

FACULTAD DE MEDICINA
PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOCENCIAS



**VNiVERSiDAD
D SALAMANCA**

**ESTUDIO DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS Y
SUSCEPTIBILIDAD A DESARROLLAR ENFERMEDAD
PULMONAR OBSTRUCTIVA CRÓNICA**

Soraya Jodra Sánchez

2017

DON MIGUEL BARRUECO FERRERO, PROFESOR TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA Y JEFE DEL SERVICIO DE NEUMOLOGÍA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO DE SALAMANCA Y **DON ROGELIO GONZÁLEZ SARMIENTO**, CATEDRÁTICO DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA,

CERTIFICAN:

Que el trabajo titulado “**Estudio de polimorfismos genéticos y susceptibilidad a desarrollar Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica**” que presenta la Licenciada en Medicina Doña Soraya Jodra Sánchez, ha sido realizado bajo nuestra dirección, y reúne, a nuestro juicio, originalidad y contenidos suficientes para que sea presentado ante el tribunal correspondiente y optar al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, y a los efectos oportunos, se expide el presente certificado en Salamanca a 25 de octubre de 2017.



Fdo: Prof. Dr. Miguel Barrueco Ferrero



Fdo: Prof. Dr. Rogelio González Sarmiento

AGRADECIMIENTOS

A los doctores Miguel Barrueco Ferrero y Rogelio González Sarmiento, del Departamento de Medicina de la Universidad de Salamanca, directores de esta tesis, por brindarme sus conocimientos, sus consejos y depositar en mí su confianza.

Al doctor Jacinto Ramos González, del Servicio de Neumología del Hospital Universitario de Salamanca, ya que sin su generosidad este trabajo no habría sido posible.

A Javier Martín Vallejo por todo su trabajo estadístico y por sus rápidas respuestas cuando las he necesitado.

A Ricardo Usategui Martín y Elena Bueno Martínez por su paciencia en el laboratorio.

A los pacientes que participaron en el estudio.

A mis padres, Lidia y Luis, porque gracias a ellos he llegado hasta aquí, tanto en lo personal como en lo profesional, a mi tía Piedi y al resto de mi familia, sin olvidar a los que persisten en nuestro recuerdo.

A Paco por robarme una sonrisa todos los días.

A mis amigas, que aun en la distancia, seguimos estando igual de unidas que el primer día.

Con especial cariño a mi tío Adrián

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	13
1.1 Situación actual del problema	15
1.2 Definición	15
1.3 Factores de riesgo	16
1.4 Diagnóstico	17
1.5 Fenotipos	18
1.6 Tratamiento	20
1.7 Etiopatogenia	21
1.7.1 Citocinas	27
1.7.2 Quimocinas	31
1.7.3 Factores de crecimiento	33
1.7.4 Proteasas	34
1.7.5 Antiproteasas	34
1.8 Genética	35
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	41
3. PACIENTES Y MÉTODO	45
3.1 Diseño y ámbito del estudio	47
3.2 Población de estudio y selección de pacientes	47
3.3 Procesamiento y análisis de datos	48
3.3.1 Estudio del gen de IL-4,IL-8 y CHRNA5	52
3.3.2 Estudio del gen de GSTM1	53
3.4 Procesamiento y análisis de resultados	54
4. RESULTADOS	57
4.1 Variables sociodemográficas	59
4.1.1 Edad	59
4.1.2 Género	60

4.1.3 Índice de tabaquismo acumulado	60
4.1.4 Volumen espirado en el primer segundo	62
4.1.5 Alfa 1 antitripsina	63
4.1.6 Otras variables clínicas	64
4.2 Estudio genético	65
4.2.1 IL-4	65
4.2.2 IL-8	67
4.2.3 CHRNA5	69
4.2.4 GSTM1	70
5. DISCUSIÓN	77
5.1 Discusión del método	79
5.2 Análisis de la muestra	80
5.3 Análisis genético	84
6. CONCLUSIONES	89
7. BIBLIOGRAFÍA	93
8. ANEXOS	113

INTRODUCCIÓN

1.1 SITUACIÓN ACTUAL DEL PROBLEMA

La Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC) constituye una causa destacada de morbilidad y mortalidad con un importante impacto económico. Actualmente representa la cuarta causa de muerte y se estima que en el año 2020 ocupará el tercer puesto^{1,2}.

Su prevalencia se ha incrementado notablemente en los últimos años. Según la actualización de la Global Burden of Disease (GBD) del año 2010 existe un incremento del número de personas con EPOC: desde la anterior cifra de 210 millones de personas con EPOC en todo el mundo en 1990, a la de 328 millones (168 millones en varones y 160 millones en mujeres) en 2010³. En España el estudio EPI-SCAN publicado en 2007, reveló que entre los 21,4 millones de españoles con una edad situada entre 40 y 80 años hay 2.185.764 que presentan EPOC: 1.571.868 varones y 628.102 mujeres⁴. Dado que según el mismo estudio se estima que el 73% está sin diagnosticar, puede afirmarse que más de 1.595.000 españoles aún desconocen que padecen EPOC y, por tanto, no reciben ningún tratamiento para su enfermedad⁵. Actualmente se encuentra en marcha en nuestro país un nuevo estudio EPI-SCAN, en el que participa nuestro equipo de trabajo, que permitirá actualizar estas cifras.

La EPOC es una enfermedad crónica y progresiva, que supone un coste social e individual elevado, tanto en consumo de recursos sanitarios, como en pérdida de calidad de vida relacionada con la salud (CVRS) de los pacientes. La estimación de los costes de la EPOC en España, revisados en el documento *Estrategia en EPOC del Sistema Nacional de Salud* del Ministerio de Sanidad y Consumo del año 2009, fue de 750-1.000 millones de euros/año. El coste medio directo por paciente con EPOC se encuentra entre 1.712 y 3.238 euros/año⁶, según el grado evolutivo de la enfermedad.

1.2 DEFINICIÓN

La actualización de la Guía Española de la EPOC (GesEPOC) de 2017, recientemente publicada en **Archivos de Bronconeumología**⁷, define la EPOC como “*una enfermedad respiratoria caracterizada por síntomas persistentes y limitación crónica al flujo aéreo, causada principalmente por el tabaco. La limitación al flujo aéreo se suele manifestar en forma de disnea y, por lo general, es progresiva. La EPOC suele presentarse con otros*

síntomas respiratorios como la tos crónica acompañada o no de expectoración. La EPOC se caracteriza también por la presencia de agudizaciones y por la frecuente presencia de comorbilidades que pueden contribuir a la gravedad en algunos pacientes”. The Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) en su revisión de 2017 la define como a “common, preventable and treatable disease that is characterized by persistent respiratory symptoms and airflow limitation that is due to airway and/or alveolar abnormalities usually caused by significant exposure to noxious particles or gases”¹.

