para pacientes graves.

Corticoides inhalados (budesonida, fluticasona). Medicamentos antiinflamatorios que se utilizan como tratamiento de mantenimiento inicial en el asma. Las guías internacionales (GOLD, 2009) recomiendan el uso de corticoides inhalados únicamente en pacientes con EPOC grave o muy grave con frecuentes reagudizaciones. No se consideran adecuados para el tratamiento de todos los pacientes con EPOC.

Agentes mucolíticos. El aumento en la producción y la viscosidad del moco es un hecho relevante en la EPOC, especialmente en pacientes con bronquitis crónica predominante. Es necesaria la administración de mucolíticos en la depuración mucociliar; la N-acetilcisteína es capaz de romper las uniones disulfuro que unen las moléculas de glicoproteína permitiendo un moco menos viscoso y elástico.

Antibióticos. Su uso sólo está recomendado en las agudizaciones que cursen con infección bacteriana. Para elegir el antibiótico más adecuado en cada caso, el médico considerará las resistencias bacterianas que existen en cada región, la edad del paciente, la gravedad de la enfermedad, la presencia de otras enfermedades y el uso previo de antibióticos.

Oxigenoterapia. En los pacientes que están en una fase avanzada de la EPOC, las concentraciones de oxígeno en sangre pueden disminuir demasiado y precisar por ello una terapia continua de oxígeno en su domicilio. La oxigenoterapia domiciliaria junto con el abandono del tabaco son los únicos tratamientos que han demostrado mejorar la supervivencia en pacientes que padecen esta enfermedad.

Rehabilitación pulmonar. Todos los pacientes con EPOC pueden beneficiarse de los programas de ejercicios de rehabilitación, que han demostrado mejorar la calidad de vida, la tolerancia al ejercicio y los síntomas de disnea (dificultad respiratoria o falta de aire) y fatiga.

Tratamiento quirúrgico. En situaciones muy específicas puede plantearse el tratamiento quirúrgico del paciente con EPOC. Este tipo de intervenciones tienen una elevada morbi-mortalidad postoperatoria, por lo que la selección de los pacientes ha de ser muy cuidadosa (Sutherland y cols. 2004).

2.9.3 Biomarcadores en la EPOC

Se han desarrollado múltiples líneas de investigación para encontrar un biomarcador ideal para la EPOC, con el objetivo de encontrar una señal característica de la enfermedad, que se pueda medir antes y después de una intervención terapéutica y, de esta forma, determinar en forma objetiva el resultado de ésta.

Los Institutos Nacionales de Salud (NIH, por sus siglas en inglés) de los Estados Unidos definen el concepto de *biomarcador* como “una característica que se puede medir en forma objetiva y que permite evaluar un proceso biológico normal, un proceso patogénico o una respuesta farmacológica a intervenciones terapéuticas” (Barnes y cols. 2006).

Un biomarcador ideal debería ser confiable y reproducible, informar sobre el proceso de la enfermedad y el pronóstico, ser poco costoso, medir cambios en relación con las intervenciones terapéuticas, ser sensible, específico de la enfermedad, tener valores predictivos positivos y negativos altos y tener un método de obtención aceptable para los pacientes.

A lo largo de los últimos años se han buscado biomarcadores a partir de diversas fuentes, en pacientes con EPOC, como son la orina, gases exhalados, condensado de aire espirado, esputo, lavado y cepillado nasal, lavado broncoalveolar, biopsia nasal y/o bronquial y mediciones de plasma o sangre periférica (Cazzola y cols. 2008).

Aire exhalado

Si bien en el aire exhalado se pueden medir el óxido nítrico, el monóxido de carbono y otros biomarcadores, los cuales han mostrado resultados promisorios, se requiere realizar estudios más extensos para que éstos puedan ser considerados en el diagnóstico o estadificación de la EPOC (Sin y Vestbo, 2009).

Fluido recuperado

La captación del condensado de aire espirado es una metodología muy bien tolerada con posibilidad para obtener biomarcadores del fluido recuperado. Algunos biomarcadores que han sido detectados y medidos por esta técnica en la EPOC incluyen: el leucotrieno B4, el 8-isoprostano y el peróxido de hidrógeno. No obstante, la alta variabilidad de estos biomarcadores entre los pacientes y la falta de un método confiable para corregirla constituyen una limitación muy importante del método.

Espujo

El espujo inducido es una metodología segura y bien tolerada por los pacientes. Sin embargo no hay datos a largo plazo sobre biomarcadores en espujo y resultados que puedan ser de valor.

Lavado bronquioalveolar

El lavado bronquioalveolar es una técnica excelente para obtener muestras de las zonas periféricas del pulmón y estudiar los mediadores y las células. Su inconveniente es que por tratarse de una técnica invasiva, ha sido utilizada únicamente en trabajos de investigación y además presenta una gran variabilidad en la concentración de los biomarcadores en el fluido recuperado, que no puede ser corregida por un método confiable.

La búsqueda de biomarcadores para la EPOC, en tipos de muestras como las anteriormente descritas se ha disminuido actualmente, ya sea por la invasividad del procedimiento al obtener las muestras (por ejemplo, muestras de tejido pulmonar), o por la falta de estandarización que dificulta la utilización de muestras provenientes de aire condensado exhalado y espujo inducido.

Por otra parte, el concepto actual de la EPOC, como una enfermedad con importante afectación extrapulmonar, la teoría de una inflamación sistémica que actuaría mediante un mecanismo de *spill over* (“diseminación”) es la más aceptada. Esto ha favorecido la investigación sobre la búsqueda de biomarcadores en muestras sanguíneas (Cazzola y cols. 2008).

Biomarcadores en sangre

El pulmón es el único órgano que se encuentra bañado por la sangre en forma continua, de modo que es coherente pensar en la posibilidad de encontrar marcadores en sangre, además, con el reconocimiento de la EPOC como una enfermedad sistémica, se ha producido un cambio en la orientación de la búsqueda de biomarcadores utilizando muestras de sangre (Sin y Vestbo, 2009).

Se sabe que en la EPOC, la respuesta inflamatoria no está limitada a los pulmones, sino que ocurre una inflamación de tipo sistémica, con circulación de mediadores de inflamación como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) e interleucinas (ILs), de mediadores de estrés oxidativo como superóxidos y radicales hidroxilo, neutrófilos y linfocitos activados, y el aumento de los niveles plasmáticos de proteínas de fase aguda inflamatoria como la proteína C reactiva (CRP), (Gan y cols. 2010).

Estos mediadores inflamatorios juegan un papel importante en la patogénesis y en la progresión de la enfermedad, pues están implicados en las manifestaciones extrapulmonares de la EPOC, tales como: la pérdida de peso, disfunción de los músculos esqueléticos, enfermedades cardiovasculares, depresión, osteoporosis y la reducción de la tolerancia al ejercicio (Eid y cols. 2001).

Los biomarcadores en suero o plasma son atractivos debido a que la sangre se obtiene con facilidad y además sus mediciones pueden ser fácilmente estandarizadas.

El biomarcador más estudiado a nivel sérico ha sido la proteína C reactiva (CRP). La CRP es un reactante de fase aguda producido por los hepatocitos en respuesta al control transcripcional de la IL6. No es un biomarcador específico de la EPOC. A pesar de esto, es el biomarcador más estudiado en esta enfermedad, donde sus niveles están incrementados en relación con la severidad de la EPOC, y disminuyen en respuesta al tratamiento con corticoides, tanto inhalados como sistémicos, asimismo, son un predictor independiente de mortalidad, del riesgo de hospitalización y el constante nivel elevado después de una exacerbación predice la posibilidad de una nueva exacerbación (MacCallum, 2005; Man y Sin, 2005).

A pesar de estos estudios la CRP no ha encontrado un papel en el diagnóstico de la EPOC y tiene un valor potencial limitado en su estadificación, aunque puede dar cierta información sobre el pronóstico de hospitalización y muerte (Dahl y cols. 2007).

Los valores de la CRP son difíciles de trasladar para los casos individuales ya que existen otras patologías que pueden modificarlos tales como inflamaciones sistémicas, infecciones, cáncer, etc. Por este motivo se ha estudiado a la CRP en conjunto con otros biomarcadores tales como la fibronectina. Ésta es una glicoproteína dimérica presente en la matriz extracelular (MEC) de la mayoría de los tejidos celulares animales. Existen muchas isoformas de la fibronectina. Una, la denominada fibronectina plasmática, es soluble y circula por la sangre, donde parece incrementar la coagulación de la misma, la cicatrización y la fagocitosis. El resto se organiza en la superficie celular depositándose en la matriz extracelular como fibrillas de fibronectina muy insolubles, con dímeros que presentan enlaces

disulfuro adicionales. La relación fibronectina/CRP podría ser una medida del balance entre reparación e inflamación (de Torres y cols. 2006).

En la EPOC se han estudiado otros biomarcadores como el TNF α y la IL-8, que se han encontrado elevadas en pacientes con EPOC, y sus niveles guardan relación con la severidad de la enfermedad; así como la IL-13, que se correlaciona negativamente con el volumen espiratorio forzado en el primer segundo (FEV1) (Keatings y cols. 1996).

Durante los episodios de exacerbación se ha estudiado el valor de los biomarcadores, ya que sería de gran utilidad identificar el fenotipo de pacientes con exacerbaciones frecuentes o encontrar un biomarcador que pudiera aportar información sobre las exacerbaciones y de ese modo permitir una intervención temprana. Existen múltiples biomarcadores que se han encontrado elevados en los episodios de exacerbación, como la CRP, la adiponectina (ACRP3), la molécula de adhesión soluble intracelular (ICAM-1), el factor inhibitorio de progenitor mielóide (MPL-1) y la citocina pulmonar regulada y activada (PARC) por citar algunos, (Patel y cols. 2010).

Actualmente no existe un biomarcador ideal para ser utilizado como una herramienta clínica, la CRP ha sido ampliamente estudiada pero no es específica de la EPOC.

En conclusión, actualmente no se dispone en la clínica de un marcador que permita aportar información sobre el daño y severidad de la enfermedad, así como monitorear el efecto del tratamiento en los pacientes con EPOC, por lo que es necesario buscar, caracterizar y validar nuevos biomarcadores.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica es una de las 10 principales causas de morbi-mortalidad. En la actualidad ocupa la cuarta causa de mortalidad en el mundo, con un impacto socioeconómico enorme (Murray y cols. 1996; Sin y cols. 2009).

Los métodos actuales para el diagnóstico de la EPOC, la clasificación de la gravedad y el seguimiento de la enfermedad, no son sensibles y son poco específicos, reflejando poco acerca de las características individuales y el estado clínico de los pacientes, influyendo así en el sub-diagnóstico y mal manejo de los mismos, disminuyendo las opciones de tratamiento y la supervivencia del paciente con EPOC.

4. JUSTIFICACIÓN

La creciente morbi-mortalidad de la EPOC plantea la necesidad de identificar nuevas estrategias para el diagnóstico temprano de la enfermedad en grupos de alto riesgo, así como para supervisar la actividad de la misma, predecir el futuro de los resultados clínicos y el efecto de las intervenciones terapéuticas.

En concordancia con la práctica clínica, la definición de la EPOC se basa en el grado de obstrucción al flujo de aire, medido a través de la espirometría, técnica establecida como el único procedimiento validado para el diagnóstico y seguimiento de la gravedad de la EPOC. Sin embargo, esta enfermedad muestra una compleja variedad de manifestaciones celulares, anatómicas, funcionales y clínicas de tipo sistémicas que afectan principalmente al pulmón. La gravedad de ésta no depende sólo de la función pulmonar, sino también de otras variables como: los síntomas clínicos, las exacerbaciones y la presencia de complicaciones y/o comorbilidades, que no pueden expresarse a través del volumen espiratorio forzado en el primer segundo (FEV1). Por ello, el aceptar la complejidad de la EPOC como una enfermedad pulmonar con demostrada afectación sistémica, requiere sustituir el enfoque analítico centrado en FEV1 por un enfoque multifacético, que destaca la necesidad de identificar nuevos biomarcadores que integren estas características clínicas en el análisis de los pacientes y que cambien el curso del diagnóstico y progresión que establece actualmente la enfermedad. Por lo tanto, en el presente trabajo se plantea la determinación de la concentración sérica de un panel de proteínas implicadas en procesos inflamatorios, de remodelación de tejido y asociadas a tumor (Anexo 2), en pacientes con EPOC y sujetos fumadores, pertenecientes a nuestra población, con la finalidad de correlacionar la expresión alterada de las proteínas con las manifestaciones clínicas de la enfermedad.

5. HIPÓTESIS

Las proteínas a evaluar tendrán una concentración diferencial entre el grupo de fumadores y el grupo de pacientes con EPOC. Estos cambios en la concentración de proteínas se asociarán con las manifestaciones clínicas de la enfermedad como inflamación, remodelación, exacerbación y/o gravedad de la obstrucción en la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC).

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo General

Medir la concentración en suero de un grupo de proteínas inflamatorias, de remodelación de tejido y asociadas a tumor e identificar biomarcadores candidatos sistémicos de la EPOC.

6.2 Objetivos específicos

- Elaborar una base de datos con la información clínica más relevante de los pacientes que participen en el estudio.
- Determinar la concentración sérica de proteínas implicadas en inflamación, remodelación de tejido y asociadas a tumor, mediante el método de ELISA.
- Determinar si existe diferencia estadísticamente significativa en la concentración de las proteínas séricas evaluadas, entre pacientes con EPOC e individuos control mediante pruebas no paramétricas.
- Determinar si existe correlación entre las concentraciones alteradas de las proteínas con las manifestaciones clínicas de la enfermedad en pacientes con EPOC.

7. METODOLOGÍA

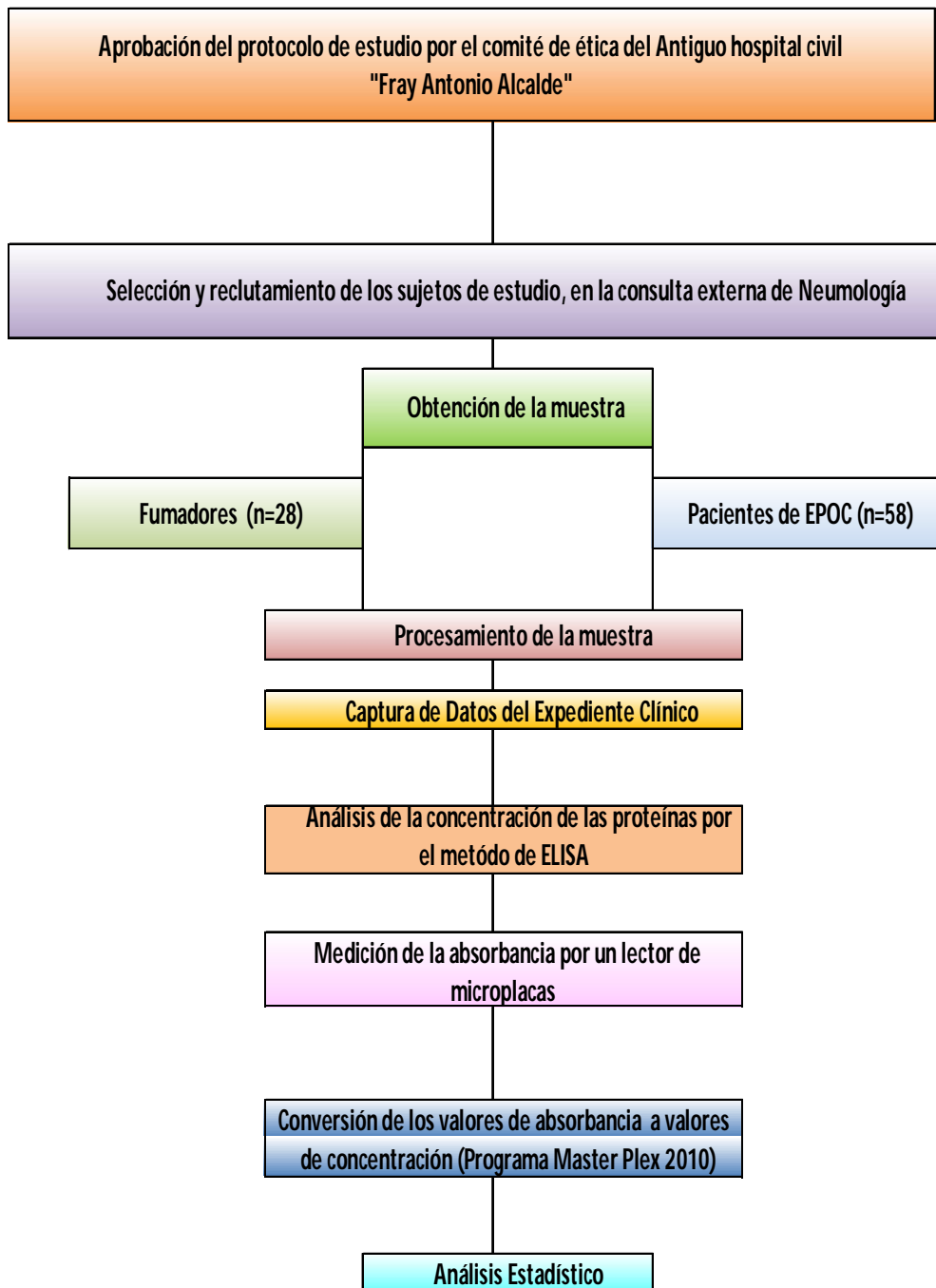


Figura 6. Método General

La metodología empleada para el desarrollo de la tesis comprende:

7.1 Diseño del estudio

Estudio prospectivo de casos y controles (Hernández y cols. 2000), llevado a cabo en el Área de Neumología en el Servicio de Consulta Externa de Fisiología Pulmonar del Antiguo Hospital Civil de Guadalajara "Fray Antonio Alcalde", hospital de carácter público que ofrece servicios de atención médica a población abierta, así como de la Consulta Externa del Servicio de Neumología del Hospital General de Zona Clínica 46, del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS).

7.2 Diseño de los grupos de estudio

Se seleccionaron a 58 de 105 pacientes con diagnóstico de EPOC con los siguientes criterios de inclusión: pacientes mexicanos, edad y sexo indistintos con diagnóstico de EPOC confirmado por espirometría reciente o realizado dentro de los dos años previos a la toma de la muestra. Se consideró correcto el diagnóstico de EPOC cuando se confirmó, en la espirometría forzada, una obstrucción al flujo aéreo, con una relación entre el volumen espiratorio forzado en el primer segundo (*FEV1*) y la capacidad vital forzada (*FVC*) menor del 70%, y un valor de *FEV1* inferior al 80% de su valor de referencia, posterior a la aplicación de un broncodilatador (salbutamol) vía inhalada, utilizando para la prueba un espirómetro portátil, EasyOne; DDN Medical Technologies, Chelmsford, MA, EE.UU. La severidad de la enfermedad se estableció de acuerdo al consenso de la Iniciativa Global para la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (GOLD, 2009). Los criterios de no inclusión fueron: historia de asma, lesiones pulmonares residuales o bronquiectasias evidentes en radiografía simple de tórax, presencia de otra enfermedad sistémica inflamatoria aguda o crónica asociada, agudización de la enfermedad de base durante la toma de la muestra. Así como a aquellos pacientes

con diagnóstico dudoso o no documentado, con resultados de laboratorio o historia clínica incompleta.

Para efectos de comparación se formó un grupo control para el cual se incluyó a 28 sujetos fumadores, a los cuales se les aplicó un cuestionario referente a su estado de salud, antecedentes patológicos, tiempo que llevan fumando, entre otros, con el fin de concentrar la información relevante de cada uno en su expediente respectivo.

7.3 Intervenciones

A cada paciente se le aplicó un cuestionario y se realizó el análisis de los historiales clínicos, donde se recabaron los siguientes datos: edad, sexo, hábito tabáquico, exposición a otros tóxicos y/o factores de riesgo, comorbilidad (presencia de uno o más trastornos o enfermedades, además de la enfermedad o trastorno primario), pruebas de laboratorio, radiografías de tórax, tomografías, tiempo de diagnóstico, número de ingresos por exacerbaciones y tratamiento farmacológico relacionado con la EPOC. Se registraron así mismo los resultados de las pruebas de función pulmonar y se estratificó a los pacientes de acuerdo con los 4 grados de gravedad recogidos en la guía GOLD 2009.

Los pacientes se incluyeron de forma consecutiva según el orden de ingreso al servicio de consulta externa de los hospitales anteriormente mencionados, durante el periodo comprendido entre septiembre de 2009 y febrero de 2011.

7.4 Consideraciones éticas

El estudio fue aprobado por el comité de ética correspondiente y todos los pacientes firmaron una carta de consentimiento informado para participar en el mismo (Anexo 1).

Las muestras recolectadas e información clínica de cada paciente fueron etiquetadas con identificadores únicos para proteger la confidencialidad de los participantes.

7.5 Definiciones

La severidad de la EPOC fue establecida con base en los valores de *FEV1* y *CVF*. Las exacerbaciones de EPOC fueron definidas como un cuadro clínico que ocurre en el paciente con diagnóstico previo de EPOC caracterizado por aumento de la tos, disnea o secreciones respiratorias y que requiere un cambio en el tratamiento del paciente (Patel y cols. 2010).

El índice tabáquico fue cuantificado considerando el número de paquetes/año, calculado con la fórmula: número de cigarrillos fumados por día x número de años que se lleva fumando/20.

7.6 Obtención de la muestra

De cada sujeto de estudio se recolectaron diez ml de sangre periférica, obtenida de la vena antecubital, utilizando tubos separadores de suero (BD Vacutainer®, Franklin Lakes NJ USA). Estas muestras se procesaron inmediatamente sometiéndolas a centrifugación a una velocidad de 3000 rpm, a temperatura ambiente, durante 10 min. El suero separado se alicuotó y se almacenó a -70°C para su posterior análisis.

7.7 Cuantificación de las proteínas biomarcadoras en suero

Se realizó la cuantificación de 15 proteínas circulantes en los dos diferentes grupos de estudio: pacientes con EPOC (casos) y sujetos fumadores (controles), mediante la técnica de inmuno ensayo enzimático tipo sándwich (ELISA), utilizando kits comerciales (Anexo 2). Cada proteína fue cuantificada siguiendo las instrucciones del protocolo de cada kit. Se realizaron diluciones de las muestras sólo para las proteínas que así lo indicaba el kit. La absorbancia especificada en el protocolo de cada kit se midió en un espectrofotómetro de microplaca (Bio-Rad Laboratories, Filadelfia, PA).

Las concentraciones de las proteínas fueron calculadas utilizando el software Master Plex 2010.

7.7.1 Principio general de la técnica de ELISA

El ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) se basa en la detección de un antígeno, teniendo previamente adherido un anticuerpo a una superficie. Tras la formación del complejo antígeno-anticuerpo se agrega una enzima, la cual se adhiere al complejo, y ésta al reconocer a su sustrato produce un color observable que puede cuantificarse mediante un espectrofotómetro (Moreno, 2008).

Existen dos tipos de ELISA, el directo y el indirecto; el primero ayuda a detectar la presencia de antígeno, mientras que el segundo es empleado para la detección de anticuerpos. Se emplearon ELISAS directos para cuantificar la concentración de antígeno, utilizando dos variantes, ELISA competitivo y no competitivo.

Un ELISA no competitivo hace reaccionar la muestra que contiene el antígeno, con el anticuerpo que está previamente adherido a una superficie; posteriormente dicha reacción se enfrenta a un segundo anticuerpo unido a una enzima. Una vez terminada la reacción se añade el sustrato de la enzima, desarrollándose un color que es cuantificable y es proporcional a la concentración de la muestra.

En un ELISA competitivo, el antígeno de la muestra va a competir con el conjugado (antígeno biotinilado), por un número limitado de sitios del anticuerpo, previamente adherido a la superficie. Al añadir el sustrato, éste será reconocido por la enzima y se desarrollará color. En este tipo de ensayo habrá ausencia de color en una muestra positiva debido a que el sustrato no encontrará a la enzima porque el conjugado ha sido desplazado por el antígeno presente en la muestra.

A manera de ejemplo se presentan a continuación dos protocolos: el primero de ellos empleado para determinar la concentración del biomarcador HPT mediante un kit de ELISA competitivo y el segundo para determinar la concentración del biomarcador MMP-9 con un ELISA no competitivo.

Desarrollo de un ELISA competitivo

1. Añadir 25 μ l del estándar y/o 25 μ l de muestra a cada pozo pretratado con un anticuerpo policlonal específico contra HPT, e inmediatamente añadir 25 μ l de la HPT biotinilada a cada pozo. Mantener en agitación suave e incubar durante 60 min.
2. Lavar 5 veces cada pozo con 200 μ l de buffer de lavado.
3. Añadir 50 μ l del conjugado estreptavidina-peroxidasa a cada pozo e incubar durante 30 min.
4. Lavar como se indica en el paso número 2.
5. Añadir 50 μ l de cromógeno-sustrato (tetrametilbenzidina-peróxido de hidrógeno) a cada pozo e incubar durante 10 min en agitación suave o hasta que se desarrolle la densidad óptima del color azul.
6. Añadir 50 μ l de la solución de paro (ácido clorhídrico 0.5N) a cada pozo. El color cambiará de azul a amarillo.
7. Leer la densidad óptica a una longitud de onda de 450nm inmediatamente después de agregar la solución de paro.

Desarrollo de un ELISA no competitivo

1. Añadir 100 μ l del diluyente RD1-34 (buffer a base de proteína con agentes conservadores) a cada pozo pre-tratado con un anticuerpo monoclonal específico contra MMP9.
2. Añadir 100 μ l de estándar y/o 100 μ l de muestra a cada pozo e incubar durante 2 horas en agitación constante a 500 \pm 50 rpm.
3. Lavar 5 veces cada pozo con 200 μ l de buffer de lavado.
4. Añadir 200 μ l del conjugado enzimático de MMP-9 (anticuerpo policlonal contra MMP9 marcado con peroxidasa) a cada pozo e incubar durante 1 hora con agitación constante.
5. Lavar como se indica en el paso número 3.
6. Añadir 200 μ l de solución cromógeno sustrato (tetrametilbenzidina-peróxido de hidrógeno) a cada pozo e incubar durante 30 min protegiendo de la luz.
7. Añadir 50 μ l de la solución de paro (ácido sulfúrico 2N) a cada pozo. El color cambiará de azul a amarillo.
8. Leer la densidad óptica a una longitud de onda de 450nm inmediatamente después de agregar la solución de paro.

7.8 Cálculo de la concentración

Los valores de absorbancia fueron convertidos a valores de concentración, a partir de la media de la absorbancia de los duplicados de cada muestra, después de restar los valores de absorbancia del pozo con concentración 0.

Las proteínas recombinantes de origen humano MMP1, MMP9, uPA, TF, AAT, HPT, CA125, CEA, Cyfra 21-1, NSE, APO-AI, RBP, CRP, YKL-40 y TGFB1, fueron usadas como estándares para cada prueba. La curva estándar se preparó simultáneamente con la medición de las muestras.

Para la determinación de la concentración se utilizó el programa MasterPlex ReaderFit 101™ que es capaz de generar una regresión logística de cinco parámetros. En el caso de las muestras que se diluyeron para el análisis, se consideró el factor de dilución para realizar el cálculo de la concentración.

7.9 Análisis estadístico

Cumplimiento de supuestos estadísticos

Los datos de concentración de cada proteína biomarcadora se sometieron a un análisis exploratorio con la finalidad de evaluar la distribución de estos, y comprobar los supuestos estadísticos: de normalidad con la prueba de Shapiro-Wilks, y homogeneidad de varianzas con la prueba de Bartlett. Los datos con un valor de $p < 0.05$ no cumplen con el supuesto de normalidad y el supuesto de homogeneidad de varianzas.

Una vez que se determinó que los datos no tenían una distribución de probabilidad normal, éstos se analizaron con una prueba no paramétrica (*distribution free*), en donde los análisis estadísticos se derivaron a partir de procedimientos de ordenación y recuento, utilizando como parámetro de centralización la mediana.

Comparación de grupos

Con el fin de determinar qué proteínas son significativamente diferentes, con respecto a su concentración, se realizó una comparación entre los grupos incluidos en el estudio:

Grupo de estudio: Casos. Grupo conformado por 58 pacientes con EPOC, los cuales fueron diagnosticados por espirometría, con niveles de FEV1/FVC <70%.

Grupo Control: este grupo estuvo integrado por 28 fumadores activos (que no tuvieran o presentaran antecedentes de alguna enfermedad pulmonar y/o infección de cualquier tipo durante el estudio).

Los datos de concentración fueron analizados con la prueba U de Mann-Whitney en el caso que se incluyeran dos poblaciones y la prueba de Kruskal-Wallis en el caso que se incluyeran más de dos poblaciones, ambas pruebas son para muestras independientes y comparan la mediana.

Así mismo, se analizaron los datos de concentración de cada proteína biomarcadora en el grupo de EPOC, tomando en cuenta las siguientes variables: Comorbilidad (presencia, ausencia), Nódulo Pulmonar Solitario (NPS) (presencia, ausencia), índice tabáquico, grado de obstrucción, tratamiento, sexo y edad.

Para todos los análisis se establecieron las siguientes hipótesis: **nula** que la mediana de las dos poblaciones son iguales y **alterna** que la mediana de la población 1 sea mayor (menor ó distinta) de la mediana de la población 2. Un valor de $p < 0.05$ fue considerado significativo. El análisis estadístico se realizó con el paquete estadístico SigmaStat versión 8.0[®].

8. RESULTADOS

8.1 Datos de la población en estudio

De acuerdo con los criterios de inclusión y no inclusión, se incluyeron 86 sujetos para este estudio, con los cuales se formaron dos grupos, el primero conformado por 58 pacientes diagnosticados con EPOC (40 hombres, 18 mujeres), con un $FEV1/FVC < 70\%$, edad media de 66 ± 10.5 años, antecedentes de tabaquismo en un 90% de los pacientes y un promedio de consumo de 31.2 ± 28 paq/año. Del 10% restante, un 7% estuvo expuesto a humo de leña y un 3% estuvo expuesto a humo de leña y tabaquismo pasivo (Fig. 7).

El segundo grupo estuvo conformado por 28 fumadores (18 hombres, 10 mujeres), con parámetros normales en la prueba de espirometría con un $FEV1/FVC > 70\%$, una edad media de 47 ± 16.1 años y un índice tabáquico de 18.7 ± 16 paq/año.

En la tabla 2, se resume la información clínica de los pacientes con EPOC y fumadores incluidos en este estudio.

Tabla 2. Datos clínicos y Demográficos de pacientes con EPOC y Fumadores.

	Pacientes con EPOC	Fumadores
No. Sujetos	58	28
H/M	40/18	18/10
Edad, años	66±10.5	47.8±16.1
Tabaquismo paq/año	31.2±28	18.7±16
FEV1/FVC % (post-broncodilatador)	<70%	>70%
Tabaquismo Activo	52	28
Exposición Humo de Leña	4	
Tabaquismo pasivo + humo de leña	2	
Grado de obstrucción		
Leve	10	
Moderada	9	
Grave	12	
Muy Grave	1	
Sin Clasificar	26	

M/H= Mujeres/Hombres; los valores representan la media de cada grupo ± la desviación estándar

Se sabe que la exposición acumulada al humo de cigarrillo es el factor responsable de la EPOC en un 90% de los casos, además la exposición laboral y la contaminación ambiental también juegan un papel que interactúa con la predisposición genética a desarrollar la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica. Esto puede explicar las situaciones en donde las personas desarrollaron EPOC siendo fumadores pasivos o estando expuestos solamente al humo de leña.

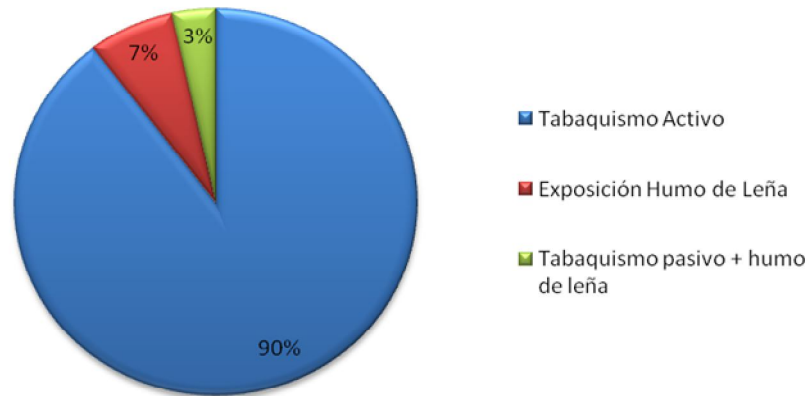


Figura 7. Distribución de la exposición diferencial a tóxicos en pacientes con EPOC.

Los datos de clasificación del grado de obstrucción para el grupo de EPOC muestran un 17% (10 pacientes) con estadio leve, un 15% (9 pacientes) con estadio moderado, 21% (12 pacientes) con estadio grave, un 2% (1 paciente) con estadio muy grave (este nivel fue dado de acuerdo a los análisis de espirometría y a la clasificación de la gravedad según la guía GOLD, 2009). Para un 45% (26) de los pacientes con EPOC no se disponía de una espirometría previa que permitiera confirmar el diagnóstico y establecer la gravedad de la enfermedad. Los datos encontrados en los expedientes clínicos solo mencionaban la presencia de obstrucción y por consiguiente el diagnóstico de la enfermedad establecido como EPOC no específica, diagnóstico basado en técnicas como: radiografías, gasometría, tomografía u otras, avaladas solamente como apoyo para el diagnóstico de la enfermedad (Tabla 2). La figura 8, muestra la distribución de los pacientes según el grado de *VEF1*.

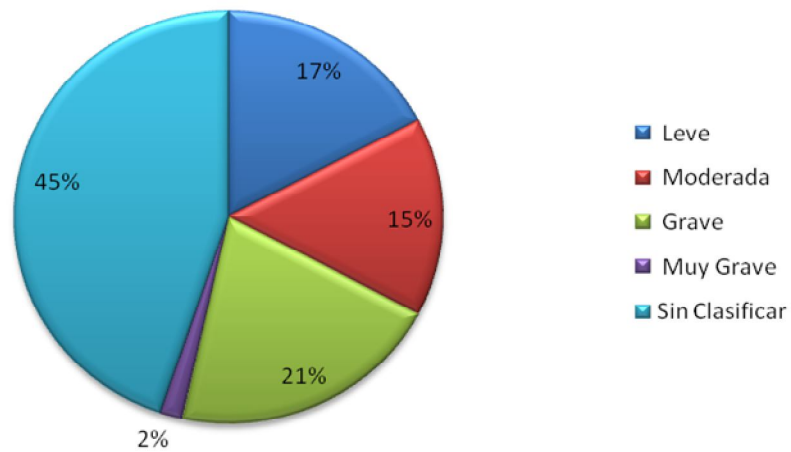


Figura 8. Distribución de pacientes, según el grado de VEF 1.

Se sabe que los pacientes con EPOC presentan con frecuencia otras enfermedades crónicas (comorbilidades) que contribuyen a empeorar su situación clínica y su pronóstico. La inflamación sistémica puede ser un elemento patogénico importante. El 54% (31) de los pacientes presentaron EPOC como única enfermedad crónica mientras que un 46% (27) de los pacientes con EPOC presentaron alguna comorbilidad.

Entre las comorbilidades asociadas destacaron las siguientes: hipertensión arterial (HA) en un 24% (14) de los pacientes con EPOC, Diabetes mellitus tipo II en un 5% (3 pacientes), cardiopatía en un 10% (6 pacientes) y neoplasias en un 7% (4 pacientes) (Fig. 9), (Tabla 3).

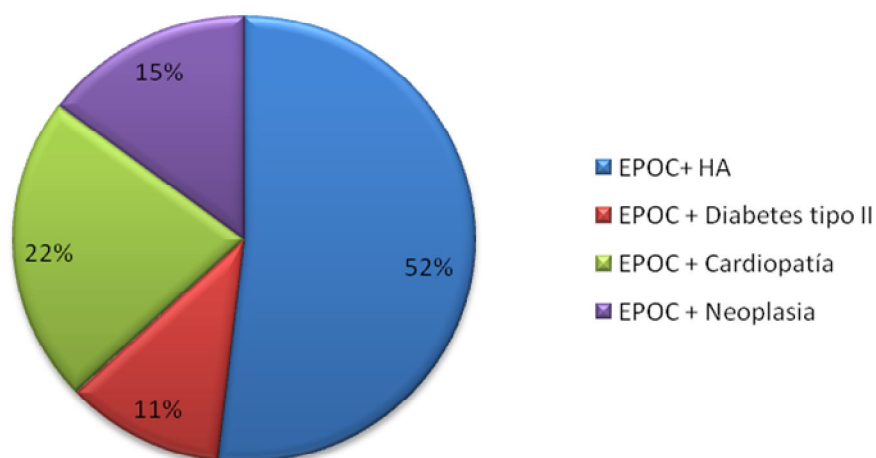


Figura 9. Distribución de pacientes con EPOC, según el tipo de comorbilidad asociada.

En 12 pacientes con EPOC, se detectó la presencia de nódulo pulmonar solitario (NPS), por medio de la TAC, la cual es una técnica habitual para identificar calcificaciones no visibles en las radiografías simples de tórax (Tabla 3).

La presencia de un nódulo pulmonar solitario (NPS), condiciona datos importantes para el análisis y seguimiento de los pacientes con EPOC, en busca de nódulos malignos. Un NPS estable durante dos años (con bordes lisos y menor a 3 cm) puede considerarse como nódulo pulmonar calcificado benigno.

El tratamiento que con mayor frecuencia fue administrado a los pacientes con EPOC, sin tomar en cuenta el grado de obstrucción de cada paciente y tomando en cuenta los síntomas clínicos, fue la combinación de broncodilatadores de vida larga y corta + corticoides inhalados (Tabla 3).

Tabla 3. Datos clínicos de pacientes con EPOC

Comorbilidad		27
	Hipertensión Arterial	14
	Diabetes Tipo II	3
	Cardiopatía	6
	Neoplasias	4
Presencia de Nódulos		12
Tratamiento		
	1	2
	2	2
	3	1
	4	33
	5	6
	6	2
	7	3
	ST	9

Tratamientos

1= Corticoides inhalados.

2= Corticoides inhalados+ Broncodilatadores de vida larga.

3= Broncodilatadores de vida larga.

4= Broncodilatadores de vida larga y corta + corticoides inhalados.

5= Broncodilatadores de vida corta.

6= Broncodilatadores de vida corta y Corticoides inhalados.

7= Broncodilatadores de vida corta + broncodilatadores de vida larga.

Para el estudio se eligieron 15 proteínas que han sido reportadas en distintos trabajos de investigación asociadas a: Inflamación, remodelación de tejido y tumor (cáncer). Existe poca información sobre estas proteínas en pacientes con EPOC (Anexo 2).

8.2 Cuantificación de las proteínas en suero

Se determinó la concentración de 15 proteínas en los sueros de pacientes con EPOC y en los individuos control, utilizando el método de ELISA. Por su participación en algunos procesos celulares, éstas pudieran clasificarse como inflamatorias (APOA- AI, CRP, YKL-40, HT, Upa, RBP, TF), de remodelación de tejido (MMP-1, MMP-9, Alfa 1-AT), y asociadas a tumor (CA-125, CEA, CYFRA, NSE, TGFB 1). Se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) en las concentraciones de las proteínas APO-AI, TGFB 1, CEA, NSE y YKL-40, entre los grupos de estudio (Tabla 4). Dichas proteínas se encontraron más elevadas en las muestras de los sueros de pacientes con EPOC. La distribución de estas proteínas se muestra en la figura 10.

Las proteínas HT, Upa, RBP, TF, MMP-1, MMP-9, Alfa 1-A, CA-125, CYFRA, no fueron estadísticamente diferentes respecto a su concentración en pacientes con EPOC y fumadores control (Tabla 4).

Tabla 4. Concentración de proteínas inflamatorias, de remodelación de tejido y asociadas a tumor en pacientes con EPOC y fumadores control.