Esta constante revisión de la definición de la enfermedad dificulta en numerosas ocasiones la comparación de resultados entre estudios realizados en paciente con EPOC en diferentes periodos de tiempo.

1.3 FACTORES DE RIESGO

Aunque en su definición incluye la exposición a diversas partículas y gases nocivos, el consumo de tabaco sigue siendo el principal factor de riesgo para el desarrollo de EPOC. Ya en los años 50 del pasado siglo comenzaron a publicarse distintos trabajos que exponían la posible relación causal entre el tabaco y las enfermedades respiratorias⁸⁻¹⁰. Su relación de causalidad ha sido establecida a través de numerosos estudios prospectivos de cohortes y entre ellos merecen destacarse el publicado por la *British Medical Research Council* (1977)¹¹, el del *Doll et al* (1994)¹² y el *Framingham Heart Study Offspring* (2009)¹³.

Se estima que el riesgo absoluto de desarrollar EPOC entre fumadores está entre el 25 y el 30% y que el riesgo es proporcional al consumo acumulado de tabaco¹⁴. Otras causas de desarrollo de la EPOC son la exposición involuntaria al humo de tabaco¹⁵, el contacto con combustión de biomásas¹⁶, la contaminación atmosférica¹⁷, la exposición ocupacional¹⁸, la tuberculosis pulmonar¹⁹ y factores genéticos, todas ellas bien establecidas, excepto los determinantes genéticos que son objeto de investigación en los últimos años y constituyen una recomendación para la investigación en la EPOC de la *American Thoracic Society* y la *European Respiratory Society* en su documento “An official American Thoracic Society/ European Respiratory Society statement: research questions in COPD”²⁰ y que son objeto también de esta tesis doctoral.

1.4 DIAGNÓSTICO

El diagnóstico clínico de sospecha ha de considerarse en todas las personas adultas con exposición a factores de riesgo, básicamente el consumo regular de tabaco (con una exposición de al menos 10 paquetes/año) que presentan tos crónica, con o sin producción de esputo, o disnea. La disnea es el síntoma principal de la enfermedad y el que mayor pérdida de calidad de vida produce. Habitualmente el paciente con EPOC es, o ha sido fumador, durante un tiempo prolongado y refiere el comienzo de sus síntomas a partir de los 35 años.

La espirometría constituye un elemento básico para su diagnóstico, ya que permite confirmar la presencia de limitación al flujo aéreo. Es una prueba no invasiva, sencilla, barata, estandarizada, reproducible y objetiva. Su técnica requiere unas condiciones que garanticen su calidad para que los resultados tengan valor clínico.

El diagnóstico de la EPOC se basa en la disminución del flujo espiratorio, medido a través del volumen espirado en el primer segundo (FEV_1) y su cociente con la capacidad vital forzada (FVC) (FEV_1/FVC). Se considera que hay obstrucción al flujo aéreo si el cociente FEV_1/FVC postbroncodilatación es inferior a 0.7. Los objetivos de la espirometría en la evaluación inicial del paciente son la confirmación del diagnóstico de sospecha y evaluar la gravedad de la obstrucción al flujo aéreo. En la figura 1 se muestra el algoritmo diagnóstico de la EPOC⁷. El resto de pruebas diagnósticas necesarias para completar el estudio del paciente EPOC se detalla en la tabla 1.

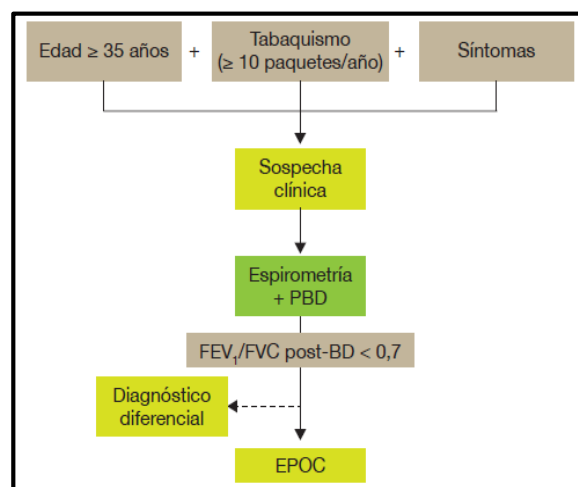


Figura 1.- Algoritmo de sospecha diagnóstica en EPOC (Tomada de GesEPOC 2017⁷). PBD: prueba broncodilatadora.

Tabla 1.- Pruebas complementarias en el estudio de la EPOC (Tomada de GesEPOC 2017⁷).

Nivel de riesgo	Pruebas diagnósticas
N1: bajo riesgo	Espirometría forzada Pruebas complementarias básicas: • Radiografía de tórax • Analítica básica con alfa-1 antitripsina • Saturación arterial de oxígeno
N2: alto riesgo	Añadir las siguientes pruebas: • Volúmenes pulmonares, DLCO • Prueba de esfuerzo: 6MWT • TC torácica Caracterización fenotípica: • Identificar fenotipo clínico Precisar riesgo pronóstico: • Índices multidimensionales: BODE o BODEx

DLCO: capacidad de difusión de monóxido de carbono; 6MWT: prueba de marcha de 6 minutos; TC: tomografía computerizada.

Para la evaluación de la disnea se recomienda la escala modificada del Medical Research Council (mMRC) que clasifica la disnea en 5 grados (tabla 2)²¹.

Tabla 2.- Escala de disnea mMRC²¹.

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

1.5 FENOTIPOS

Durante muchos años el FEV₁ ha constituido la piedra angular en la caracterización de esta enfermedad, pero la EPOC es una enfermedad muy heterogénea, por lo que no es posible describirla utilizando exclusivamente el FEV₁. En los últimos años ha adquirido cada vez más importancia la denominación de fenotipo para referirse a distintas formas clínicas de los pacientes con EPOC.