Proteínas	Cohorte Completa		p-valor
	EPOC (n=58) Mediana (Mín-Max)	Fumadores (n=28) Mediana (Mín-Max)	
APO-AI ug/ml	9094.77 (1553.88-22801.30)	5295.78 (1108.73-9481.02)	<0.001
CRP ng/ml	8487.64 (0.0-88900.00)	4410.12 (0.0-23434.50)	0.07
YKL-40 ng/ml	241.52 (74.71-793.29)	107.44 (33.38-965.47)	<0.001
HT ug/ml	2290.3 (0.0-12423.10)	2684.20 (555.47-6053.18)	0.64
uPA ng/ml	1.64 (0.0-96.51)	1.28 (0.01-30.09)	0.76
MMP-1 ng/ml	19.70 (2.50-34.85)	15.58 (0.89-33.95)	0.09
MMP-9 ng/ml	536.02 (170.81-1729.53)	563.30 (260.88-1409.67)	0.58
Alfa 1- Antitripsina ug/ml	1271.2 (335.83-4310.40)	952.261 (360.65-2480.08)	0.55
CA-125 U/ml	4.06 (0.02-296.57)	4.85 (0.02-23.56)	0.26
CEA ng/ml	1.56 (0.0-31.27)	1.11 (0.0-5.28)	<0.001
CYFRA ng/ml	0.2 (0.0-12423.10)	0.94 (0.0-11.81)	0.14
NSE ng/ml	15.50 (3.91-93.99)	8.44 (3.94-32.60)	<0.001
RBP ug/ml	270.12 (547.0-350.24)	33.10 (20.53-366.16)	0.67
TF ug/ml	3603.8 (547.0-32897.4)	5050.07 (976.2-13870.3)	0.98
TGFβ 1 pg/ml	24347.9(11325-37116.9)	22320.7 (13,360-32130.1)	<0.001

Rango mínimo, Rango máximo, se consideró un valor de $p < 0.05$, a un nivel de confianza del 95%

*Las proteínas sombreadas con color naranja, indican diferencia significativa en su concentración, en individuos con EPOC y fumadores.

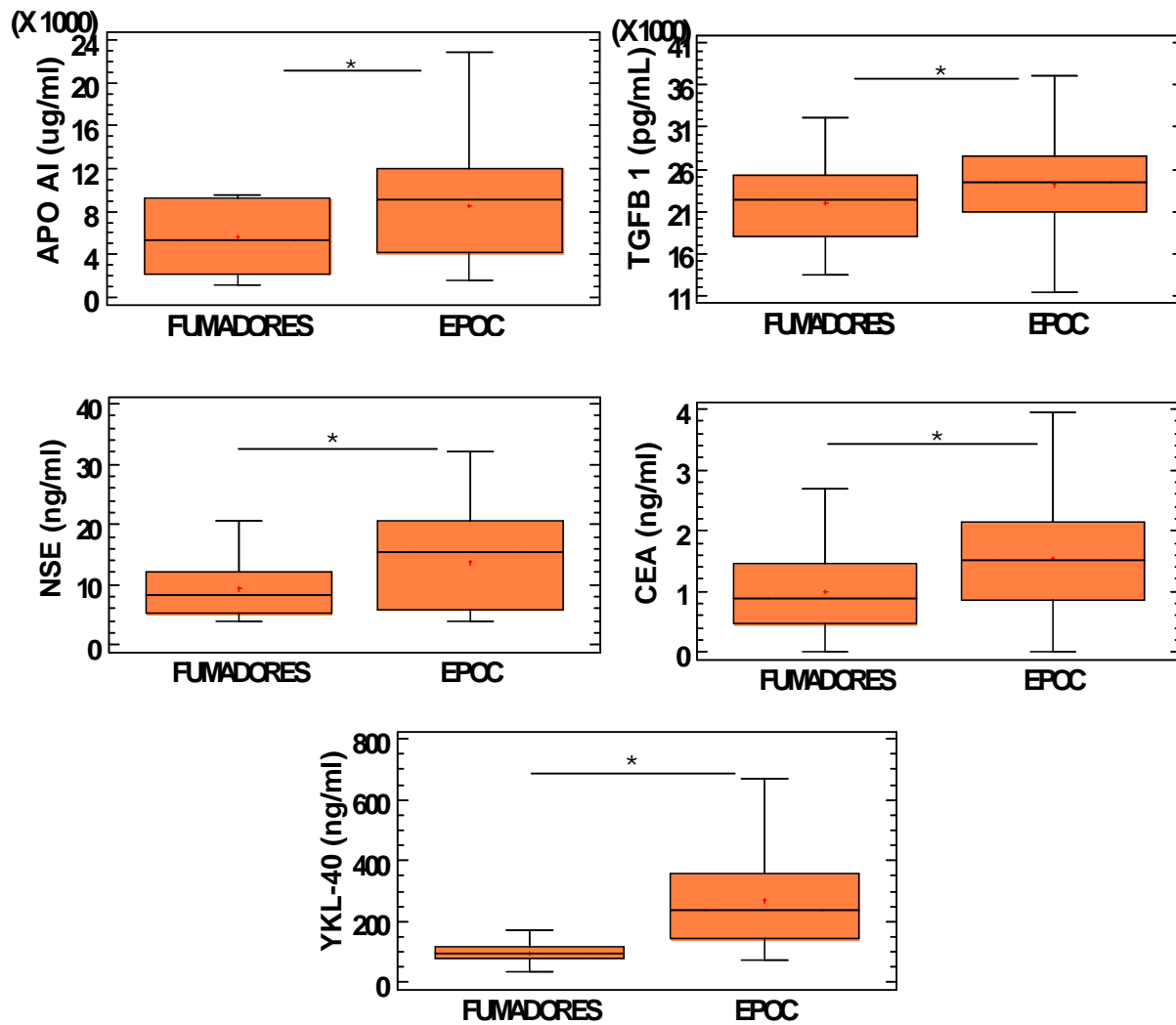


Figura 10. Distribución de la concentración de las proteínas **APO-AI, TGFB 1, NSE, CEA y YKL-40**, en fumadores y pacientes con EPOC. Las concentraciones en suero de las 5 proteínas fueron más elevadas en pacientes con EPOC, presentando una diferencia estadísticamente significativa con un valor de $*p < 0.05$.

El incremento en la concentración de las proteínas APO-A1, TGFB 1, NSE, CEA y YKL-40 en las muestras de suero de los pacientes con EPOC, con respecto al grupo control, sugiere que éstas pudieran jugar un papel importante en el progreso de la enfermedad. Para estudiar más a fondo a los pacientes con EPOC, se realizó un análisis intra grupo, para establecer posibles relaciones entre la concentración de las proteínas y algunos parámetros clínicos y demográficos de los pacientes, tales como: **Comorbilidad (presencia, ausencia), NPS (presencia, ausencia), grado de obstrucción (LEVE, MODERADA, GRAVE, MUY GRAVE), índice tabáquico (½ - 20), (21 - 40), (41 - +100) paq/año, tratamiento, sexo y edad.**

En el primer análisis se comparó la concentración de las 15 proteínas en 27 pacientes con EPOC que presentaron alguna comorbilidad, versus 31 pacientes con EPOC sin comorbilidad. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones de las proteínas entre los dos grupos, excepto la proteína C reactiva (CRP), la cual se observó incrementada en los pacientes con EPOC, con comorbilidad (Tabla 5) (Fig. 11).

Tabla 5. Diferencias significativas en la concentración de proteínas, considerando la variable, comorbilidad presencia/ausencia en pacientes con EPOC

Proteínas	pEc vs EPOC
	<i>p- valor</i>
APO-AI (ug/ml)	0,58
CRP (ng/ml)	<0.001
YKL-40 (ng/ml)	0,22
HT (ug/ml)	0,89
uPA (ng/ml)	0,51
RBP ug/ml	0,57
TF ug/ml	0,87
MMP-1 (ng/ml)	0,29
MMP-9 (ng/ml)	0,08
Alfa 1- A (ug/ml)	0,8
CA-125 (U/ml)	0,89
CEA (ng/ml)	0,75
CYFRA (ng/ml)	0,14
TGF B 1 (pg/ml)	0,22
NSE (ng/ml)	0,99

Considerando un nivel de confianza del 95%

pEc= Pacientes con EPOC y comorbilidad

*La proteína sombreada con color naranja, indica diferencia significativa en su concentración.

La barra horizontal representa la mediana, (+) representa la media, los bigotes representan el 1^{er} y 4^{to} cuartil, la caja representa el 50% de la población (segundo y tercer cuartil) en estudio. Se excluyeron los valores extremos (outliers).

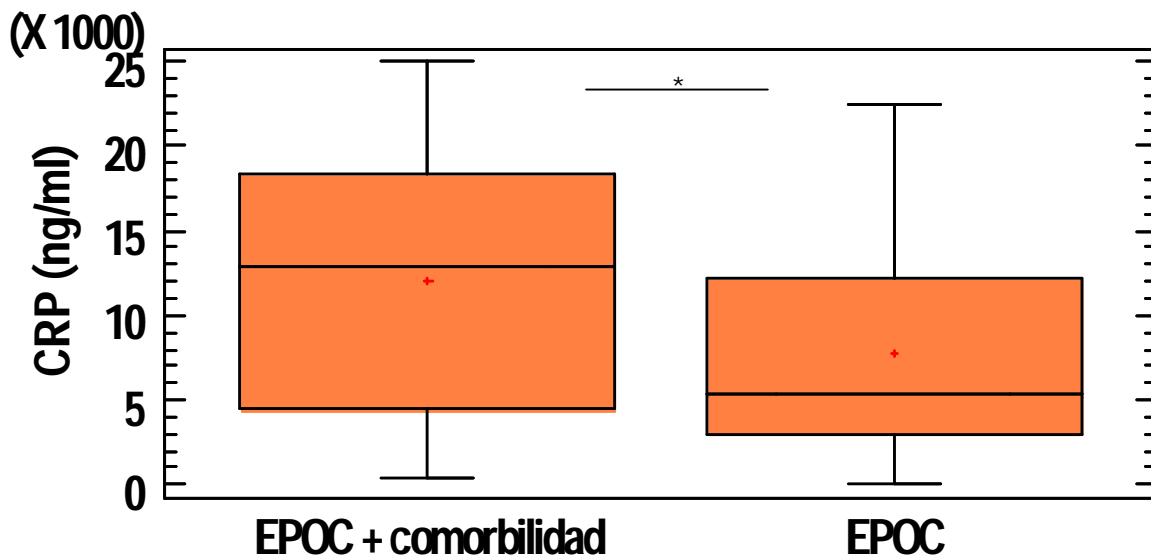


Figura 11. Distribución de la proteína C reactiva (CRP) en pacientes con EPOC en presencia o ausencia de comorbilidad.

La barra horizontal representa la mediana, los bigotes representan el 1er y 4to cuartil, la caja representa el 50% de la población en estudio.

Se excluyeron los valores extremos (outliers). * $p < 0.05$.

Enseguida se comparó la concentración de cada proteína en pacientes con EPOC con presencia o ausencia de nódulo pulmonar solitario (NPS). Como resultado se encontró un incremento en la proteína RBP, así como una disminución en la proteína TF en el grupo de pacientes con presencia de NPS (Tabla 6). El resto de las proteínas no presentó cambios significativos entre los grupos.

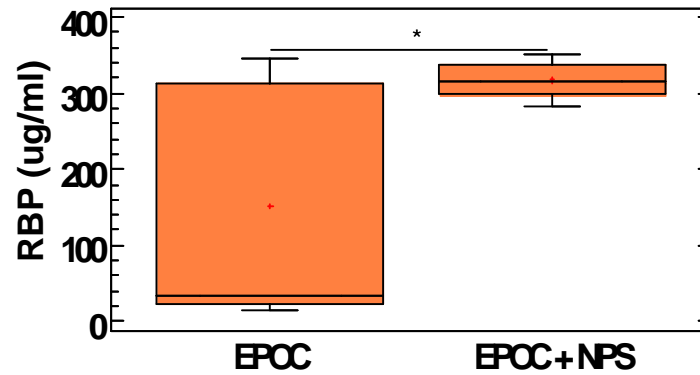
Tabla 6. Diferencias significativas en la concentración de proteínas, en pacientes con EPOC considerando la variable, presencia/ausencia de Nódulo Pulmonar Solitario (NPS).

Proteínas	<i>p</i> - valor
APO-AI <i>ug/ml</i>	0,18
CRP <i>ng/ml</i>	0,51
YKL-40 <i>ng/ml</i>	0,94
HT <i>ug/ml</i>	0,39
uPA <i>ng/ml</i>	0,81
RBP <i>ug/ml</i>	<0.001
TF <i>ug/ml</i>	<0.001
MMP-1 <i>ng/ml</i>	0,11
MMP-9 <i>ng/ml</i>	0,24
Alfa 1- Antitripsina <i>ug/ml</i>	0,18
CA-125 <i>U/ml</i>	0,14
CEA <i>ng/ml</i>	0,63
CYFRA <i>ng/ml</i>	0,24
NSE <i>ng/ml</i>	0,2
TGFB 1 <i>pg/ml</i>	0,14

Considerando un valor de $p < 0.05$

*Las proteínas sombreadas con color naranja, indican diferencia significativa en su concentración.

A



B

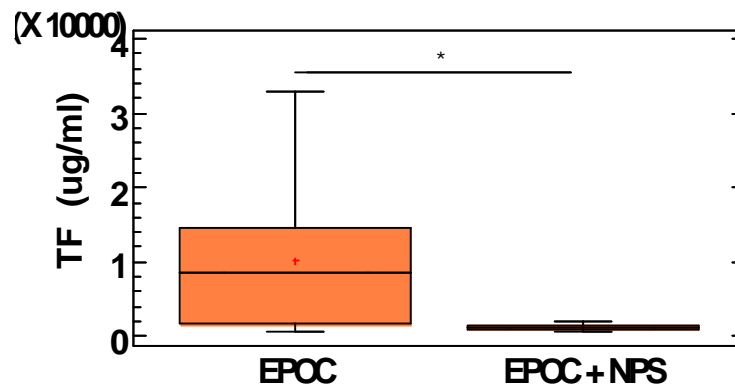


Figura 12. Distribución de la concentración de la proteína de unión a retinol (RBP; A) y de la proteína transferrina (TF; B) en pacientes con EPOC con presencia o ausencia de nódulo pulmonar solitario (NPS).

La barra horizontal representa la mediana, (+) representa la media, los bigotes representan el 1er y 4to cuartil, la caja representa el 50% (segundo y tercer cuartil) de la población en estudio. Se excluyeron los valores extremos (outliers). * $p < 0.05$.

Por último se comparó la concentración de cada proteína en los subgrupos formados en los pacientes con EPOC, considerando las siguientes variables: índice tabáquico ($\frac{1}{2}$ - 20), (21 - 40) y (41 a +100) paquetes/año, grado de obstrucción (LEVE, MODERADO, GRAVE, MUY GRAVE), tratamiento (7 variantes), sexo y edad (40-60, 61-90 años). Se encontró que las proteínas no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos comparados (Tabla 7).

Tabla 7. Comparación de la concentración de proteínas en los subgrupos de EPOC, con respecto a variables clínicas y demográficas de los pacientes

<i>p-valor</i>						
Proteínas	Índice Tabáquico	Grado de Obstrucción	Tratamiento	Sexo	Edad	
APO-AI ug/ml	0,29	0,05	0,32	0,22	0,12	
CRP ng/ml	0,61	0,49	0,83	0,17	0,2	
YKL-40 ng/ml	0,73	0,05	0,33	0,54	0,41	
HT ug/ml	0,2	0,43	0,25	0,49	0,28	
uPA ng/ml	0,07	0,68	0,82	0,19	0,67	
RBP ug/ml	0,78	0,98	0,12	0,32	0,07	
TF ug/ml	0,78	0,26	0,5	0,28	0,43	
MMP-1 ng/ml	0,51	0,22	0,35	0,08	0,69	
MMP-9 ng/ml	0,05	0,59	0,42	0,16	0,11	
Alfa 1- A ug/ml	0,05	0,72	0,9	0,29	0,09	
CA-125 U/ml	0,53	0,15	0,6	0,48	0,52	
CEA ng/ml	0,19	0,52	0,3	0,07	0,07	
CYFRA ng/ml	0,91	0,45	0,24	0,08	0,89	
NSE ng/ml	0,89	0,64	0,06	0,08	0,41	
TGF β1 pg/ml	0,44	0,23	0,51	0,22	0,11	

Considerando un valor de $p < 0.05$

9. DISCUSIÓN

En la presente investigación se trabajó con una población compuesta por 58 pacientes con EPOC, con predominio del sexo masculino, con un antecedente de tabaquismo en un 90%, siendo este el principal factor de riesgo desencadenante de la enfermedad. Un porcentaje más bajo (10%) correspondió a pacientes con EPOC que estuvieron expuestos al tabaquismo pasivo y a la exposición de humo de leña, como factores de riesgo partícipes para adquirir la enfermedad (Fig. 7). Estos datos no son diferentes a los mencionados en la literatura, puesto que se evidencia que la exposición acumulada al humo del cigarrillo es la responsable de la EPOC en un 90% de los casos, y que la exposición laboral y la contaminación ambiental también juegan un papel que interactúa con la predisposición genética a desarrollar la enfermedad (Barnes, 2000).

Durante la organización I de la información clínica de los pacientes, destaca que al momento de clasificar el grado de severidad de la enfermedad, de acuerdo al consenso de la Iniciativa Global para la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (GOLD, 2009), se obtuvo una población de pacientes con EPOC principalmente en estadio III (grave), (Fig. 8). Cabe mencionar que a un 45% de los pacientes con EPOC no se les había practicado una espirometría y fueron diagnosticados por otras técnicas tales como: radiografía, gasometría, síntomas clínicos etc. Esto pudiera representar una posible causa del subdiagnóstico observado en la enfermedad, debido a la escasa utilización de la espirometría en atención primaria (AP) y en la unidad de especialidad de Neumología.

Nuestros resultados concuerdan con otros estudios realizados en AP relacionados con el uso de la espirometría para la detección y seguimiento de la EPOC en fumadores de alto riesgo, donde se menciona que el uso del espirómetro e interpretación de la espirometría continúa siendo mínimamente utilizado, aun a sabiendas de que la espirometría es un procedimiento esencial para el diagnóstico y tratamiento de las enfermedades respiratorias crónicas (Naberan y cols. 2006). Estos datos indican que a pesar de las insistentes campañas en donde últimamente se ha difundido su uso en el primer nivel asistencial, éste continúa siendo poco utilizado y no ha aumentado.

Otro hallazgo destacable en cuanto a los resultados de la información clínica de los pacientes con EPOC, es la presencia de comorbilidad en 46% de éstos, la cual fue mayoritariamente hipertensión arterial (HTA), seguida por cardiopatía, neoplasia y Diabetes mellitus tipo II (Tabla 3) (Fig.9). Estas comorbilidades concuerdan con ser las más frecuentes en estudios de comorbilidad en la EPOC (Soriano y cols. 2005), en las que el mecanismo de la inflamación sistémica, y sus mediadores, desempeñan un papel importante en la patogenia (Soriano y cols. 2005).

En este sentido, se sabe que la EPOC es una enfermedad crónica y progresiva que, en su evolución, presenta frecuentes exacerbaciones, las cuales son más graves cuanto mayor y más compleja es la comorbilidad asociada. Del mismo modo, que el diagnóstico temprano de la enfermedad podría suponer la utilización adecuada de las diferentes opciones terapéuticas y de esto va a depender que se acompañe o no de comorbilidad, lo que permitiría dar al paciente un incremento significativo en la calidad de vida y un aumento en la supervivencia (de Miguel y cols. 2005).

La presencia de comorbilidades en la EPOC, además de aumentar el coste anual (Escarrabill, 2003), es un factor predictor de mortalidad que contribuye a definir el pronóstico de estos pacientes. De hecho, las complicaciones cardiovasculares y el cáncer pulmonar son causas de mortalidad más prevalentes que la insuficiencia respiratoria que genera la EPOC (de Miguel y cols. 2005).

Por tanto, la presencia de comorbilidad en pacientes con EPOC constituye un elemento importante, objeto de diagnóstico y tratamiento, que modifica la mortalidad de éstos y, por tanto, influye en el pronóstico de la enfermedad.

En cuanto a la evaluación de la concentración de las 15 proteínas en el suero de pacientes con EPOC y fumadores, se observaron diferencias estadísticamente significativas en las proteínas APO AI, TGFB 1, NSE, CEA y YKL-40, mostrándose estas proteínas más elevadas en pacientes con EPOC que en fumadores (Tabla 4).