La importancia de establecer estos fenotipos es que el tratamiento se dirigirá según las características propias de cada paciente permitiendo un enfoque más personalizado del tratamiento. GesEPOC, publicada en 2012, reconoce cuatro fenotipos clínicos en función

principalmente de la sintomatología y de las exacerbaciones²², aspectos que conserva en su nueva actualización de 2017⁷ (figura 2):

- *EPOC no agudizador con enfisema o bronquitis crónica*: se caracteriza por presentar como máximo un episodio de agudización moderada (que ha requerido tratamiento con corticoides sistémicos y/o antibióticos) al año. Es un paciente de menor riesgo de deterioro de su calidad de vida, de pérdida de función pulmonar y de mortalidad que el fenotipo agudizador.
- *Solapamiento asma-EPOC (ACO: Asthma-COPD Overlap)*: en la práctica clínica es relativamente frecuente encontrar pacientes con características comunes a ambas enfermedades. Este grupo de pacientes presentan más síntomas, peor calidad de vida y mayor riesgo de exacerbaciones aunque mejor supervivencia (en los pacientes tratados con glucocorticoides inhalados)²³. El algoritmo diagnóstico se detalla en figura 3.
- *EPOC agudizador con enfisema*: ha presentado 2 o más agudizaciones al menos de moderada gravedad el año previo, separadas al menos por un mes o un ingreso hospitalario. Son pacientes con escasa (o sin) expectoración crónica, con disnea de esfuerzo y con tendencia a presentar un índice de masa corporal reducido.
- *EPOC agudizador con bronquitis crónica*: presencia de tos con expectoración al menos 3 meses al año durante 2 años consecutivos. Al igual que el fenotipo previo presentaría 2 o más agudizaciones al menos de moderada gravedad, o un ingreso hospitalario. Se debe descartar la presencia de bronquiectasias.

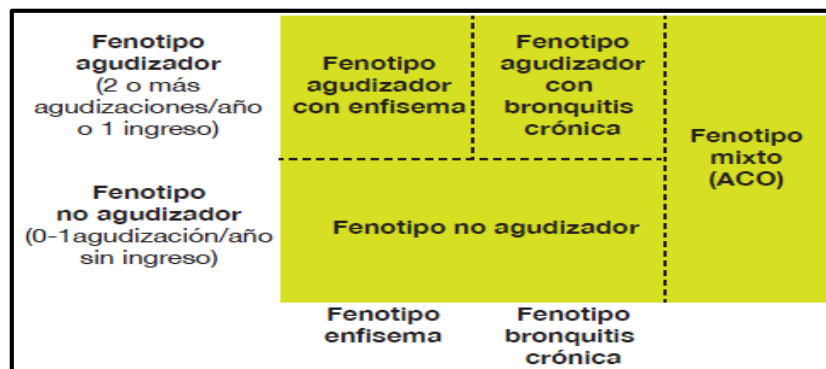


Figura 2.- Fenotipo clínicos de la EPOC (Tomada de GesEPOC 2017⁷)

Estos criterios diagnósticos, aceptados en las dos principales Guías de Práctica Clínica: GOLD y GesEPOC, aunque con algunas particularidades en cada una de ellas, están

permanentemente en revisión y se comienza a plantear la existencia de otros fenotipos que pudieran individualizar aún más el diagnóstico y tratamiento de la EPOC, aunque sin perder de vista el impacto que pudiera tener el conocer inequívocamente el papel de la genética y la epigenética en el desarrollo de la EPOC y, por tanto, en la prevención y tratamiento de la misma. No obstante, como hemos señalado con anterioridad, en el momento actual ambas disciplinas son objeto de investigación.

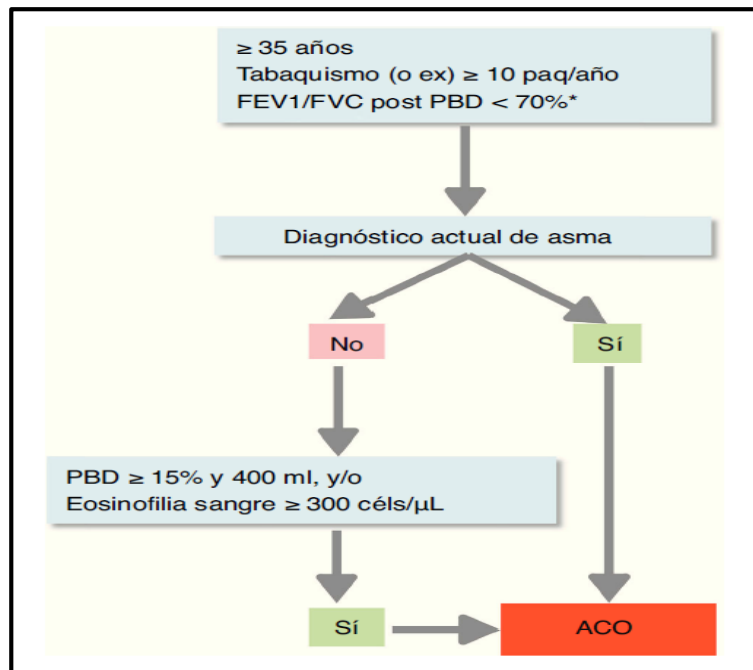


Figura 3.- Confirmación diagnóstica de ACO (Tomada de GesEPOC 2017⁷).

1.6 TRATAMIENTO

Los objetivos generales del tratamiento de la EPOC consisten en reducir los síntomas crónicos de la enfermedad, disminuir la frecuencia y la gravedad de las agudizaciones y mejorar el pronóstico. El tratamiento integral de la EPOC debe contemplar la intervención terapéutica sobre el tabaquismo como medida prioritaria, tanto medidas psicológicas como farmacológicas, es decir el denominado tratamiento multicomponente.

El importante desarrollo farmacológico en los últimos años, junto con la caracterización de los distintos fenotipos clínicos, ha permitido disponer de diferentes opciones de tratamiento y una mayor personalización de los mismos. La base del tratamiento de la EPOC estable son los broncodilatadores (agentes antimuscarínicos de acción larga-LAMA o agonistas beta-2 adrenérgicos de acción prolongada-LABA) y el

broncodilatador de acción corta de rescate, y en función del fenotipo, se añadirán otro tipo de fármacos: doble broncodilatación, corticoides inhalados, teofilinas y/o roflumilast⁷.

1.7 ETIOPATOGENIA

El estudio de esta enfermedad no es algo reciente, ya en 1821 *Laënnec* (inventor del estetoscopio) describió el enfisema en su libro “*Treatise of disease of the chest*” (figura 4). Realizó cuidadosas disecciones de pacientes a los que había estudiado a lo largo de su vida, observando que los pulmones enfisematosos estaban hiperinsuflados y no se vaciaban adecuadamente. Aunque en esta época el tabaco no era muy frecuente, Laënnec comprobó que en pacientes no fumadores, el enfisema se podía encontrar en individuos con predisposición familiar y con factores ambientales de riesgo; además, describió la combinación de enfisema y bronquitis crónica.