Las determinaciones de la proteína APO AI han sido utilizadas en la práctica clínica para medir estados nutricionales y evaluar el riesgo potencial de alguna enfermedad cardiovascular. Se sabe que la enfermedad cardiovascular es una de las principales causas de mortalidad en la EPOC, fundamentalmente, en pacientes con enfermedad en estadio leve a moderado (Sin y cols. 2005).

La EPOC aumenta de manera independiente el riesgo a desarrollar enfermedad cardiovascular, la cual puede desencadenar falla cardíaca y muerte. La arterioesclerosis, insuficiencia cardíaca, arritmias e infarto agudo de miocardio, son algunas de las comorbilidades que con mayor frecuencia se presentan en pacientes con EPOC (Curkendall y cols. 2006). Por tanto, se ha comprobado que padecer la EPOC aumenta de manera independiente el riesgo de mortalidad cardiovascular entre 3 y 4 veces (Curkendall y cols. 2006).

A pesar de la estrecha asociación existente entre estas dos enfermedades, las cuales tienen al hábito tabáquico como factor de riesgo común, no se conocen aún con exactitud los mecanismos patológicos que las relacionan.

Algunos estudios apoyan la hipótesis de que la reacción inflamatoria crónica vista en los pacientes con EPOC trasciende más allá de los pulmones y puede generar efectos sistémicos; dicha inflamación puede favorecer la concentración de varias citocinas proinflamatorias y proteínas de fase aguda. Las anomalías incluyen incremento en la concentración del TNF α , sus receptores (TNFR-55 y TNFR-75), IL-6, IL-8, fibrinógeno y CRP, mismas que se han relacionado con el desarrollo de diferentes complicaciones, entre ellas las enfermedades cardiovasculares (Verma y cols. 2003; Eid y cols. 2001; Nicholas y cols. 2010).

Nicholas y cols. (2010) han relacionado a la APO AI como parte de la defensa del sistema inmune innato, considerando una disminución de su concentración en esputo inducido de pacientes con EPOC, como una deficiencia en el sistema de defensa inmune innata, presentándose una mayor susceptibilidad a las exacerbaciones infecciosas en la EPOC.

Marquis y cols. (2002), postulan que la APO AI juega un papel anti inflamatorio y antioxidante, con la inhibición (o atenuación) de la oxidación de LDL y la inhibición de la producción de quimiocinas tales como: CCL2 (MCP-1) y CCL5, así como en la promoción de la estabilidad de la sintetasa de óxido nítrico endotelial (eNOS).

Bandow y cols. (2008), han encontrado niveles alterados en otros miembros de la familia de las apolipoproteínas, por ejemplo la APO E se ha visto incrementada en pacientes con EPOC. Este incremento ha sido relacionado con procesos inflamatorios.

Asociada a estos procesos de inflamación, se ha observado también una sobreexpresión de la proteína YKL-40 en biopsias bronquiales de pacientes con EPOC. Létuvé y cols. (2008), encontraron que la proteína YKL-40 se encuentra significativamente elevada en biopsias bronquiales de pacientes con EPOC a diferencia de fumadores sin EPOC, y lo relacionan con la inducción de la liberación de citocinas (IL-8, MCP-1, MIP-1 alfa), las cuales a su vez promueven la síntesis de MMP9 y estimulan a macrófagos alveolares, manteniendo la inflamación de los tejidos y por consiguiente su remodelación. Esta última pudiera provocar fibrosis pulmonar, la degradación del tejido alveolar y su destrucción, lo que llevaría a enfisema. En conclusión, YKL-40 puede contribuir a la inflamación de los tejidos y la remodelación por el mantenimiento de la síntesis de citocinas proinflamatorias, fibrinógenos y metaloproteinasas.

Los niveles séricos de YKL-40 se han asociado también al crecimiento anormal de células, por ejemplo, en fibrosis de hígado y varias neoplasias malignas. Dentro de éstas, se han encontrado niveles elevados de esta proteína en una amplia gama de cánceres como el de mama, colorrectal y de ovario. Además, estos niveles elevados se correlacionan con una menor supervivencia de los pacientes, lo que sugiere que los niveles séricos de YKL-40 podrían ser un biomarcador pronóstico. Sin embargo, la expresión en tejido de YKL-40 y su relación con los resultados clínicos y otros posibles marcadores son poco conocidos (Shao y cols. 2011).

En el proceso de remodelación, debido al crecimiento anómalo de células de origen mesenquimal, que ocasionan fibrosis y en consecuencia el engrosamiento de la pared y la reducción en el calibre visto en la EPOC, la proteína TGFB-1 podría tener un papel importante mediando la reparación de tipo fibrótica. Gorowiec y cols. (2012), argumentan que la TGFB-1 puede estimular el crecimiento de algunas células mesenquimales, después de analizar la expresión elevada del TGF- β 1 en muestras provenientes de lavado broncoalveolar.

Adicionalmente, en diversos estudios se han reportado alteraciones del TGF- β 1 y de sus receptores en muchos cánceres humanos (Su- Ping y cols. 2007; Li y cols. 2008).

Al igual que la proteína TGF- β 1, la proteína CEA no se considera un marcador específico de cáncer pulmonar, ya que sus concentraciones aumentan en diversas patologías benignas, como por ejemplo: en la cirrosis hepática, insuficiencia renal, así como en algunas patologías pulmonares, sobre todo en EPOC.

Se sabe que la inflamación de tipo crónica presente en la EPOC, influye en el constante daño al epitelio bronquial y su regeneración, factores que por consiguiente pueden influir en el proceso de carcinogénesis, debido al defecto de vaciado pulmonar (reducción del aclaramiento mucociliar), que se lleva a cabo en una mucosa previamente lesionada, que produce la retención de carcinógenos y la persistencia de los mismos en el moco (Petty 1996, 1997).

Sin embargo, cabe preguntarse si la relación entre estos procesos y la concentración incrementada de proteínas asociadas a tumor en suero de pacientes con EPOC, pudiera relacionarse con el desarrollo de cáncer pulmonar en los pacientes con EPOC. Si es así el cáncer pulmonar sería una complicación de la EPOC.

A este respecto, Song y cols. (2011), encontraron concentraciones séricas más elevadas de las proteínas antígeno de carcinoma de células escamosas (SCC), antígeno carcinoembrionario (CEA), Cyfra 21-1 y enolasa específica de neuronas (NSE), en pacientes con presencia de NPS malignos a diferencia de pacientes con NPS benignos, clasificados de acuerdo con exámenes post-operatorios e histológicos. Los autores concluyen que SCC, CEA, Cyfra 21-1 y NSE son proteínas valiosas cuando se analizan en conjunto (panel proteico), porque aumentan la

especificidad para el diagnóstico de cáncer pulmonar en pacientes con presencia de NPS sospechosos.

En nuestro estudio se encontraron diferencias significativas en las concentraciones de las proteínas APO AI, TGFB 1, NSE, CEA y YKL-40, entre los pacientes con EPOC y fumadores, sin embargo, se encontró también una alta frecuencia de comorbilidades en los pacientes con EPOC (Tabla 3), por lo que nos preguntamos si la concentración de las 15 proteínas cambiaba de acuerdo a la presencia o ausencia de comorbilidad en los pacientes con EPOC.

Después de evaluar las 15 proteínas en los sueros de los pacientes con EPOC, con presencia y ausencia de comorbilidad, los resultados no mostraron diferencias significativas con respecto a la concentración de las proteínas. Este hallazgo se considera importante porque se puede aseverar que la concentración de las proteínas APO AI, TGFB 1, NSE, CEA y YKL-40 no cambia con respecto a la presencia de comorbilidad, lo que sugiere que estos cambios son independientes de la misma (Tabla 5).

No obstante, en los pacientes con EPOC, con presencia de comorbilidad, la proteína CRP se encontró más elevada (Fig.11).

A pesar de que la CRP es uno de los marcadores más estudiados en el suero de pacientes con EPOC, no es considerada un biomarcador específico de la enfermedad. A pesar de esto, se ha observado que en la EPOC las concentraciones elevadas de CRP correlacionan con el grado de obstrucción de la vía aérea (Pinto-Plata y cols. 2006; de Torres y cols. 2006; Hurst y cols. 2006), y con las exacerbaciones. La concentración de CRP puede ser disminuida por efecto de los corticoides orales o inhalados (Sin y cols. 2004).

También ha sido demostrado que los niveles elevados de CRP se correlacionan positivamente con el grado de disnea y con la hipertensión pulmonar, así como con la calidad de vida referido a los aspectos sistémicos de la enfermedad, como son la capacidad al ejercicio y el índice de masa corporal (Pinto-Plata y cols. 2006; Joppa y cols. 2006).

El hecho de que esta proteína se encuentre más elevada en pacientes con EPOC con presencia de comorbilidad, pudiera deberse a que en estos pacientes existe una respuesta inflamatoria de tipo sistémico, que llevó a desarrollar la presencia de comorbilidad.

A pesar de las evidencias disponibles para postular a la CRP como un marcador sérico de la inflamación sistémica en la EPOC, se necesitan trabajos adicionales que confirmen esta hipótesis.

Un aspecto destacable es también la presencia de nódulo pulmonar solitario (NPS) en los pacientes con EPOC.

En el análisis de las 15 proteínas en pacientes con EPOC con presencia de NPS y pacientes con EPOC sin presencia de NPS, se encontró diferencias significativas respecto a la concentración de las proteínas TF y RBP (Tabla 7), así como también un incremento en los niveles de concentración de la RBP, en pacientes con EPOC y presencia de NP, diferente a lo encontrado en la concentración de la proteína TF en donde se observa que los niveles en la concentración de TF se encuentran disminuidos en pacientes con EPOC y presencia de NP (Fig. 12).

Cabe mencionar que en un paciente de EPOC con presencia de NP, evolucionó CA pulmonar 8 meses después de la toma de la muestra para este trabajo.

Aunque estas proteínas en la práctica clínica se utilizan para evaluar el estado nutricional de los pacientes, recientemente se ha visto a la TF implicada dentro del sistema de defensa innato, realizando funciones antibacterianas y antioxidantes.

Rooijackers y cols. 2010, han relacionado a la concentración sérica de la TF en funciones antibacterianas, donde se cree que la TF en suero, pudiera estar secuestrando el hierro que se necesita para la replicación bacteriana inhibiendo así su crecimiento. Probablemente la baja concentración en suero de los pacientes con EPOC, pudiera reflejar una deficiencia en el sistema de defensa inmune en suero, así como una mayor susceptibilidad a exacerbaciones infecciosas.

Los análisis estadísticos para establecer diferencias en cuanto a la concentración de las 15 proteínas respecto a las variables: índice tabáquico ($\frac{1}{2}$ - 20), (21 - 40) y (41 a +100) paq/año, grado de obstrucción (LEVE, MODERADO, GRAVE, MUY GRAVE), tratamiento, sexo y edad (40-60, 61-90), en el grupo de pacientes con EPOC y el grupo de fumadores, no mostró diferencias estadísticamente significativas entre estas (Tabla 7).

En cuanto al índice tabáquico, no se encontraron diferencias significativas probablemente porque algunos mediadores inflamatorios se han encontrado elevados en fumadores asintomáticos, como resultado de su exposición con el tóxico (Barnes y cols. 2004).

Por otra parte es importante mencionar que el hecho de que no se hayan encontrado diferencias significativas en cuanto a la concentración de las 15 proteínas, respecto al grado de obstrucción, puede deberse a que algunos de los pacientes con EPOC no tenían un estudio de espirometría reciente, y probablemente el estado de la función pulmonar del paciente pudo haber cambiado con el transcurso del tiempo, situándolo en una clasificación que no le correspondiera.

El hecho de que no se hayan encontrado diferencias significativas en la concentración de las 15 proteínas, respecto a edad y sexo, es importante, porque refleja que la diferencia significativa que se encontró en la concentración de las proteínas APO AI, YKL-40, CEA y NSE, entre fumadores y pacientes con EPOC, es independiente de estas variables.

10. CONCLUSIONES

En este trabajo se encontró un aumento significativo en la concentración sérica de las proteínas APO AI, TGFB 1, NSE, CEA, YKL-40 y CRP, en pacientes con EPOC, comparados con los fumadores.

En base a la información obtenida de los expedientes clínicos fue posible establecer y analizar estadísticamente subgrupos (presencia de comorbilidad, presencia de nódulos pulmonares solitarios, índice tabáquico, grado de obstrucción, tratamiento, sexo, edad) en la población de los pacientes con EPOC.

EL análisis estadístico de las 15 proteínas para el subgrupo de EPOC (presencia/ausencia de comorbilidad) mostró un aumento en la concentración de la proteína CRP en pacientes con EPOC con presencia de comorbilidad.

El análisis estadístico de las 15 proteínas para el subgrupo de EPOC (presencia/ausencia de nódulo pulmonar solitario) mostró un aumento en la concentración de la proteína RBP en pacientes con EPOC con presencia de nódulo pulmonar solitario y una disminución en la concentración de la proteína TF.

El análisis estadístico de las 15 proteínas para los subgrupos de EPOC (índice tabáquico, grado de obstrucción, tratamiento, sexo y edad) no mostró diferencias en cuanto a la concentración de las proteínas.

11. PERSPECTIVAS

El uso clínico de los biomarcadores biológicos puede ser una herramienta útil, complementaria, a los métodos actuales para el diagnóstico de la EPOC, sin embargo, para su utilidad clínica se requiere la validación de los mismos. El hecho de no realizar una validación en diferentes biomarcadores propuestos hasta el momento, limita su aplicación clínica. Para el presente estudio es necesario evaluar las 15 proteínas en un nuevo conjunto de observaciones, con la finalidad de determinar qué tan reproducibles son los resultados obtenidos. Es necesario además incluir datos clínicamente relevantes por ejemplo: grado de disnea, resistencia al ejercicio, índice de masa muscular, entre otras, con la finalidad de encontrar asociaciones entre la concentración de la proteína y la patogenia de la EPOC. Cabe mencionar que Dichas observaciones deberían estar enfocadas a poblaciones más amplias, que permitan reunir datos para la evaluación más completa y clínicamente relevante para la cuarta causa principal de muerte en el mundo.

12. REFERENCIAS

1. Agustí AG, Noguera A, Sauleda J, Sala E, Pons J, Busquets X, Systemic effects of chronic obstructive pulmonary disease, *Eur Respir J.* 2003; Vol. 21, pp.347-360.
2. Anthonisen NR, Connett JE, Murray RP, Smoking and lung function of Lung Health Study participants after 11 years, *Am J Respir Crit Care Med.*, 2002; Vol. 166, pp. 675-679.
3. Bandow JE, Baker JD, Berth M, Painter C, Sepulveda OJ, Clark KA, Kilty I, VanBogelen RA, Improved image analysis workflow for 2-D gels enables large-scale 2-D gel-based proteomics studies--COPD biomarker discovery study, *Proteomics.*, 2008; Vol.8, pp.3030-3041.
4. Barnes PJ, Celli BR, Systemic manifestations and comorbidities of COPD, *Eur Respir J.*, 2009; Vol. 33, pp.1165-1185.
5. Barnes PJ, Chowdhury B, Kharitonov SA, Magnussen H, Page CP, Postma D, Saetta M, Pulmonary biomarkers in chronic obstructive pulmonary disease, *Am J Respir Crit Care Med.*, 2006; Vol.174, pp.6-14.
6. Barnes PJ, Chronic obstructive pulmonary disease, *N Engl J Med.*, 2000; Vol. 343, pp. 269-280.
7. Boot RG, van Achterberg TA, van Aken BE, Renkema GH, Jacobs MJ, Aerts JM, de Vries CJ, Strong induction of members of the chitinase family of proteins in atherosclerosis: chitotriosidase and human cartilage gp-39 expressed in lesion macrophages, *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*,1999; Vol.19, pp. 687-694.
8. Caballero A, Torres-Duque CA, Jaramillo C, Bolívar F, Sanabria F, Osorio P, Orduz C, Guevara DP, Maldonado D, Prevalence of COPD in five Colombian cities situated at low, medium, and high altitude (PREPOCOL study), *Chest.*, 2008; Vol. 133, pp. 343-349.
9. Caballero AS, Etiopatogenia e historia natural de la EPOC, en Giraldo, H. Diagnóstico y manejo integral del paciente con EPOC. Ed Médica Panamericana, 2003; pp.17-26.
10. Cazzola M, MacNee W, Martinez FJ, Rabe KF, Franciosi LG, Barnes PJ, Brusasco V, Burge PS, Calverley PM, Celli BR, Jones PW, Mahler DA, Make B, Miravittles M, Page CP, Palange P, Parr D, Pistolesi M, Rennard SI, Rutten-van Mölken MP, Stockley R, Sullivan SD, Wedzicha JA, Wouters EF;

American Thoracic Society; European Respiratory Society Task Force on outcomes of COPD, Outcomes for COPD pharmacological trials: from lung function to biomarkers, *Eur Respir J.*, 2008; Vol. 31, pp. 416-469.

11. Chapman KR. Chronic obstructive pulmonary disease: are women more susceptible than men? ,*Clin Chest Med.*, 2004; Vol.25, pp. 331-341.
12. Cosio MG, Saetta M, Agusti A, Immunologic aspects of chronic obstructive pulmonary disease, *N Engl J Med.* 2009; Vol. 360, pp. 2445-2454.
13. Dahl M, Vestbo J, Lange P, Bojesen SE, Tybjaerg-Hansen A, Nordestgaard BG, C-reactive protein as a predictor of prognosis in chronic obstructive pulmonary disease, *Am J Respir Crit Care Med.*, 2007; Vol. 175, pp. 250-255.
14. De Miguel Díez J, Izquierdo Alonso JL, Molina París J, Bellón Cano JM, Rodríguez González-Moro JM, de Lucas Ramos P, Factors affecting drug prescription in patients with stable COPD: results from a multicenter Spanish study (IDENTEPOC), *Arch Bronconeumol.*, 2005; Vol. 41, pp.63-70.
15. De Torres JP, Cordoba-Lanus E, López-Aguilar C, Muros de Fuentes M, Montejo de Garcini A, Aguirre-Jaime A, Celli BR, Casanova C, C-reactive protein levels and clinically important predictive outcomes in stable COPD patients, *Eur Respir J.* 2006; Vol.27, pp.902-907.
16. DeLuise C, Jones JK, Lanes S, Stang MR, Goehring E Jr, She D, Cardiovascular disease in patients with chronic obstructive pulmonary disease, Saskatchewan Canada cardiovascular disease in COPD patients, *Ann Epidemiol.*, 2006; Vol. 16, pp. 63-70.
17. Dennis RJ, Maldonado D, Norman S, Baena E, Martinez G, Exposure and risk for obstructive airways disease among women, *Chest.*, 1996; Vol. 109, pp. 115-119.
18. Diagnostic labeling of COPD in five Latin American cities, *Chest.*, 2007; Vol. 131, pp. 60-67.
19. Eid AA, Ionescu AA, Nixon LS, Lewis-Jenkins V, Matthews SB, Griffiths TL, Shale DJ, Inflammatory response and body composition in chronic obstructive pulmonary disease, *Am J Respir Crit Care Med.*, 2001; Vol. 164, pp. 1414-1418.
20. Eisner MD, Anthonisen N, Coultas D, Kuenzli N, Perez-Padilla R, Postma D, Romieu I, Silverman EK, Balmes JR; Committee on Nonsmoking COPD, Environmental and Occupational Health Assembly, An official American Thoracic Society public policy statement: Novel risk factors and the global

burden of chronic obstructive pulmonary disease, *Am J Respir Crit Care Med.*, Vol. 182, pp. 693-718.

21. Escarrabill J, The public health cost of chronic obstructive pulmonary disease, *Arch Bronconeumol.*, 2003; Vol.39, pp.435-436.
22. Fletcher C, Peto R, The natural history of chronic airflow obstruction, *Br Med J.*, 1977; Vol. 1, pp. 1645-1648.
23. Franciosi LG, Page CP, Celli BR, Cazzola M, Walker MJ, Danhof M, Rabe KF, Della Pasqua OE, Markers of disease severity in chronic obstructive pulmonary disease, *Pulm Pharmacol Ther.*, 2006; Vol. 19, pp. 189-199.
24. Gan WQ, Man SF, Senthilselvan A, Sin DD, Association between chronic obstructive pulmonary disease and systemic inflammation: a systematic review and a meta-analysis, *Thorax.*, 2004; Vol. 59, pp. 574-80.
25. Garcia-Rio F, Miravittles M, Soriano JB, Muñoz L, Duran-Tauleria E, Sánchez G, Sobradillo V, Ancochea J; EPI-SCAN Steering Committee, Systemic inflammation in chronic obstructive pulmonary disease: a population-based study, *Respir Res.*, 2010; Vol.11, pp. 63.
26. Gorowiec MR, Borthwick LA, Parker SM, Kirby JA, Saretzki GC, Fisher AJ, Free Radical Generation Induces Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Lung Epithelium via a TGF- β 1-dependent Mechanism., *Free Radic Biol Med*, 2012.
27. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease. The global strategy for diagnosis, management and prevention of chronic obstructive lung disease. GOLD, Updated 2009. www.goldcopd.org.
28. Halbert RJ, Natoli JL, Gano A, Badamgarav E, Buist AS, Mannino DM, Global burden of COPD: systematic review and meta-analysis, *Eur Respir J*. 2006; Vol. 28, pp. 523-532.
29. Hernández M; Garrido F, López S, Diseño de estudios epidemiológicos *Salud pública Méx [online]*. 2000, Vol.42, pp. 144-154.
30. Hnizdo E, Glindmeyer HW, Petsonk EL, Enright P, Buist AS, Case definitions for chronic obstructive pulmonary disease, *COPD*. 2006; Vol. 3, pp. 95-100.
31. Hnizdo E, Singh T, Churchyard G, Chronic pulmonary function impairment caused by initial and recurrent pulmonary tuberculosis following treatment, *Thorax.*, 2000; Vol. 55, pp.32-38.

32. Hnizdo E, Sullivan PA, Bang KM, Wagner G, Association between chronic obstructive pulmonary disease and employment by industry and occupation in the US population: a study of data from the Third National Health and Nutrition Examination Survey, *Am J Epidemiol.*, 2002; Vol. 156, pp.738-746.
33. Hogg JC, Chu F, Utokaparch S, Woods R, Elliott WM, Buzatu L, Cherniack RM, Rogers RM, Sciurba FC, Coxson HO, Paré PD, The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease, *N Engl J Med.* 2004; Vol. 350, pp. 2645-2653.
34. Hurst JR, Donaldson GC, Perera WR, Wilkinson TM, Bilello JA, Hagan GW, Vessey RS, Wedzicha JA, Use of plasma biomarkers at exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease, *Am J Respir Crit Care Med.*, 2006; Vol.174, pp. 867-74.
35. Instituto Nacional de Geografía e Informática (INEGI). <http://www.inegi.gob.mx/lib/estadisticas.asp?s=inegi>
36. Johannessen A, Lehmann S, Omenaas ER, Eide GE, Bakke PS, Gulsvik A, Post-bronchodilator spirometry reference values in adults and implications for disease management, *Am J Respir Crit Care Med.* 2006; Vol.173, pp. 1316-1325.
37. Joppa P, Petrasova D, Stancak B, Tkacova R, Systemic inflammation in patients with COPD and pulmonary hypertension, *Chest.*, 2006; Vol. 130, pp. 326-333.
38. Keatings VM, Collins PD, Scott DM, Barnes PJ, Differences in interleukin-8 and tumor necrosis factor-alpha in induced sputum from patients with chronic obstructive pulmonary disease or asthma, *Am J Respir Crit Care Med.*, 1996; Vol. 153, pp. 530-534.
39. Kerstjens HA, Rijcken B, Schouten JP, Postma DS, Decline of FEV1 by age and smoking status: facts, figures, and fallacies, *Thorax.*, 1997; Vol. 52, pp. 820-827.
40. Kohansal R, Martinez-Camblor P, Agustí A, Buist AS, Mannino DM, Soriano JB, The natural history of chronic airflow obstruction revisited: an analysis of the Framingham offspring cohort, *Am J Respir Crit Care Med.*, 2009; Vol. 180, pp. 3-10.
41. Létuvé S, Kozhich A, Arouche N, Grandsaigne M, Reed J, Dombret MC, Kiener PA, Aubier M, Coyle AJ, Pretolani M, YKL-40 is elevated in patients with chronic obstructive pulmonary disease and activates alveolar macrophages, *J Immunol.*, 2008; Vol. 181, pp. 5167-5173.

42. Li X, Yue Z, Zhang YY, Elevated serum level and gene polymorphisms of TGF-beta 1 in gastric cancer, *J Clin Lab Anal* 2008; Vol. 22, pp. 164–171.
43. Lopez AD, Shibuya K, Rao C, Mathers CD, Hansell AL, Held LS, Schmid V, Buist S, Chronic obstructive pulmonary disease: current burden and future projections, *Eur Respir J.*, 2006; Vol. 27, pp. 397- 412.
44. Lopez Varela MV, Montes de Oca M, Halbert RJ, Muiño A, Perez-Padilla R, Tálamo C, Jardim JR, Valdivia G, Pertuzé J, Moreno D, Menezes AM; PLATINO Team, Sex-related differences in COPD in five Latin American cities: the PLATINO study, *Eur Respir J.*, 2010; Vol. 36, pp. 1034-1041.
45. MacCallum PK, Markers of hemostasis and systemic inflammation in heart disease and atherosclerosis in smokers, *Proc Am Thorac Soc.*, 2005; Vol. 2, pp. 34-43.
46. Macnee W., Pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease, *Clin Chest Med.*, 2007; Vol. 28, pp. 479-513.
47. Man SF, Sin DD, Effects of corticosteroids on systemic inflammation in chronic obstructive pulmonary disease, *Proc Am Thorac Soc.*, 2005; Vol. 2, pp. 78-82.
48. Mannino DM, Gagnon RC, Petty TL, Lydick E, Obstructive lung disease and low lung function in adults in the United States: data from the National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994, *Arch Intern Med.*, 2000; Vol. 160, pp. 1683-1689.
49. Marquis K, Debigaré R, Lacasse Y, LeBlanc P, Jobin J, Carrier G, Maltais F, Midthigh muscle cross-sectional area is a better predictor of mortality than body mass index in patients with chronic obstructive pulmonary disease, *Am J Respir Crit Care Med.*, 2002; Vol. 166, pp. 809-813.
50. Menezes AM, Hallal PC, Perez-Padilla R, Jardim JR, Muiño A, Lopez MV, Valdivia G, Montes de Oca M, Talamo C, Pertuze J, Victora CG; Latin American Project for the Investigation of Obstructive Lung Disease (PLATINO) Team, Tuberculosis and airflow obstruction: evidence from the PLATINO study in Latin America, *Eur Respir J.*, 2007; Vol. 30, pp. 1180-1185.
51. Menezes AM, Lopez MV, Hallal PC, Muiño A, Perez-Padilla R, Jardim JR, Valdivia G, Pertuzé J, de Oca MM, Tálamo C, Victora CG; PLATINO Team, Prevalence of smoking and incidence of initiation in the Latin American adult population: the PLATINO study, *BMC Public Health.*, 2009; Vol. 9, pp. 151.

52. Menezes AM, Perez-Padilla R, Hallal PC, Jardim JR, Muiño A, Lopez MV, Valdivia G, Pertuze J, Montes de Oca M, Tálamo C; PLATINO Team, Worldwide burden of COPD in high- and low-income countries. Part II. Burden of chronic obstructive lung disease in Latin America: the PLATINO study, *Int J Tuberc Lung Dis.*, 2008; Vol. 12, pp. 709-712.
53. Montes de Oca M, Halbert RJ, Talamo C, Perez-Padilla R, Lopez MV, Muiño A, Jardim JR, Valdivia G, Pertuzé J, Moreno D, Menezes AM; PLATINO team, Paid employment in subjects with and without chronic obstructive pulmonary disease in five Latin American cities: the PLATINO study, *Int J Tuberc Lung Dis.*, 2011; Vol.15, pp.1259-1264.
54. Murray CJ, Lopez AD, Evidence-based health policy-lessons from the Global Burden of Disease Study, *Science.*, 1996; Vol. 274, pp. 740-743.
55. Naberan K, De la Roza C, Lamban M, Gobartt E, Martín A, Miravittles M, Use of spirometry in the diagnosis and treatment of chronic obstructive pulmonary disease in primary care, *Arch Bronconeumol.*, 2006; Vol. 42, pp. 638-644.
56. Nicholas BL, Skipp P, Barton S, Singh D, Bagmane D, Mould R, Angco G, Ward J, Guha-Niyogi B, Wilson S, Howarth P, Davies DE, Rennard S, O'Connor CD, Djukanovic R, Identification of lipocalin and apolipoprotein A1 as biomarkers of chronic obstructive pulmonary disease, *Am J Respir Crit Care Med.*, 2010 ; Vol. 181, pp. 1049-1060.
57. Nishimura K, Izumi T, Tsukino M, Oga T, Dyspnea is a better predictor of 5-year survival than airway obstruction in patients with COPD, *Chest.*, 2002; Vol. 121, pp.1434-1440.
58. Patel AR, Hurst JR, Wedzicha JA, The potential value of biomarkers in diagnosis and staging of COPD and exacerbations, *Semin Respir Crit Care Med.*, 2010; Vol. 31, pp. 267-275.
59. Pauwels RA, Rabe KF, Burden and clinical features of chronic obstructive pulmonary disease (COPD), *Lancet.*, 2004; Vol. 364, pp. 613-620.
60. Peces-Barba G, Barberà JA, Agustí A, Casanova C, Casas A, Izquierdo JL, Jardim J, López Varela V, Monsó E, Montemayor T, Viejo JL, Diagnosis and management of chronic obstructive pulmonary disease: joint guidelines of the Spanish Society of Pulmonology and Thoracic Surgery (SEPAR) and the Latin American Thoracic Society (ALAT), *Arch Bronconeumol.*, 2008; Vol. 44, pp. 271-281.
61. Pérez-Padilla R, Regalado J, Vedal S, Paré P, Chapela R, Sansores R, Selman M, Exposure to biomass smoke and chronic airway disease in Mexican

- women. A case-control study, *Am J Respir Crit Care Med.*, 1996; Vol. 154, pp. 701-706.
62. Petty TL, Lung cancer and chronic obstructive pulmonary disease, *Med Clin North Am.*, 1996; Vol.80, pp. 645-655.
 63. Petty TL, The predictive value of spirometry, Identifying patients at risk for lung cancer in the primary care setting, *Postgrad Med.*, 1997; Vol. 101, pp. 128-140.
 64. Pinto-Plata VM, Müllerova H, Toso JF, Feudjo-Tepie M, Soriano JB, Vessey RS, Celli BR, C-reactive protein in patients with COPD, control smokers and non-smokers, *Thorax.*, 2006; Vol. 61, pp. 23-28.
 65. Prevalence of smoking and incidence of initiation in the Latin American adult population: the PLATINO study, *BMC Public Health.* 2009; Vol. 9, pp. 151.
 66. Rennard SI, Vestbo J, Natural histories of chronic obstructive pulmonary disease, *Proc Am Thorac Soc.*, 2008; Vol. 5, pp. 878-883.
 67. Rooijackers SH, SL Rasmussen, SM McGillivray, la tuberculosis Bartnikas, AB Mason, AM Friedlander, V Nizet, Human transferrin confers serum resistance against *Bacillus anthracis*, *J Biol Chem.*, 2010; Vol. 285, pp. 27609-27613.
 68. Scanlon PD, Connett JE, Waller LA, Altose MD, Bailey WC, Buist AS, Smoking cessation and lung function in mild-to-moderate chronic obstructive pulmonary disease. The Lung Health Study, *Am J Respir Crit Care Med.*, 2000; Vol.161, pp. 381-390.
 69. Schellevis FG, Van de Lisdonk EH, Van der Velden J, Hoogbergen SH, Van Eijk JT, Van Weel C. Consultation rates and incidence of intercurrent morbidity among patients with chronic disease in general practice, *Br J Gen Pract.*, 1994; Vol. 44, pp. 259-262.
 70. Schols AM, Soeters PB, Dingemans AM, Mostert R, Frantzen PJ, Wouters EF, Prevalence and characteristics of nutritional depletion in patients with stable COPD eligible for pulmonary rehabilitation, *Am Rev Respir Dis.* 1993; Vol. 147, pp. 1151-1156.
 71. Seemungal TA, Donaldson GC, Bhowmik A, Jeffries DJ, Wedzicha JA, Time course and recovery of exacerbations in patients with chronic obstructive pulmonary disease, *Am J Respir Crit Care Med.*, 2000; Vol.161, pp. 1608-1613.

72. Shao R, Cao QJ, Arenas RB, Bigelow C, Bentley B, Yan W, Breast cancer expression of YKL-40 correlates with tumour grade, poor differentiation, and other cancer markers, *Br J Cancer.*, 2011; Vol. 105, pp. 1203-1209.
73. Sin DD, Lacy P, York E, Man SF, Effects of fluticasone on systemic markers of inflammation in chronic obstructive pulmonary disease, *Am J Respir Crit Care Med.*, 2004; Vol.170, pp. 760-765.
74. Sin DD, Man SF, Biomarkers in COPD: are we there yet?, *Chest.*, 2008; Vol.133, pp. 1296-1298.
75. Sin DD, Vestbo J, Biomarkers in chronic obstructive pulmonary disease, *Proc Am Thorac Soc.*, 2009; Vol. 6, pp. 543-545.
76. Sin DD, Wu L, Man SF, The relationship between reduced lung function and cardiovascular mortality: a population-based study and a systematic review of the literature, *Chest.*, 2005; Vol. 127, pp.1952-1959.
77. Song WA, Liu X, Tian XD, Wang W, Liang CY, Zhang T, Guo JT, Peng YH, Zhou NK, Utility of squamous cell carcinoma antigen, carcinoembryonic antigen, Cyfra 21-1 and neuron specific enolase in lung cancer diagnosis: a prospective study from China, *Chin Med J (Engl.)*, 2011; Vol. 124, pp. 3244-3248.
78. Soriano JB, Miravittles M, Datos epidemiológicos de la EPOC en España, *Arch Bronconeumol.*, 2007; Vol. 43, pp. 2-9.
79. Soriano JB, Visick GT, Muellerova H, Payvandi N, Hansell AL, Patterns of comorbidities in newly diagnosed COPD and asthma in primary care, *Chest.*, 2005; Vol. 128, pp. 2099-2107.
80. Stoller JK, Aboussouan LS, Alpha1-antitrypsin deficiency, *Lancet.*,2005; Vol. 365, pp.2225-2236.
81. Su-Ping S, Ye-Ning J, Hong-Peng Y, Yi W, Zhao D. Serum transforming growth factor beta 1 levels reflects disease status in patients with esophageal carcinoma after radiotherapy, *World J Gastroenterol.*, 2007;13, pp. 5267–5272.
82. Sutherland ER, Cherniack RM, Management of chronic obstructive pulmonary disease, *N Engl J Med.*,2004; Vol. 350, pp.2689-2697.
83. Tálamo C, de Oca MM, Halbert R, Perez-Padilla R, Jardim JR, Muiño A, Lopez MV, Valdivia G, Pertuzé J, Moreno D, Menezes AM; PLATINO team, Verma S, Yeh ET C-reactive protein and atherothrombosis--beyond a biomarker: an actual partaker of lesion formation, *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2003; Vol.285, pp.1253-1256.

84. Vestbo J, Prescott E, Almdal T, Dahl M, Nordestgaard BG, Andersen T, Sorensen TI, Lange P, Body mass, fat-free body mass, and prognosis in patients with chronic obstructive pulmonary disease from a random population sample: findings from the Copenhagen City Heart Study, *Am J Respir Crit Care Med.*, 2006; Vol.173, pp. 79-83.
85. Zhou Y, Wang C, Yao W, Chen P, Kang J, Huang S, Chen B, Wang C, Ni D, Wang X, Wang D, Liu S, Lu J, Zheng J, Zhong N, Ran P, COPD in Chinese nonsmokers, *Eur Respir J.*, 2009; Vol. 33, pp. 509-518.

Anexo 1. Carta de consentimiento, aprobada por el Comité de Ética de la Institución participante, en la cual se da a conocer al donador el destino de la muestra, la finalidad del estudio y los riesgos que implica la toma de muestra de sangre.

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPACIÓN EN PROTOCOLOS DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA

Lugar y Fecha

Por medio de la presente acepto participar en el protocolo de investigación titulado:

Análisis de la expresión de biomarcadores seleccionados específicos de cáncer de pulmón, y desarrollo de una prueba de ELISA prototipo para el diagnóstico de la enfermedad.

Registrado ante el Comité Local de Investigación o la CNIC con el número: _____

El objetivo del estudio es:

Analizar la expresión de un grupo de proteínas en sangre de personas con y sin cáncer de pulmón, para conocer qué conjunto de proteínas se asocian con el desarrollo de la enfermedad. El análisis de estas proteínas podría ayudarnos en un futuro a diagnosticar tempranamente a los pacientes con cáncer de pulmón.

Se me ha explicado que mi participación consistirá en:

- 1.- Se le tomará una muestra de sangre del antebrazo.
- 2.- Se le realizará una entrevista en donde se le solicitará información acerca de sus antecedentes médicos, estado de salud y antecedentes familiares.

Declaro que se me ha informado ampliamente sobre los posibles riesgos, inconvenientes, molestias y beneficios derivados de mi participación en el estudio, que son los siguientes:

Riesgos e inconvenientes: Los únicos riesgos posibles debidos a la toma de muestra de sangre incluyen solamente dolor moderado, sangrado o la formación de un moretón en la zona de punción que es el antebrazo.

Beneficios: este estudio no está diseñado para beneficiarle directamente en el corto plazo. Sin embargo, gracias a su participación, podremos estudiar la expresión de proteínas de cáncer de pulmón en sangre, lo que podría permitir en un futuro diagnosticar tempranamente a personas con esta enfermedad.

El Investigador Responsable se ha comprometido a darme información oportuna sobre cualquier procedimiento alternativo adecuado que pudiera ser ventajoso para mi tratamiento, así como a responder cualquier pregunta y aclarar cualquier duda que le plantee acerca de los procedimientos que se llevarán a cabo, los riesgos, beneficios o cualquier otro asunto relacionado con la investigación o con mi tratamiento.

Entiendo que conservo el derecho de retirarme del estudio en cualquier momento en que

lo considere conveniente, sin que ello afecte la atención médica que recibo en el Instituto. El Investigador Responsable me ha dado seguridades de que no se me identificará en las presentaciones o publicaciones que deriven de este estudio y de que los datos relacionados con mi privacidad serán manejados en forma confidencial. También se ha comprometido a proporcionarme la información actualizada que se obtenga durante el estudio, aunque esta pudiera cambiar de parecer respecto a mi permanencia en el mismo.

Nombre y firma del paciente

Nombre, firma y matrícula del Investigador Responsable.

Dr. Francisco Sánchez Llamas

Matrícula 99140833

Números telefónicos a los cuales puede comunicarse en caso de emergencia, dudas o preguntas relacionadas con el estudio:

Dr. Francisco Sánchez Llamas: Teléfono 3668 3000 Exts. 31326 y 31414.