Durante los siguientes años predominaron las teorías mecánicas. Entre algunos autores cabe destacar a *Hutchinson* (1846), inventor de la espirometría, que medía exclusivamente la capacidad vital (figura 5), *Osler* (1916) con su teoría de la excesiva presión dentro del alveolo y *Tiffeneau* y *Pinelli* (1947), que añadieron el concepto de maniobra espiratoria forzada y el volumen máximo exhalado en un segundo tras una inspiración profunda.

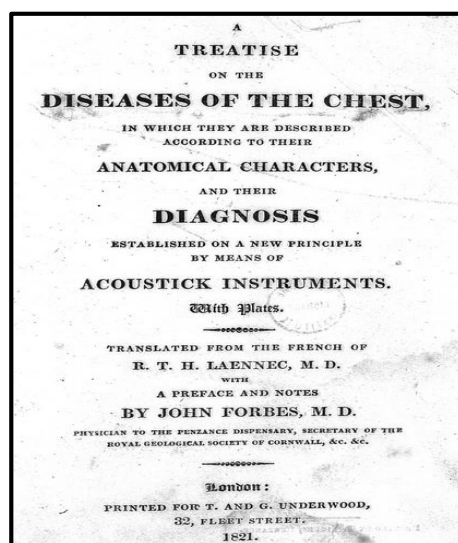


Figura 4.-“*Treatise of disease of the chest*”

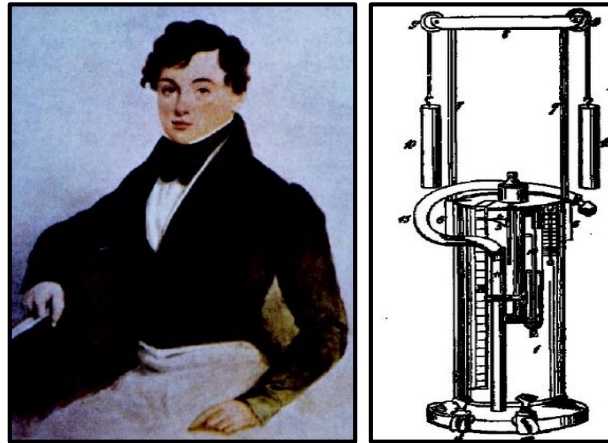


Figura 5.- John Hutchinson y su espirómetro.

Ya a finales de los años cuarenta del pasado siglo comienzan a tomar forma otras teorías acerca de los posibles mecanismos etiopatogénicos de la EPOC. *Geever* (1947) habló de los cambios en la vasculatura pulmonar en pacientes con silicosis, afirmando que el lecho capilar se encontraba reducido por la fibrosis, la arteria pulmonar adelgazada por la proliferación de tejido conectivo y que algunas de esas arterias, como en el caso de la tuberculosis, estaban trombosadas y recanalizadas. En 1950 *Liebow* propuso un modelo de atrofia vascular en el enfisema y ya en esa década comenzaron a publicarse distintos trabajos que exponían la posible relación causal entre el tabaco y las enfermedades respiratorias^{9,10}. En 1968 *Hogg* fue el primero en establecer que la limitación al flujo aéreo en la EPOC es debida a un proceso inflamatorio de las vías aéreas periféricas²⁴.

Como ya se ha expuesto con anterioridad, entre el 20-25% de los fumadores desarrollarán la enfermedad, lo que nos hace suponer la existencia de un componente multifactorial que incluye tanto elementos ambientales como una susceptibilidad individual; de ahí el interés creciente en conocer los mecanismos celulares y moleculares que permitan abordarla desde una perspectiva etiopatogénica .

En el desarrollo y progresión de la EPOC intervienen toda una serie de procesos interrelacionados que pueden sintetizarse en los siguientes puntos: *a)* la exposición crónica al humo del tabaco recluta células inflamatorias a los espacios aéreos del pulmón; *b)* las células inflamatorias liberan mediadores inflamatorios con capacidad elastolítica que degradan la matriz extracelular, y *c)* los mecanismos de reparación alveolar están alterados, lo que da lugar a la destrucción de los espacios alveolares característica del enfisema pulmonar.

La integración de estos hallazgos, junto con el papel del estrés oxidativo y el desequilibrio entre proteasas y antiproteasas, dentro de un sistema en movimiento activado por las fuerzas mecánicas que expanden el pulmón durante el ciclo respiratorio, que podrían colaborar en la destrucción del parénquima pulmonar, es la base actual que sustenta el conocimiento actual de la etiopatogenia de la EPOC²⁵ (figura 6).

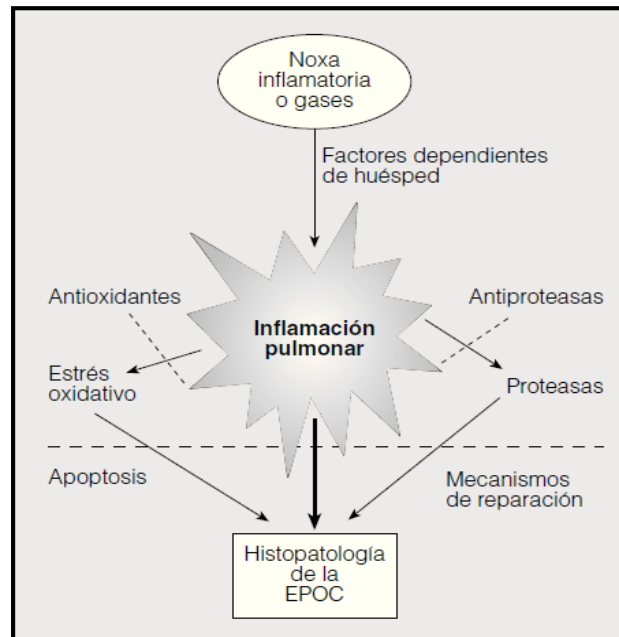


Figura 6.- Etiopatogenia de la EPOC (tomada de Cosío²⁵)

El humo del tabaco contiene miles de sustancias químicas que incluyen altas concentraciones de oxidantes y de radicales libres. A pesar que en el organismo hay una batería de sistemas antioxidantes, que controlan la producción de oxidantes y sus potenciales efectos negativos, el humo del cigarro provoca un desequilibrio entre oxidantes y antioxidantes y conduce al sistema a una situación de estrés oxidativo^{26,27}.