Testigos

Nombre completo:

Parentesco con el paciente:

Dirección:

Teléfono:

Firma:

Fecha:

Nombre completo:

Parentesco con el paciente:

Dirección:

Teléfono:

Firma:

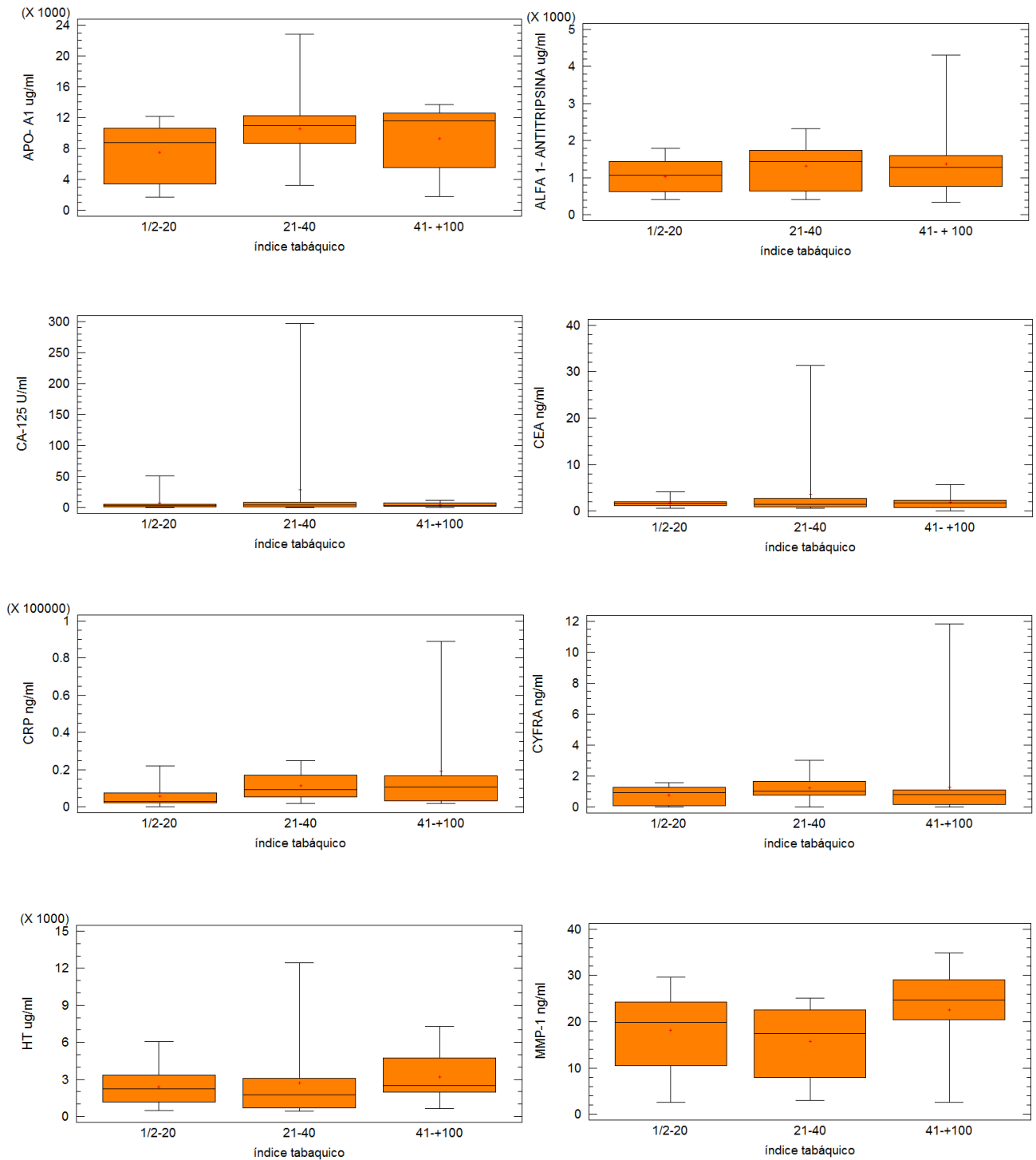
Fecha:

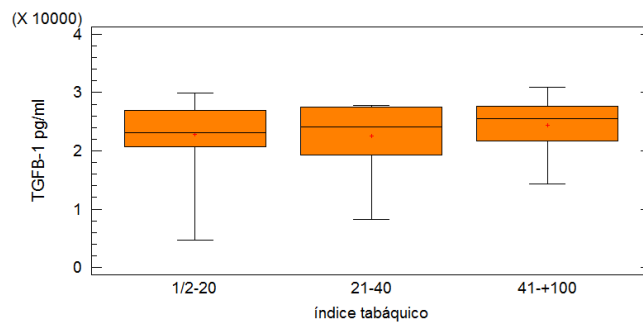
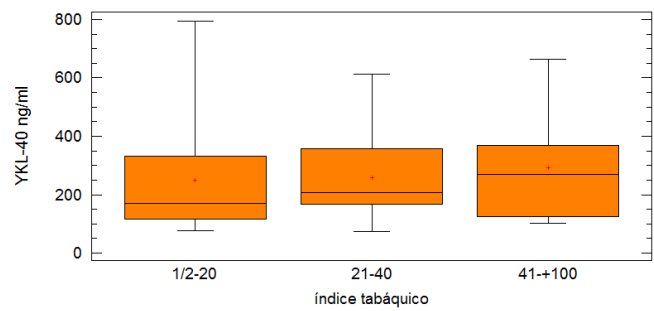
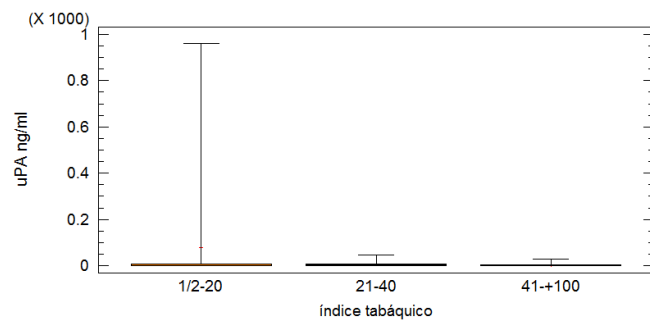
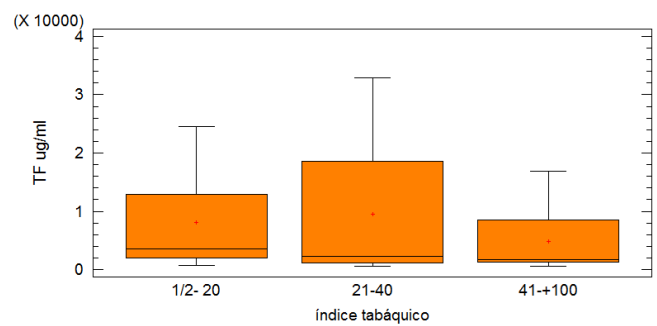
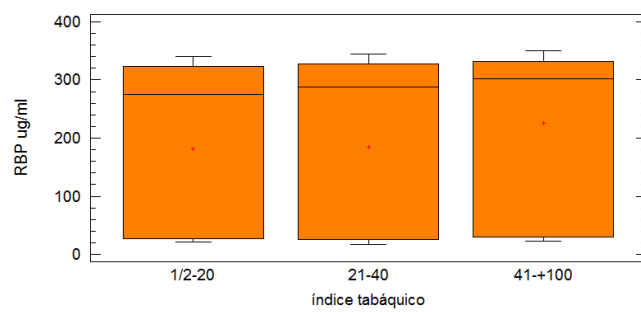
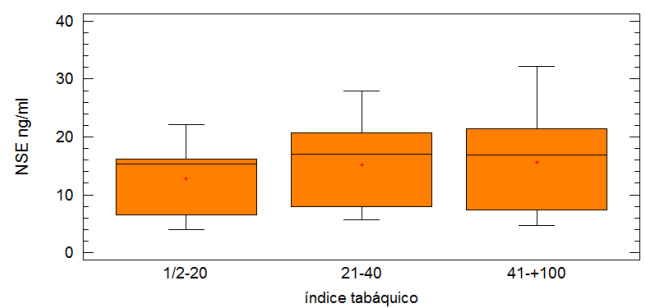
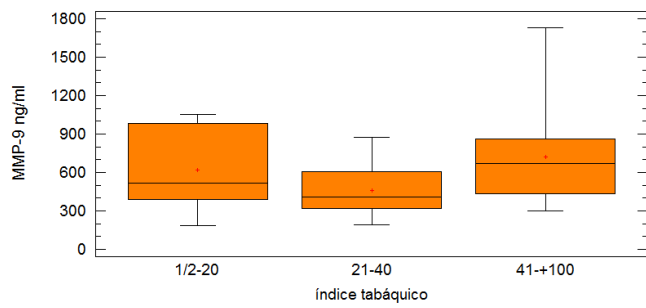
Clave: 2810 – 009 – 013

Anexo 2. Tabla de proteínas analizadas en el presente estudio.

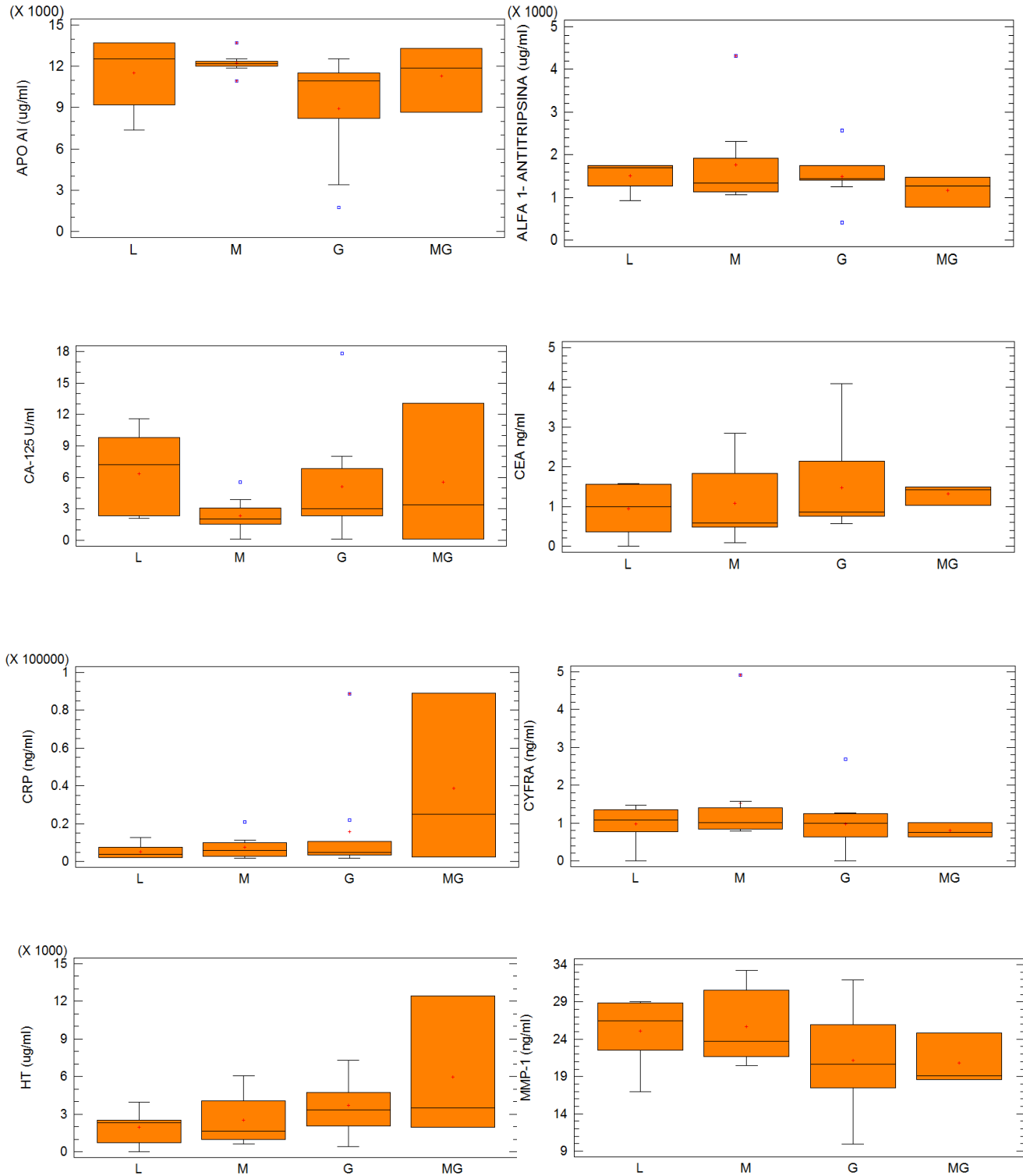
Proteína	Kit comercial	Implicaciones	
Antígeno de Cáncer 125 (CA125)	ALPCO Immunoassays	Proteína que se ha visto elevada en pacientes con tumores malignos (pecho, colón, páncreas, pulmonares) así como en enfermedades como cirrosis hepática, insuficiencia cardíaca etc.	Asociada a Cáncer
Antígeno Carcinoembrionario (CEA)	ALPCO Immunoassays	Glicoproteína expresada en células de la mucosa normales y sobre expresada en adenocarcinoma colorrectal.	Asociada a Cáncer
Metaloproteinasas de matriz 9 (MMP-9)	R&D Systems	Enzima degradante de la matriz extracelular derivada de macrófagos y neutrófilos.	Asociada a Remodelación
Haptoglobina	ASSAYPRO	Es una proteína de fase aguda, y como tal, su concentración sérica puede ser elevada en procesos inflamatorios.	Asociada a Inflamación
Enolasa específica de neuronas (NSE)	ALPCO Immunoassays	Se utiliza como marcador clínico para tumores intestinales y carcinomas de pulmón.	Asociada a Cáncer
Activador de plasminógeno tipo urocinasa (uPA)	ASSAYPRO	Convierte al plasminógeno en plasmina, la plasmina degrada proteínas de la matriz extracelular, facilitando la proliferación de las células del tumor, invasión y metástasis.	Asociada a Remodelación y cáncer
Transferrina (TF)	ASSAYPRO	En la práctica clínica es utilizada para evaluar el estado nutricional de los pacientes, aunque recientemente se ha reportado que podría tener un papel importante dentro del sistema de defensa innato.	Asociada a Cáncer
α_1 -antitripsina (AAT)	ASSAYPRO	Posee una función inhibitoria de las proteasas (sustancias producidas por los glóbulos blancos ante la presencia de infección o inflamación).	Asociada a Remodelación
Metaloproteinasas de matriz 1 (MMP-1)	R&D Systems	Juega un papel importante en la degradación de colágeno fibrilar en remodelación de matriz extracelular	Asociada a Remodelación
Apolipoproteína A-I (ApoA-1)	ASSAYPRO	Lipoproteína proinflamatoria	Asociada a Inflamación
Proteína C Reactiva (PCR)	ASSAYPRO	Reactante de fase aguda producido por hepatocitos estimulados por interleucina 6 (IL-6) como parte de la respuesta inflamatoria.	Asociada a Inflamación
Proteína de unión a retinol (RBP)	ASSAYPRO	Es la proteína que transporta el retinol desde el hígado a los tejidos periféricos protegiéndolos del daño oxidativo. Se han encontrado niveles bajos de esta proteína en fibrosis pulmonar.	Asociada a Remodelación
Fragmento de citoqueratina 19 (CYFRA 21.1)	DRG Diagnostics	Estudios histopatológicos han demostrado que la citoqueratina 19 es abundante en carcinomas pulmonares.	Asociada a Cáncer
YKL-40	QUIDEL CORPORATION	Proteína que se eleva en pacientes con condiciones inflamatorias, asociadas a remodelamiento.	Asociada a Inflamación y remodelamiento
Factor de crecimiento transformante beta 1 (TGFB1)	R&D Systems	Quimiocina antiinflamatoria y profibrótica	Asociada a Inflamación y cáncer

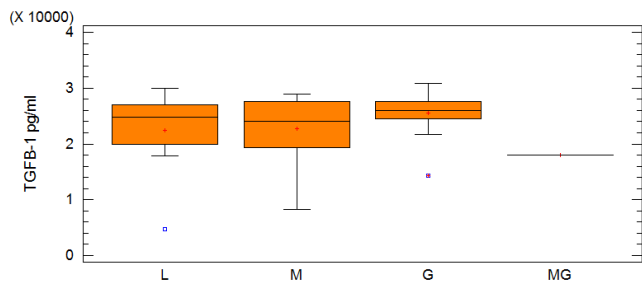
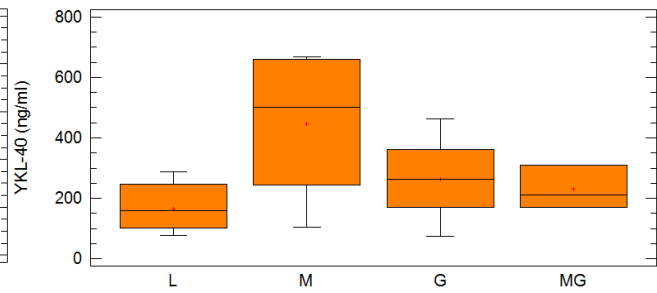
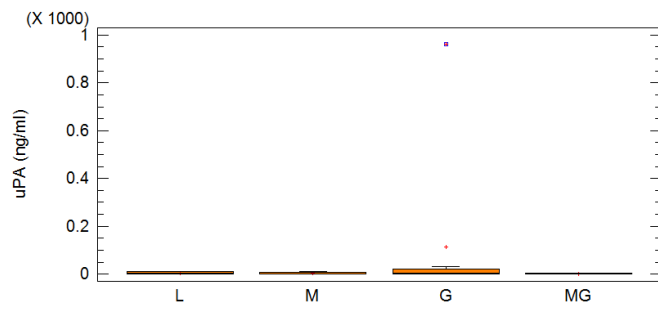
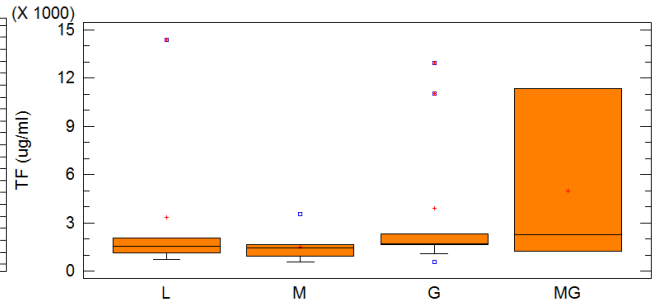
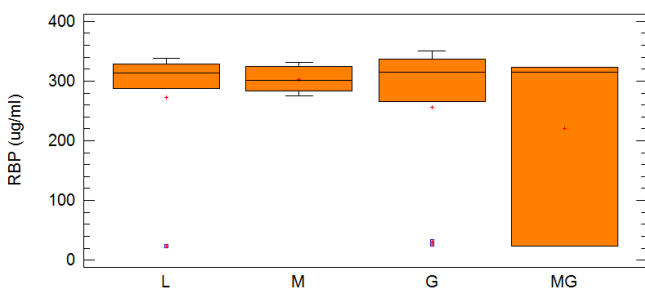
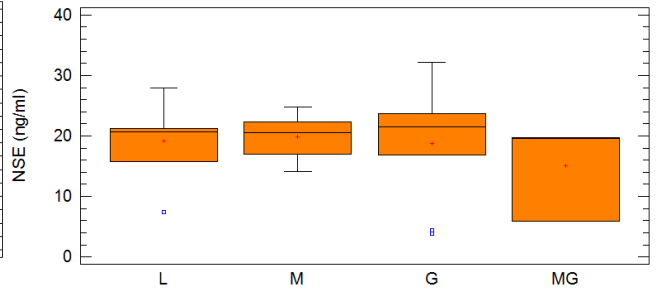
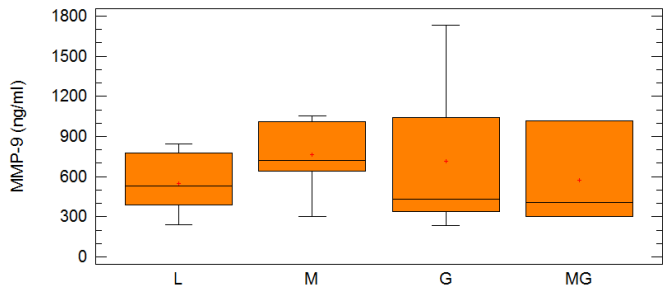
Anexo 3. Gráficas de caja y bigote de las proteínas que no presentaron diferencias significativas en las concentraciones entre los grupos de estudio.