La primera línea de defensa contra los oxidantes inhalados la conforma el fluido de revestimiento del tracto respiratorio. Este fluido contiene agentes antioxidantes, como el ácido ascórbico, el glutatión o el ácido úrico²⁸. Sin embargo, la exposición al humo del tabaco produce cambios importantes en la homeostasis del glutatión provocando un aumento de la permeabilidad de la barrera, lo que favorece el paso de los productos tóxicos derivados del tabaco al intersticio pulmonar²⁹.

La lesión que produce la inhalación del humo del tabaco desarrolla una respuesta rápida e inespecífica inflamatoria inicial, que se desencadena de manera innata, pero que no desarrollará inmunidad ni protección a largo plazo. En esta respuesta los macrófagos serán la primera línea de defensa. Fagocitan y destruyen las noxas diversas y se eliminan por el arrastre ciliar del epitelio respiratorio. En este punto también intervienen neutrófilos y células epiteliales. En los fumadores se ha observado un incremento de la población de macrófagos y neutrófilos en las vías respiratorias como respuesta a las toxinas del humo del tabaco. Esta acumulación de macrófagos se correlaciona con la gravedad y la progresión de la enfermedad, lo que indica un papel importante de estas células en la patogenia de la EPOC³⁰⁻³².

Los macrófagos y los neutrófilos son la fuente principal de secreción de diversas sustancias que, en conjunto, tienen capacidad para degradar la matriz extracelular. Entre los productos liberados por los macrófagos y neutrófilos se encuentran especies de oxígeno reactivo, factores quimiotácticos, citocinas inflamatorias, proteasas, constrictores del músculo liso, activadores de las glándulas mucosas y metaloproteasas, que facilitan la migración de otros leucocitos a los tejidos dañados y amplifican la respuesta inflamatoria, favoreciendo la activación del sistema inmune adaptativo³³⁻³⁵ (figuras 7 y 8).

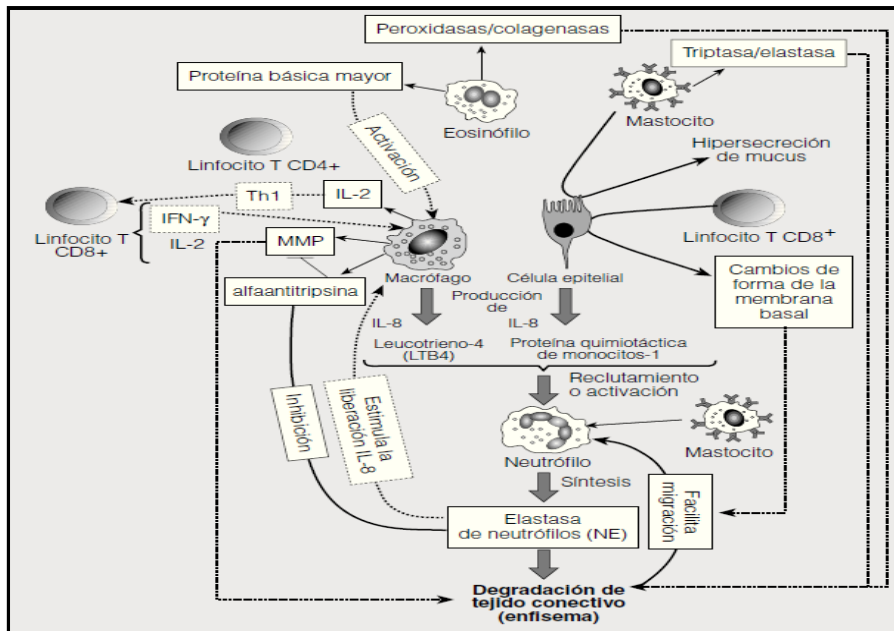


Figura 7.- Células inmunitarias participantes en la EPOC (tomada de Núñez-Naveira L y cols³⁴).

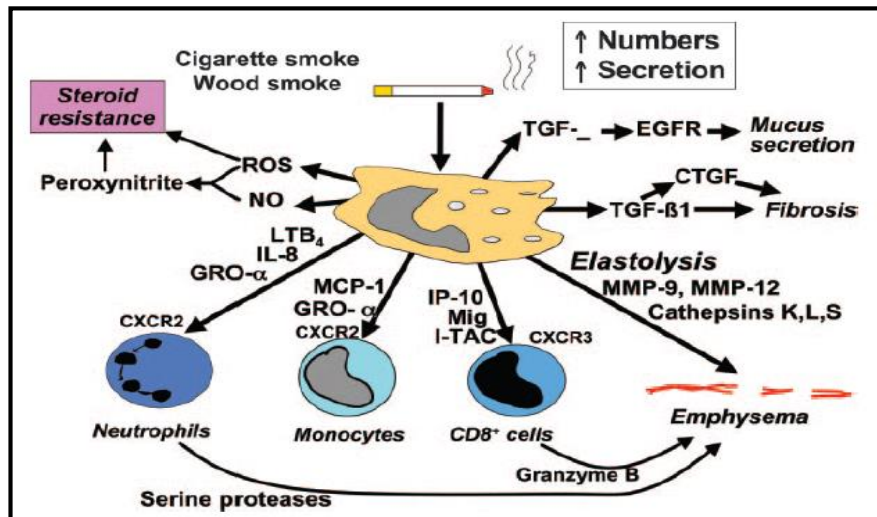


Figura 8.- Papel del macrófago en la EPOC (tomada de Barnes³⁵).

Durante mucho tiempo se ha considerado que la respuesta inmunitaria innata era la dominante en la patogenia de la EPOC, principalmente gracias al conocimiento obtenido sobre la biología de los macrófagos y los neutrófilos, y su capacidad para segregar enzimas que digieren componentes intersticiales del parénquima pulmonar. Ésto fortaleció la teoría clásica sobre la etiopatogenia de la EPOC basada en el desequilibrio “proteasa-antiproteasa”, según la cual el enfisema pulmonar es resultado de la digestión elastolítica de la matriz extracelular debido a las proteasas, cuya acción puede no ser debidamente contrarrestada, ya sea por déficit genético de antiproteasas, por liberación excesiva de proteasas por células inflamatorias, o bien por una combinación de ambos; pero ya existe más que evidencia suficiente de la participación de una respuesta inmunológica adquirida implicada también en este proceso inflamatorio.

Este proceso se inicia cuando las células dendríticas inmaduras alertan al sistema inmune adquirido de la presencia de estos productos de lesión tisular. Estas células se dirigen a los ganglios linfáticos locales donde presentan los antígenos a los linfocitos T los cuáles se diferencian a linfocitos T cooperadores CD4+ tipo 1 (Th1, *T helper-1*), que a su vez producen Interferón- γ (IFN- γ)^{36,37}.