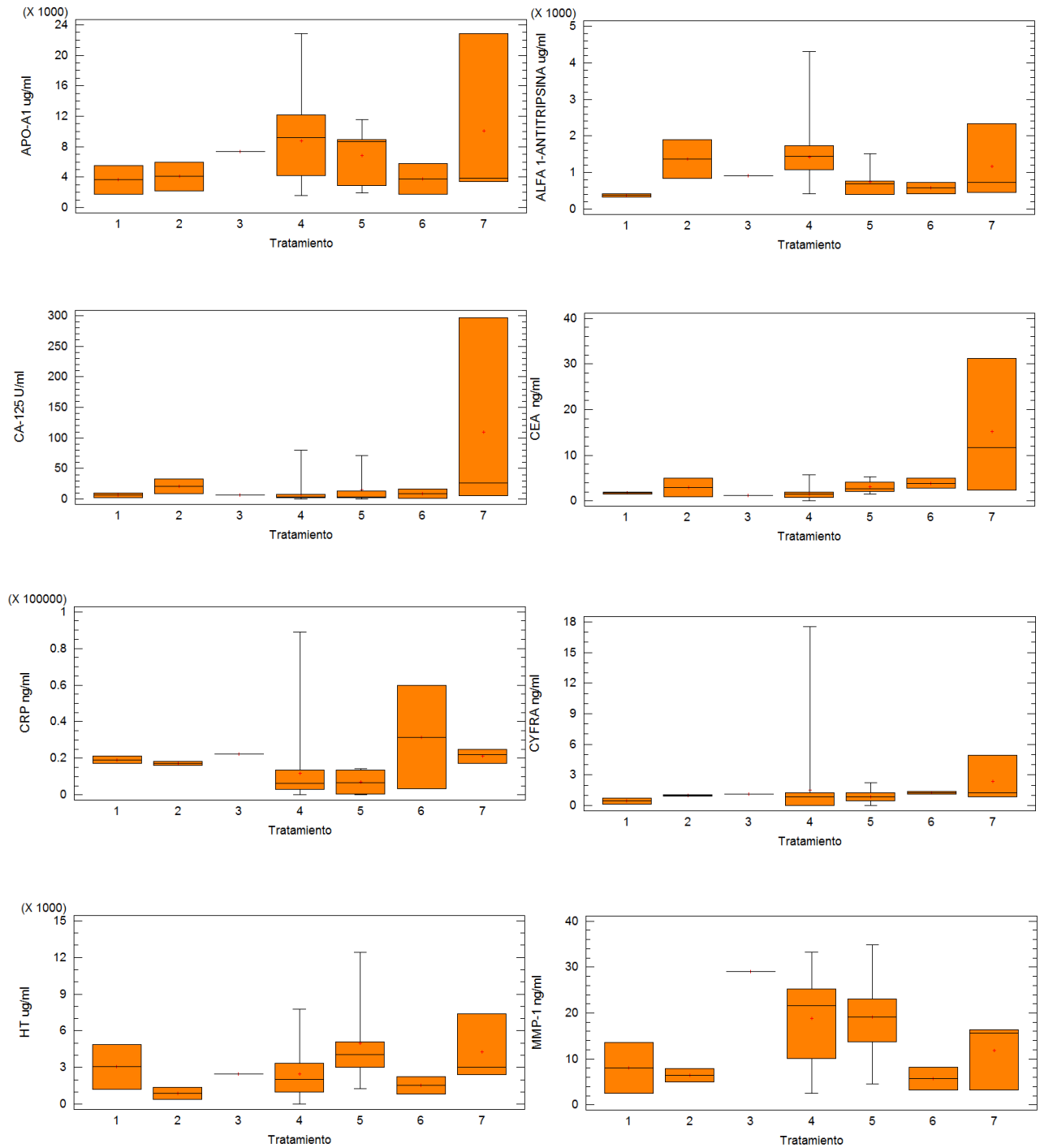


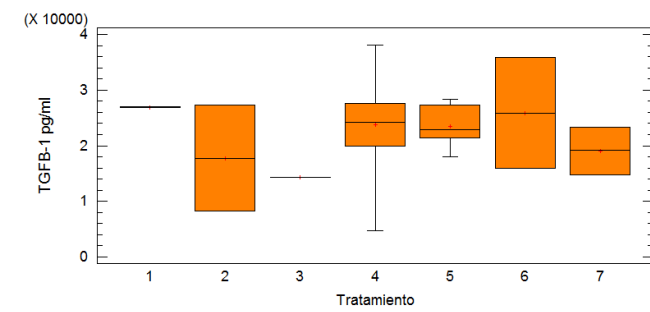
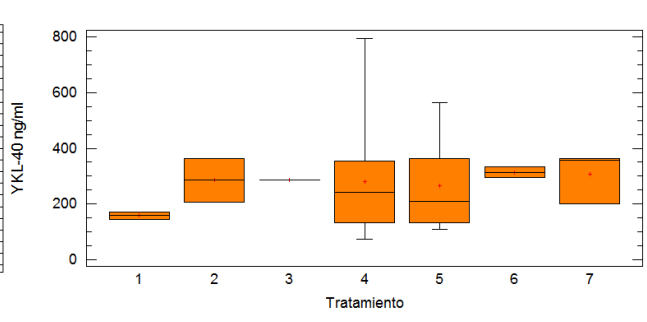
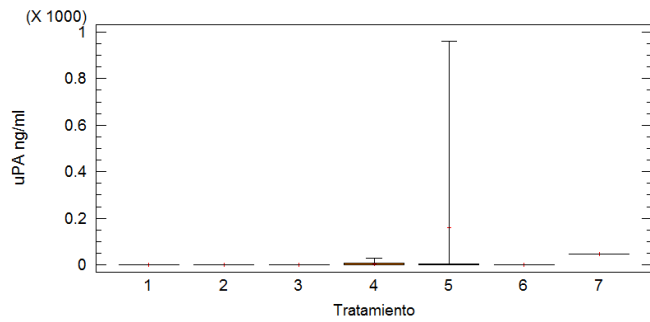
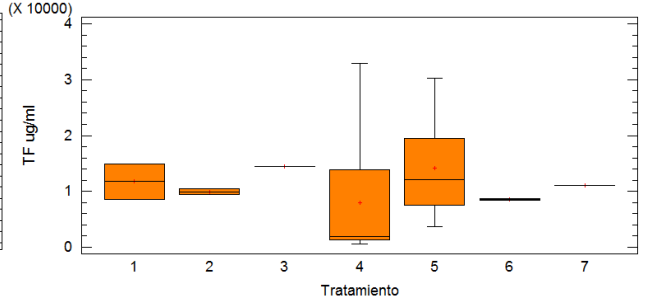
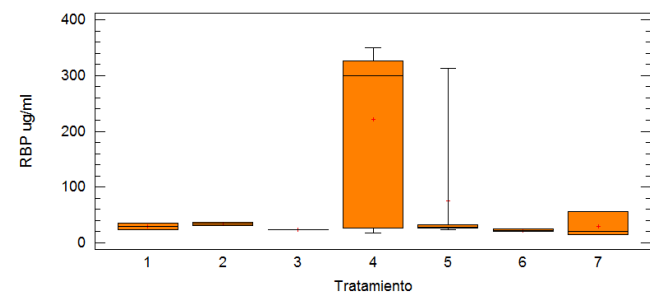
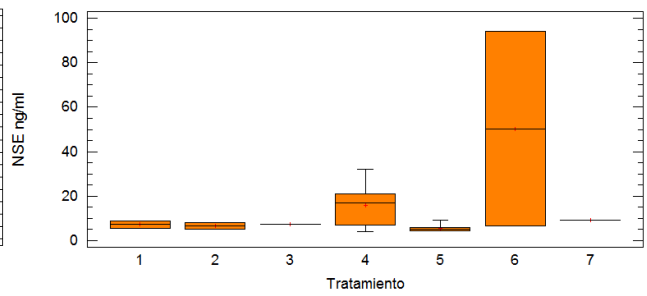
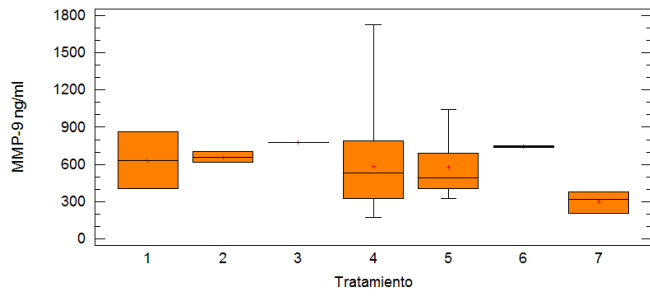
Anexo 4. Gráficas de caja y bigote de las proteínas que no presentaron diferencias significativas en las concentraciones entre los grupos de estudio.



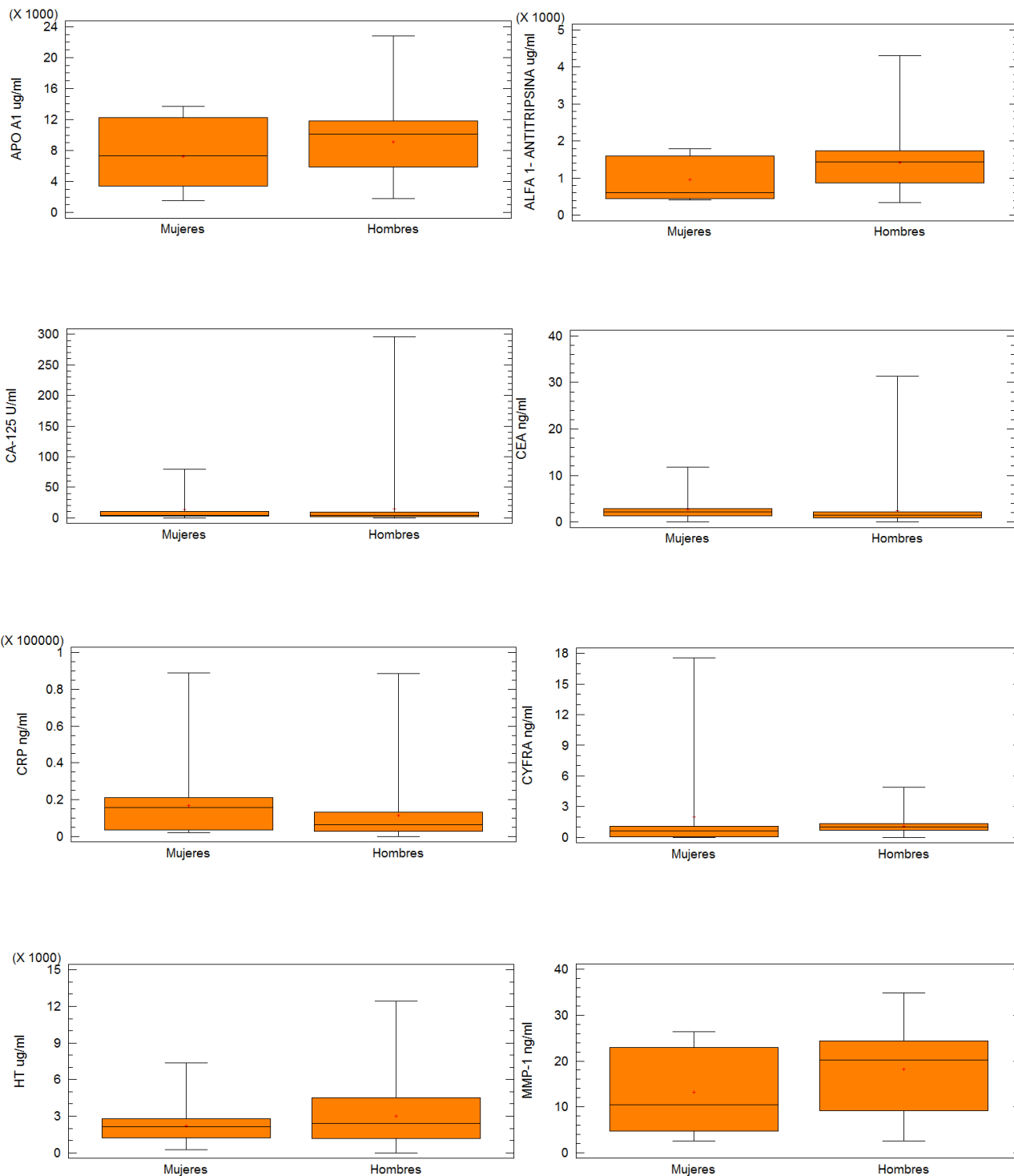


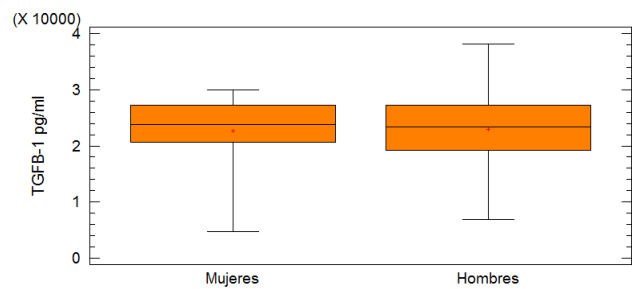
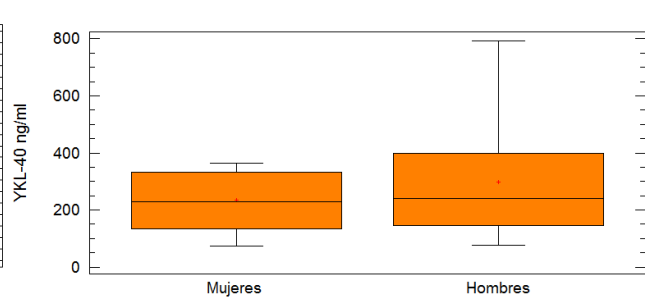
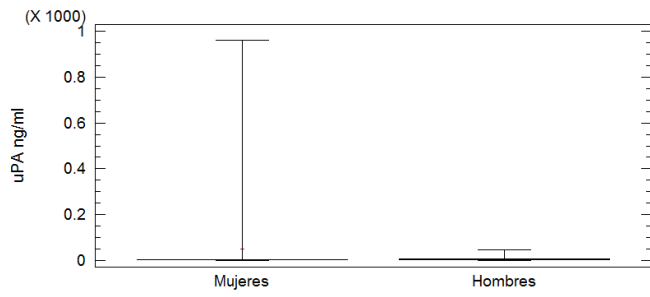
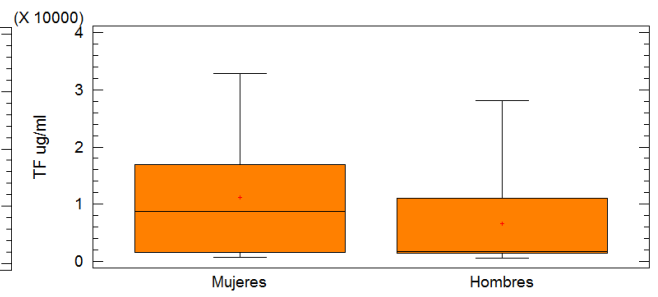
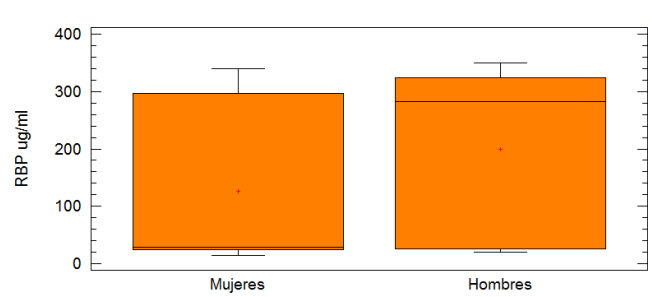
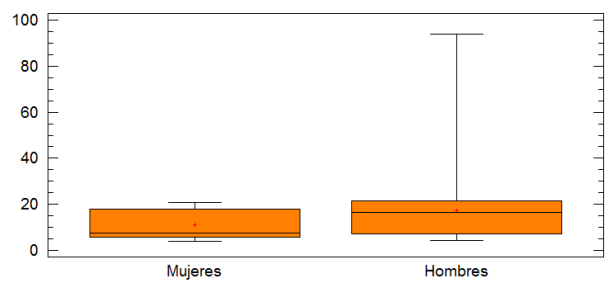
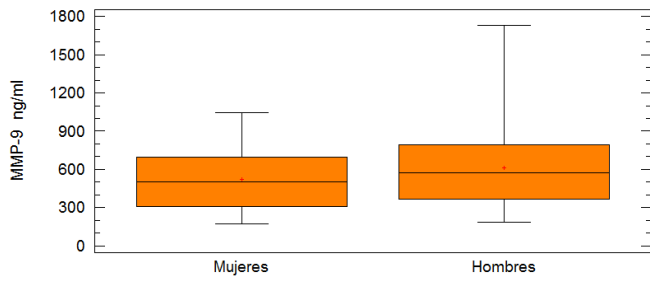
Anexo 5. Gráficas de caja y bigote de las proteínas que no presentaron diferencias significativas en las concentraciones entre los grupos de estudio.





Anexo 6. Gráficas de caja y bigote de las proteínas que no presentaron diferencias significativas en las concentraciones entre los grupos de estudio.







Búsqueda de biomarcadores sistémicos para la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica, mediante la cuantificación de proteínas inflamatorias, de Remodelación de Tejido y Asociadas a Tumor en Pacientes con EPOC y Fumadores Activos

M. G. González^a, J. M. Flores^a, G. Leal^a, F. Sánchez^b, M. Padilla^c, M. Martínez^a

^aCentro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco/Unidad de Biotecnología Médica y Farmacéutica, Guadalajara, Jalisco, México, mari_glz13@hotmail.com

^bHospital Civil de Guadalajara "Fray Antonio Alcalde"/Servicio de Fisiología Pulmonar e Inhaloterapia, Guadalajara, Jalisco, México, drfcosanchez@yahoo.com.mx

^cHospital General Regional No. 46/Servicio de Neumología, Guadalajara, Jalisco, México, marcogneumo@hotmail.com

RESUMEN

La EPOC se caracteriza por una limitación progresiva al flujo aéreo, asociada a una respuesta inflamatoria anormal de los pulmones a gases o partículas tóxicas inhaladas, siendo el tabaquismo el principal factor etiológico. Se encuentra entre las 10 principales causas de morbi-mortalidad en el mundo. Actualmente, existe un interés por desarrollar mejores estrategias de diagnóstico, pronóstico, manejo y prevención de la enfermedad. Una opción es la búsqueda y validación de biomarcadores, para una evaluación más completa y clínicamente más relevante de la EPOC. En este estudio se midieron los niveles en suero de 14 proteínas implicadas en inflamación, remodelación tisular y asociadas a tumor, por el método de ELISA, en un total de 27 pacientes con EPOC y 17 fumadores sanos, con el objetivo de identificar biomarcadores candidatos sistémicos de la EPOC. Las diferencias entre los grupos fueron evaluadas con la prueba de Mann-Whitney. Un valor de $p < 0.05$ fue considerado significativo. Las proteínas Transferrina, Apolipoproteína-A1 y YKL-40 presentaron una concentración significativamente más elevada en el suero de pacientes con EPOC, en comparación con los fumadores control. Aunque estas proteínas en la práctica clínica se utilizan para evaluar el estado nutricional de los pacientes, recientemente se han visto implicadas como componentes del sistema de defensa innato, realizando funciones antibacterianas y antioxidantes. Por lo tanto, su evaluación pudiera complementar los métodos de valoración de la enfermedad.

1. INTRODUCCIÓN

El desorden respiratorio caracterizado en la EPOC implica: el desarrollo progresivo e irreversible de la limitación al flujo aéreo, la destrucción del parénquima pulmonar y la pérdida del retroceso elástico peribronquial, secundario a una respuesta inflamatoria de tipo crónica, como resultado de la inhalación de partículas o gases tóxicos, más relacionado con el humo del tabaco^{1,2}. Actualmente, la EPOC se encuentra entre las 10 principales causas de morbilidad y mortalidad en el mundo, con más de 600 millones de personas afectadas y cerca de 3 millones de muertes por esta enfermedad al año^{3,4}. La EPOC en América Latina, causó un número estimado de 95,000 muertes, en el año 2000⁵. En México, como en los demás países de Latinoamérica, la EPOC es una enfermedad sobresaliente por su morbi-mortalidad, con una prevalencia calculada por el estudio PLATINO de 7.8% en personas mayores de 40 años de edad. Sin embargo, a pesar de todos estos datos, la EPOC permanece subdiagnosticada en nuestro país, no sólo en los estadios tempranos de la enfermedad, sino también en los tardíos⁶. Este fenómeno es explicable si se toma



VIII encuentro
Participación de la
Mujer
en la Ciencia



en cuenta que el uso del espirómetro, el instrumento con el que se diagnostica la EPOC, es poco utilizado, y además el estudio PLATINO ha comprobado que el utilizar exclusivamente el índice espirométrico, puede conducir tanto a un sobrediagnóstico en mayores de 50 años, como a un subdiagnóstico en adultos jóvenes⁶.