Por otro lado, es probable que las células lesionadas, necróticas y apoptóticas de los pulmones de los fumadores, sean absorbidas por las células dendríticas y presentadas por éstas a las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I y a los linfocitos T citotóxicos CD8+, linfocitos abundantes en los pulmones de pacientes con EPOC. Los linfocitos T CD8+ pueden dañar el tejido mediante una acción citolítica

directa o a través de la secreción de citocinas proinflamatorias, entre las que se encuentran el IFN- γ , IP-10 (*interferon-inducible protein-10*) y MIG (*monokine induced by IFN- γ*).

Los linfocitos T CD4+ también aparecen en la EPOC, centrando su acción sobre todo en amplificar la señal inflamatoria. Los linfocitos T citotóxicos CD8+ son las células predominantes de la EPOC, presentes en las vías respiratorias grandes y pequeñas, en las arterias pulmonares y en el parénquima pulmonar. El número de linfocitos T CD8+ y T CD4+ que expresan IFN- γ en el pulmón se correlaciona con el grado de obstrucción al flujo aéreo y enfisema, lo que sugiere que estas células causan lesiones tisulares en la EPOC.

El reclutamiento y la activación de las células inflamatorias, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, linfocitos T CD4+, linfocitos T CD8+ y linfocitos B progresa a medida que empeora la EPOC. Como resultado de todos estos procesos inflamatorios, el tejido sufre una remodelación en las vías respiratorias pequeñas y alvéolos que engrosa la pared de dichas vías, lo que reduce su diámetro, aumenta su resistencia al flujo, destruye los alvéolos y agranda los espacios aéreos³⁸⁻⁴².

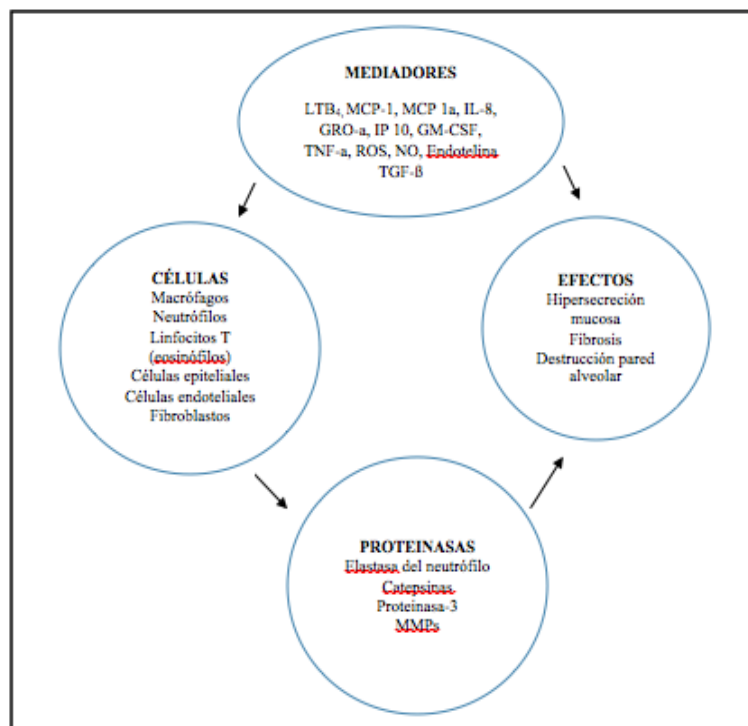


Figura 9.- Esquema mediadores inflamatorios (adaptada de Barnes³⁵).

Del mismo modo, se ha observado que en la circulación sistémica también tiene lugar un incremento de células inflamatorias, citocinas y un aumento del estrés oxidativo. De esta manera, queda patente que el desarrollo de la EPOC tiene mucho que ver con los efectos sistémicos que se manifiestan posteriormente en pacientes con esta enfermedad⁴³ (figura 9).

Los mediadores que orquestan todo el fenómeno inflamatorio se dividen en: citocinas, quimocinas, factores de crecimiento, proteasas y antiproteasas (tabla 3).

Tabla 3.- Principales mediadores inflamatorios en la EPOC (adaptado de *Del Puerto y cols*⁴²).

MEDIADOR	FUNCIÓN
CITOCINAS	
TNF- α	Central en el desencadenamiento de respuesta inflamatoria
IL-1 β	Favorece secreción de quimocinas
INF- γ	Activa vías de proteólisis
IL-4	Regula respuesta inmunológica. Inductor secreción mucosa
IL-6	Regula la respuesta inmunológica. Actividad pro y antiinflamatoria
IL-9	Potente inductor de secreción mucosa
GM-CSF	Inflamación neutrofílica
IL-10	Potente antiinflamatorio
IL-13	Potente inductor de secreción mucosa
QUIMOCINAS	
IL-8	Potente factor quimiotáctico neutrófilos
GRO- α	Factor quimiotáctico neutrófilos
MCP-1	Factor quimiotáctico de monocitos y macrófagos
CXC3	Favorece respuesta inmune
Quimocina selectiva de eosinófilos	Reclutar eosinófilos
ENA 78	Aumenta la adhesión de neutrófilos a la superficie endotelial
FACTORES DE CRECIMIENTO	
TGF- β 1	Interviene en la fibrogénesis
EGF	Regulación secreción mucosa
VEGF y Factor de crecimiento fibroblástico	Remodelado vascular
PROTEASAS/ANTIPROTEASAS	

1.7.1 CITOCINAS

Las citocinas son un grupo de proteínas de bajo peso molecular, con concentraciones de nano o picomoles y de vida media muy corta. Son producidas por diversos tipos celulares que actúan, fundamentalmente, como reguladores de las respuestas inmunitaria e inflamatoria, principalmente los macrófagos y los linfocitos T colaboradores (T_H). Asimismo, intervienen como factores de crecimiento de distintas células, entre las cuáles y de forma destacada, están las células hematopoyéticas. Las citocinas actúan como reguladores sistémicos mediante la unión a receptores de alta afinidad presentes en la superficie de la propia célula productora (efecto autocrino), en otros tipos celulares que se encuentran en su vecindad (efecto paracrino) y en algunos casos pueden liberarse a la

circulación sanguínea o linfática, ejerciendo su efecto en otros órganos y tejidos, actuando así como las hormonas (efecto endocrino) (Figura 10).

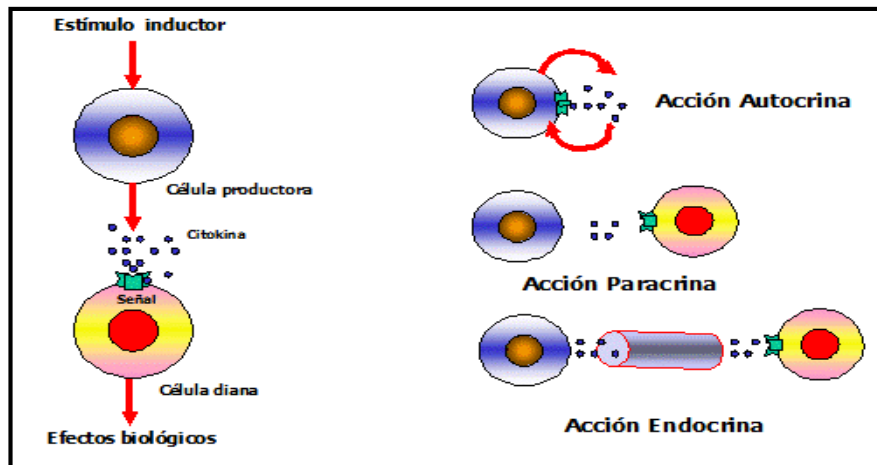


Figura 10.- Efecto autocrino, paracrino y endocrino de las citocinas.

Las citocinas poseen importantes características funcionales:

- **Pleiotropismo:** una misma citocina es capaz de ejercer efectos biológicos diferentes al actuar sobre distintos tipos celulares.
- **Redundancia:** varias citocinas pueden contribuir al desarrollo de la misma función en un determinado tipo celular.
- **Sinergismo:** dos o más citoquinas producen un efecto que se potencia mutuamente.
- **Antagonismo:** inhibición o bloqueo mutuo de sus efectos.

En cualquier caso, la actuación biológica de las citocinas se produce a través de su interacción con receptores de membrana específicos, que desencadenan una cascada de reacciones bioquímicas en el interior de la célula diana, determinando su acción biológica.

Su importancia es crucial para que las respuestas inmunitarias, innata y adaptativa se desarrollen con normalidad. Además, algunas de ellas están también implicadas en la embriogénesis, el desarrollo de órganos y muchas son importantes reguladores, tanto positivos como negativos, de acontecimientos celulares como la mitosis, la diferenciación, la migración, la supervivencia, la muerte celular o apoptosis e, incluso, de su transformación maligna⁴⁴. Las citocinas más destacadas relacionadas con la EPOC son las siguientes:

- **Interleucina (IL) 4:** esta citocina fue clonada por primera vez en 1986 en células T murinas y fue conocida inicialmente como factor de inducción Ig G1⁴⁵. Tiene su origen principalmente en linfocitos T activados, pero también puede ser producida por mastocitos, basófilos y eosinófilos⁴⁶. Interviene de forma decisiva en la inducción de las células Th2 que regulan la inmunidad humoral. También se ha comprobado que IL-4 induce secreción mucosa⁴⁷.

La susceptibilidad genética a la hiperreactividad bronquial se relaciona con el cromosoma 5q31-q33. Los genes que codifican la IL-4, entre otras interleuquinas, están localizados en este cromosoma, demostrando su relación con la hiperrespuesta bronquial^{48,49}.

Ya en 1996 se demostró que la reactividad a la metacolina es un importante predictor de progresión de obstrucción en fumadores con EPOC⁵⁰. Estudios posteriores demostraron que la hiperrespuesta de la vía aérea constituía un predictor de mortalidad⁵¹. Los eosinófilos constituyen una fuente de producción de IL-4 y han demostrado su implicación terapéutica y pronóstica en la EPOC⁵²⁻⁵⁵.

Un correcto balance entre las citocinas pro y antiinflamatorias es importante para la adaptación y la rehabilitación en los pacientes con EPOC. El establecimiento de un patrón proinflamatorio puede agravar las condiciones del paciente y/o reducir la adaptación física al entrenamiento.

Basado en estas consideraciones, el estudio de *Dorneles et al* midió los niveles de esta interleuquina antes y después de la realización de test de marcha de seis minutos en pacientes con EPOC con diferentes niveles de gravedad según los criterios GOLD de 2007, evidenciando un incremento significativo en los niveles de esta interleucina respecto al test de la marcha inicial en EPOC graves y muy graves⁵⁶.

- **Factor de necrosis tumoral α (TNF- α):** el TNF- α se produce fundamentalmente por monocitos, macrófagos y linfocitos. Conocido por su efecto antitumoral a través de un doble mecanismo, que incluye la inhibición de la angiogénesis y el aumento de la respuesta inmunitaria antitumoral⁵⁷, acción en la que actúa sinérgicamente con el IFN- γ . Es bien conocido el papel que desempeña en la etiopatogenia de la EPOC

mediante su actividad proinflamatoria, promoviendo, manteniendo y liberando más mediadores celulares⁵⁸. Por otro lado, el TNF- α actúa como mediador en el desarrollo de la caquexia en EPOC⁵⁹.

La relación entre esta enfermedad y la pérdida de función muscular es bien conocida. El TNF- α juega un papel importante en este aspecto, ya que elevadas concentraciones han demostrado asociarse a una pérdida de fuerza en tríceps y cuádriceps⁶⁰.

Varios polimorfismos de esta citoquina se han relacionado con la patogénesis de la EPOC, principalmente el polimorfismo -308 G>A. En diferentes estudios este polimorfismo se ha asociado con una mayor susceptibilidad para desarrollar EPOC y una afectación más grave⁶¹.

- **IL-1 β** : la IL-1 es un polipéptido de unos 15-20 kDa del que existen dos formas, denominadas IL-1 α e IL-1 β , con una homología de apenas el 26%. IL-1 es el principal pirógeno endógeno, induciendo fiebre a través de la producción de prostaglandinas. IL-1 β presenta una acción similar al TNF- α , es un potente activador de macrófagos alveolares y se ha asociado con mayor frecuencia de exacerbaciones fomentando el círculo vicioso entre previas y futuras agudizaciones⁶².
- **INF- γ** : los interferones son un amplio grupo de proteínas caracterizadas por tener una potente acción antiviral y antineoplásica, así como por su efecto regulador de las células del sistema inmunitario. El IFN- γ inhibe la proliferación de células de tipo Th2, induce la expresión de los antígenos leucitarios humanos (HLA) de clase I y II y aumenta la actividad citolítica de células T citotóxicas. Su sobreexpresión en pulmones de ratones provocan enfisema⁶³ y su expresión está aumentada en biopsias bronquiales de pacientes EPOC⁶⁴.
- **IL-6**: tiene su origen en diversos tipos celulares, entre los que destacan macrófagos, monocitos, fibroblastos y células endoteliales. Interviene regulando la respuesta inmunológica, hematopoyesis y en las reacciones de fase aguda. Tiene, a la vez, efectos proinflamatorios y antiinflamatorios. Sus concentraciones están elevadas en el esputo, lavado broncoalveolar (LBA) y en el condensado del aire exhalado, principalmente en las exacerbaciones⁶⁵.