Los resultados anteriormente descritos han llevado a plantear la necesidad de desarrollar nuevas estrategias de diagnóstico, pronóstico, manejo y prevención de la EPOC. En este contexto, se ha iniciado la búsqueda y validación de biomarcadores, con el objetivo de encontrar una señal característica de la enfermedad, que pueda ser utilizada para el diagnóstico, seguimiento de la enfermedad, predicción del futuro de los resultados clínicos, evaluación del efecto de las intervenciones terapéuticas, etc⁷. Sin embargo, el descubrimiento de biomarcadores en la EPOC se ha encontrado con algunos obstáculos. Uno de ellos ha sido la dificultad para acceder a muestras de tejido pulmonar adecuado para la identificación de biomarcadores, debido a la invasividad de los procedimientos (por ejemplo, la broncoscopia), y la pobre sensibilidad de las pruebas (por ejemplo, aliento exhalado condensado, gases volátiles exhalados, aire espirado condensado, etc.), cuyas medidas están a menudo por debajo del nivel de detección, así como las dificultades de la normalización de las mediciones de fuentes menos invasoras (por ejemplo, esputo inducido)⁷. Estudios recientes han probado que la EPOC es una enfermedad sistémica, y esto ha producido un cambio en la orientación hacia el descubrimiento de biomarcadores en muestras de sangre⁴. Se sabe que en los sujetos con EPOC, la respuesta inflamatoria no se limita a los pulmones, sino que ocurre una inflamación de tipo sistémica, con circulación de mediadores de inflamación, de estrés oxidativo sistémico, neutrófilos y linfocitos activados, y el aumento de los niveles plasmáticos de proteínas de fase aguda inflamatoria⁸. La inflamación sistémica ha sido implicada en la patogénesis de la mayoría de las manifestaciones extrapulmonares de la EPOC, como la pérdida de peso, disfunción de los músculos esqueléticos, enfermedades cardiovasculares, la depresión, la osteoporosis, la reducción de la tolerancia al ejercicio, etc⁹. Los biomarcadores en suero o plasma son atractivos porque la sangre se obtiene con facilidad y sus mediciones pueden ser fácilmente estandarizadas. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue medir los niveles en suero de un grupo de proteínas implicadas en la inflamación, remodelación tisular y asociadas a tumor en un intento por identificar biomarcadores candidatos sistémicos de la EPOC.

2. PARTE EXPERIMENTAL

Sujetos

Se reclutaron 44 sujetos para este estudio, con los cuales se conformaron dos grupos: el primero fue de fumadores sanos (17) y el segundo de fumadores con EPOC (27). Tanto los pacientes con EPOC como los fumadores control, fueron previamente clasificados bajo el consenso de la Iniciativa Global para la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (GOLD). Las muestras recolectadas e información clínica de cada sujeto de estudio fueron etiquetadas con identificadores únicos para proteger la confidencialidad. Se registraron los datos del historial clínico, el examen físico, los valores de espirometría y radiografías de tórax, de todos los sujetos (Tabla 1). Los pacientes con EPOC recibieron un régimen de medicamentos acorde con la gravedad de la enfermedad. La función pulmonar se midió con un espirómetro portátil, (EasyOne; DDN Medical Technologies, Chelmsford, MA, EE.UU.). Se registró la relación entre: El Volumen Espiratorio Forzado al 1^{er} s (FEV1) y la Capacidad Vital Forzada (CVF).



VIII encuentro
Participación de la
Mujer
en la Ciencia



Para este estudio se obtuvo la aprobación del comité de ética correspondiente y todos los participantes firmaron el consentimiento informado.

Colección y procesamiento de la muestra

Se recolectaron diez ml de sangre venosa de cada sujeto en un tubo separador de suero y se procesaron inmediatamente por centrifugación a 3000 rpm, a temperatura ambiente, durante 10 min. El suero se alícuotó y se almacenó a -70°C para su posterior análisis.

Cuantificación de las Proteínas

Las proteínas metaloproteínasa de matriz-1 (MMP-1), metaloproteínasa de matriz-9 (MMP-9), activador de plasminógeno tipo urocinasa (UPA), transferrina (TF), alfa 1-antitripsina (AT), haptoglobina (HPT), antígeno de cáncer 125 (CA-125), antígeno carcinoembrionario (CEA), fragmento de citoqueratina 19 (Cyfra 21-1), enolasa específica de neuronas (NSE), apolipoproteína AI (APO AI), proteína de unión a retinol (RBP), proteína C reactiva (PCR) y YKL-40, fueron medidas en el suero de todos los sujetos, con pruebas de ELISA tipo sandwich, utilizando kits comercialmente disponibles y de acuerdo a las instrucciones de los fabricantes. La absorbancia especificada en el protocolo de cada kit se midió en un espectrofotómetro de microplacas (Bio-Rad Laboratories, Filadelfia, PA). Las concentraciones de las proteínas de cada muestra fueron calculadas utilizando el software Master Plex 2010.

Análisis Estadístico

Los datos fueron analizados usando la prueba no paramétrica de Mann-Whitney con el paquete estadístico SigmaStat versión 8.0; un valor de $p < 0.05$ fue considerado significativo.

3. RESULTADOS

Tabla 1. Datos clínicos y demográficos de pacientes con EPOC y fumadores sanos.

	Fumadores Sanos	Fumadores con EPOC
No. Sujetos	17	27
M/H	11/6	12/15
Edad, años	44.83±10.77	70.11 ± 9.9
Tabaquismo paq/año	10.06± 10.46	40.86 ± 23.67
FEV1/FVC% (post-broncodilatador)	>70%	<70%
Exposición Humo leña + tabaquismo	1	10
Presencia de Nódulos	0	2

M/H= Mujeres/Hombres; los valores representan la mediana de cada grupo ± la desviación estándar.

Se midió la concentración de 14 proteínas en el suero de pacientes con EPOC y en individuos fumadores control. El análisis estadístico de los datos de concentración de las proteínas, arrojó que los niveles séricos de MMP-9, NSE, CA-125, Haptoglobina, MMP-1, CEA, UPA, AT, Cyfra 21-1, RBP y CRP no fueron estadísticamente diferentes, entre los dos grupos de estudio ($p > 0.05$; Tabla 2).



Tabla 2. Análisis estadístico comparando la concentración de los biomarcadores entre fumadores sanos y fumadores con Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica.

	Cohorte Completa		p-Valor
	Fumadores Sanos(n=17)	EPOC (n=27)	
	Mediana (min-max)	Mediana (min-max)	
MMP-9 (ng/ml)	615.03 (363.78-846.77)	450.22 (155.29-995.11)	0.202
NSE (ng/ml)	6.08 (3.74-14.95)	6.74 (3.88-87.70)	0.410
CA-125 (U/ml)	6.77 (0.01-19.42)	6.92 (2.11-298.04)	0.109
Haptoglobina (µg/ml)	2797.8 (765.4-6031.2)	2252.2 (331.2-15583.0)	0.360
MMP-1 (ng/ml)	6.03 (0.08-23.15)	8.00(2.41-30.41)	0.728
CEA (ng/ml)	0.47 (0.04-3.71)	0.75 (0.14-34.16)	0.144
UPA (ng/ml)	1.22 (0.35-29.08)	1.42 (0.42-147.13)	0.728
Alfa-1 Antitripsina (µg/ml)	950.8 (414.88-1365.52)	915.6 (340.48-2914.0)	0.643
Cyfra 21-1 (ng/ml)	1.07 (0.86-1.38)	1.03 (0.78-17.64)	0.926
RBP (µg/ml)	27.64 (23.15-37.28)	25.44 19.97-44.45)	0.050
CRP (ng/ml)	7679.75 (40.0-23146.8)	15681.6 (585-24678.9)	0.129
Transferrina (µg/ml)*	6713.3 (1301-13525.2)	13909.2 (8350.0-26675.2)	<0.001
YKL-40 (ng/ml)*	103.93 (72.0-281.7)	223.588 (81.1-409.7)	<0.001
APO AI (µg/ml)*	2432.15 (1481.09-10226.88)	3854.37 (1723.38-18978.77)	<0.001

*Proteínas que se presentan en mayor concentración en el grupo de EPOC con diferencia estadística significativa (valor p<0.05).

Por su parte, los niveles de concentración de las proteínas TF, APO AI y YKL-40 fueron estadísticamente diferentes (valor p<0.05), presentándose más elevados en el grupo de pacientes con EPOC, que en el grupo de fumadores sanos (Tabla 2, Fig. 1).

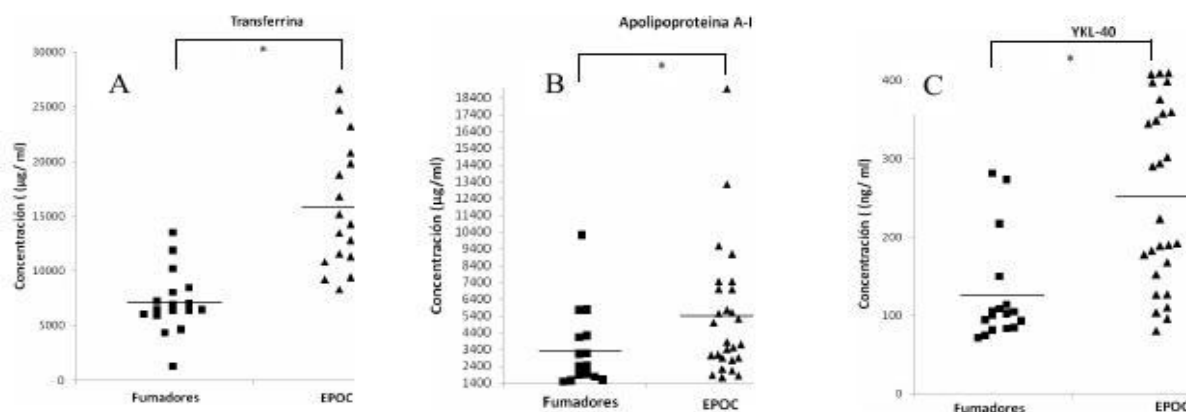


Fig. 1. Niveles en suero de TF, APO AI y YKL-40 en pacientes con EPOC y fumadores control. Los valores de las medias se representan con barras horizontales. Los asteriscos indican diferencias significativas (p<0.001).



VIII encuentro
Participación de la
Mujer
en la Ciencia



4. CONCLUSIONES

En el presente estudio se demostró una diferencia en la concentración sérica de las proteínas YKL-40, TF y APO AI, siendo ésta más elevada en pacientes con EPOC que en fumadores sanos. Estas proteínas, que hasta el momento han sido utilizadas como indicadores del estado nutricional de los individuos, pudieran también servir como marcadores sistémicos de estrés oxidativo en pacientes con EPOC, papel que es apoyado por la evidencia acumulada recientemente. Es necesario evaluar estos hallazgos en una población más amplia para que estas proteínas puedan ser propuestas y validadas como posibles candidatos a biomarcadores sistémicos para la EPOC, y que en un futuro puedan emplearse en la clínica como soporte a los métodos de diagnóstico ya establecidos como la gasometría, radiografías de tórax y espirometría.

BIBLIOGRAFÍA

1. – P.J. Barnes, "Chronic obstructive pulmonary disease", N. Engl. J. Med., Vol.343, 2000, pp. 269-280.
2. – J.C Hogg, "Pathophysiology of airflow limitation in chronic obstructive pulmonary disease", Lancet.,Vol. 364, 2004, pp. 709-721.
- 3.-C. Murray, A. Lopez "Evidence-based health policy lessons from the global burden of disease study" Science., Vol.274,1996, pp740-43.
4. – DD. Sin, J. Vestbo "Biomarkers in chronic obstructive pulmonary disease", Proc Am Thorac Soc., Vol.6, 2009,pp.5433-5.
- 5.- A.M.Meneses, R. Perez- Padilla, R. Jardim, A. Muiño, M.V. López, G. Valdivia, M. Montes de Oca, C. Talamo, P. Challal, C. Victoria,"Chronic obstructive pulmonary disease in five latin American cities (the PLATINO study): a prevalence study", Lancet.,Vol.366, 2005, pp.185-188
6. – E. Hnizdo, T. Singh, G.J. Churchyard, "Chronic pulmonary function impairment caused by initial and recurrent pulmonary tuberculosis following treatment", Thorax., Vol.55, 2000, pp. 32-8
- 7.- M. Cazzola, W. MacNee, F.J. Martinez, K.F. Rabe, L.G. Franciosi, P.J. Barnes, V. Brusasco, P.S. Burge, P.M. Calverly, B.R. Celli, et al., "Outcomes for COPD pharmacological trials: from lung function to biomarkers", Eur Respir J., Vol.31, 2008, pp.416-469.
8. - W.Q. Gan, S.F. Man, A. Senthilselvan, DD.Sin, "Association between chronic obstructive pulmonary disease and systemic inflammation: a systematic review and a meta- analysis", Thorax., Vol.59, pp. 574-80.
- 9.- A.A. Eid, A.A. Lonescu, L.S.Nixon, V. Lewis-Jenkins, S.B. Matthews, T.L. Griffiths, D.J.Shale, "Inflammatory response and body composition in chronic obstructive pulmonary disease", Am J Respir Crit Care Med., Vol.164, 2001, pp. 414-418.

Búsqueda de biomarcadores sistémicos para la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica, mediante la cuantificación de proteínas inflamatorias, de Remodelación de Tejido y Asociadas a Tumor en Pacientes con EPOC y Fumadores Activos

M. G. González^{a*}, J. M. Flores^a, G. Leal^a, F. Sánchez^b, M. Padilla^c, M. Martínez^a

ANTECEDENTES Y OBJETIVO

La EPOC se caracteriza por una limitación progresiva al flujo aéreo, asociada a una respuesta inflamatoria anormal de los pulmones a gases o partículas tóxicas inhaladas, siendo el tabaquismo el principal factor etiológico¹. Se encuentra entre las 10 principales causas de morbilidad y mortalidad en el mundo, con más de 600 millones de personas afectadas y cerca de 3 millones de muertes por esta enfermedad al año. En América Latina, en el año 2005 causó un número estimado de 95,000 muertes². En México, la EPOC es una enfermedad sobresaliente por su morbi-mortalidad, con una prevalencia de 7.8% en personas mayores de 40 años de edad. Sin embargo, permanece subdiagnosticada, no sólo en los estadios tempranos de la enfermedad, sino también en los tardíos. El espirómetro, el instrumento con el que se diagnostica la EPOC, es poco utilizado, y además se ha comprobado que el utilizar exclusivamente el índice espirométrico, puede conducir tanto a un sobrediagnóstico en mayores de 50 años, como a un subdiagnóstico en adultos jóvenes³.

El objetivo de este estudio fue medir los niveles en suero de un grupo de proteínas implicadas en la inflamación, remodelación tisular y asociadas a tumor en un intento por identificar biomarcadores candidatos sistémicos de la EPOC.

DISEÑO EXPERIMENTAL

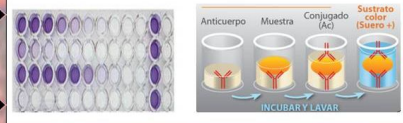
Obtención de Muestras



Procesamiento de las Muestras



Cuantificación de las Proteínas



Análisis Estadístico

RESULTADOS

Tabla 1. Datos clínicos y demográficos de pacientes con EPOC y fumadores sanos

	Fumadores Sanos	Fumadores con EPOC
No. Sujetos	17	27
M/H	11/6	12/15
Edad, años	44.83±10.77	70.11 ± 9.9
Tabaquismo paq/año	10.06± 10.46	40.86 ± 23.67
FEV1 /FVC% (post-broncodilatador)	>70%	<70%
Exposición Humo leña + tabaquismo	1	10
Presencia de Nódulos	0	2
M/H= Mujeres/Hombres; los valores representan la mediana de cada grupo ± la desviación estándar.		

Agradecimiento: Fondo Sectorial de Investigación en Salud y Seguridad Social SSA/IMSS/ISSSTE-CONACYT 2008-1-87628.

^aCentro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco/Unidad de Biotecnología Médica y Farmacéutica, Guadalajara, Jalisco, México, ^bHospital Civil de Guadalajara "Fray Antonio Alcalde" Hospital General Regional No. 46



Tabla 2. Análisis estadístico comparando la concentración de los biomarcadores entre fumadores sanos y fumadores con Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica.

	Cohorte Completa		p-Valor
	Fumadores Sanos(n=17)	EPOC (n=27)	
MMP-9 (ng/ml)	615.03 (363.78-846.77)	450.22 (155.29-995.11)	0.202
NSE (ng/ml)	6.08 (3.74-14.95)	6.74 (3.88-87.70)	0.410
CA-125 (U/ml)	6.77 (0.01-19.42)	6.92 (2.11-298.04)	0.109
Haptoglobina (µg/ml)	2797.8 (765.4-6031.2)	2252.2 (331.2-15583.0)	0.360
MMP-1 (ng/ml)	6.03 (0.08-23.15)	8.00(2.41-30.41)	0.728
CEA (ng/ml)	0.47 (0.04-3.71)	0.75 (0.14-34.16)	0.144
UPA (ng/ml)	1.22 (0.35-29.08)	1.42 (0.42-147.13)	0.728
Alfa-1 Antitripsina (µg/ml)	950.8 (414.88-1365.52)	915.6 (340.48-2914.0)	0.643
Cyfra 21-1 (ng/ml)	1.07 (0.86-1.38)	1.03 (0.78-17.64)	0.926
RBP (µg/ml)	27.64 (23.15-37.28)	25.44 (19.97-44.45)	0.050
CRP (ng/ml)	7679.75 (40.0-23146.8)	15681.6 (585-24678.9)	0.129
Transferrina (µg/ml)*	6713.3 (1301-13525.2)	13909.2 (8350.0-26675.2)	<0.001
YKL-40 (ng/ml)*	103.93 (72.0-281.7)	223.588 (81.1-409.7)	<0.001
APO AI (µg/ml)*	2432.15 (1481.09-10226.88)	3854.37 (1723.38-18978.77)	<0.001

*Proteínas que se presentan en mayor concentración en el grupo de EPOC con diferencia estadística significativa (valor p<0.05).

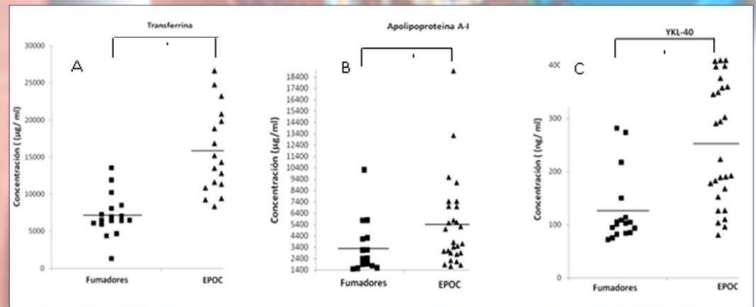


Fig. 1. Niveles en suero de TF, APO AI y YKL-40 en pacientes con EPOC y fumadores control. Los valores de las medias se representan con barras horizontales. Los asteriscos indican diferencias significativas (p<0.001).

CONCLUSIONES

Se encontraron diferencias en las concentraciones séricas de las proteínas YKL-40, TF y APO AI, siendo éstas más elevadas en pacientes con EPOC que en fumadores sanos. Estas proteínas, que hasta el momento han sido utilizadas como indicadores del estado nutricional de los individuos, pudieran también servir como marcadores sistémicos de estrés oxidativo en pacientes con EPOC, papel que es apoyado por la evidencia acumulada recientemente. Es necesario evaluar estos hallazgos en una población más amplia para que estas proteínas puedan ser propuestas y validadas como posibles candidatos a biomarcadores sistémicos para la EPOC, y en un futuro puedan emplearse en la clínica como soporte a los métodos de diagnóstico ya establecidos.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- P.J. Barnes, "Chronic obstructive pulmonary disease", N. Engl. J. Med. Vol.343, 2000, pp. 269-280.
- 2.- D.B. Sin, J. Vestbo "Biomarkers in chronic obstructive pulmonary disease", Proc Am Thorac Soc., Vol.6, 2009, pp.5433-5.
- 3.- A.M. Meneses, R. Perez- Padilla, R. Jardim, A. Mujío, M.V. López, G. Valdivia, M. Montes de Oca, C. Talamo, P. Challal, C. Victoria, "Chronic obstructive pulmonary disease in five latin American cities (the PLATINO study): a prevalence study", Lancet, Vol.366, 2005, pp.185-188