- **IL-9:** potente inductor de la secreción mucosa mediante el aumento de la expresión del gen MUC5AC⁶⁶ y relacionado con la respuesta inmune⁶⁷.
- **Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF):** en LBA de pacientes EPOC estable están elevados los niveles pero aún más durante las exacerbaciones⁶⁸. Juegan un papel importante en la inflamación neutrofílica.
- **IL-10:** importante citoquina antiinflamatoria. Bloquea la expresión y producción de numerosas citoquinas proinflamatorias. Su concentración está reducida en el esputo de pacientes EPOC⁶⁹. Posee un potencial terapéutico en EPOC por su efecto antiinflamatorio^{70,71}.
- **IL-13:** su expresión está aumentada en biopsias bronquiales de fumadores con hipersecreción mucosa comparada con los no fumadores, lo que podría deberse a que IL-13 es un potente estimulador de la secreción mucosa⁷². Recientes estudios plantean que puede ser una posible diana terapéutica⁷³.

1.7.2 QUIMOCINAS

Las quimocinas son un conjunto de proteínas de muy bajo peso molecular (de 8-10 kDa), con una homología de entre el 20 y el 50% en su secuencia de aminoácidos y pertenecientes a la familia de las citoquinas. Su principal función es la quimiotáctica. Existen familias diferentes basadas en la posición de cuatro residuos de la cisteína.

- **IL-8:** es un potente factor quimiotáctico para los neutrófilos, favoreciendo su degranulación y estimulando la fagocitosis. Sus niveles están marcadamente elevados en el esputo inducido⁷⁴, en el LBA y en exacerbaciones en pacientes con EPOC^{75,76}, y se correlaciona con el aumento de proporción de neutrófilos, incrementándose en pacientes con enfisema debido a déficit de alfa 1 antitripsina (A1AT)⁷⁷.

Niveles elevados de IL-8 se relacionan con una disminución de niveles de FEV₁ y un incremento de los niveles de disnea⁷⁸⁻⁸⁰ y también se ha encontrado elevadas concentraciones en pacientes EPOC hospitalizados con debilidad muscular⁸¹.

Las células epiteliales y los macrófagos alveolares de los pacientes con EPOC producen más IL-8 que los fumadores sin EPOC. Esta estrecha relación entre IL-8, neutrófilos y EPOC ha sugerido que puede ser una posible diana terapéutica. Ya en 2004 *Mahler et al* publicaron un ensayo clínico consistente en la administración de un anticuerpo monoclonal frente a IL-8, donde se evidenció una mejoría de la disnea en pacientes EPOC, aunque no se encontraron diferencias en cuanto a función pulmonar y test de la marcha⁸².

Al revisar la literatura no son muchos los estudios que han analizado el rol de distintos polimorfismos en la IL-8 y EPOC, además en la mayoría no se han detectado hallazgos significativos⁸³⁻⁸⁵.

- **Growth-Related Oncogene α (GRO- α):** secretado por macrófagos alveolares y las células epiteliales en respuesta a la estimulación con TNF- α y IL-17⁸⁶. En pacientes con EPOC se segregan mayores cantidades de esta quimocina⁸⁷, y sus concentraciones están elevadas en esputo inducido y LBA respecto a fumadores no EPOC y no fumadores⁸⁸.
- **Proteína quimiotáctica de monocitos (MCP-1):** es un potente agente quimiotáctico de monocitos y macrófagos en la EPOC. Sus concentraciones están elevadas en el esputo y el LBA de los pacientes con EPOC⁸⁹.
- **CXC3 quimocina:** las células T en vías aéreas periféricas de pacientes EPOC muestran un aumento de expresión de CXC3, un receptor activado por la proteína inducible por INF γ , monoquina inducida por INF- γ y el interferón inducible de células T α quimioatrayente. Estas tres quimocinas activan CXC3 pero el último lo hace con una mayor afinidad⁹⁰. Los macrófagos alveolares tienen la capacidad de producir las tres⁹¹.
- **Quimocina selectiva de eosinófilos:** los eosinófilos no son las células predominantes en la EPOC, aunque han tomado un papel fundamental en el fenotipo ACO²³. Se ha observado un aumento de éstos en el esputo, LBA y en exacerbaciones de pacientes con EPOC⁹².

- **Péptido 78 activador de neutrófilos derivado de células endoteliales (ENA 78):** agente quimiotáctico de neutrófilos. Sus niveles no se han visto elevados en fumadores ni en enfisema⁹³.

1.7.3 FACTORES DE CRECIMIENTO

Son un conjunto de sustancias, la mayoría proteínas, que desempeñan un papel importante en la comunicación intercelular, principalmente actuando sobre el ciclo celular:

- **Factor de crecimiento transformante β (TGF β 1):** su expresión está aumentada en las células epiteliales de las vías aéreas pequeñas de pacientes con EPOC y juega un papel importante en la fibrosis de estas vías⁹⁴. Induce la liberación del factor de crecimiento del colágeno (CTGF), quien media la respuesta fibrótica⁹⁵. TGF β 1 regula receptores β adrenérgicos reduciendo una marcada respuesta a broncodilatadores en células musculares in vitro⁹⁶. El polimorfismo en la región codón del promotor T869C se ha asociado con un efecto protector para desarrollar EPOC⁹⁷.
- **Factor de crecimiento epidérmico (EGF):** participa en la regulación de la secreción mucosa⁹⁸. La inhibición de su receptor podría ser una potencial diana para el tratamiento de la hipersecreción mucosa en pacientes con EPOC.
- **Factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF):** regulador del crecimiento vascular y, por tanto, implicado en el remodelado de la vasculatura pulmonar y en la vasoconstricción hipóxica en la EPOC⁹⁹. Su concentración se encuentra aumentada en el esputo de pacientes con bronquitis crónica, pero significativamente disminuida en pacientes con enfisema¹⁰⁰.
- **Factor de crecimiento fibroblástico:** el aumento de su expresión está relacionado con el remodelado vascular¹⁰¹.

1.7.4 PROTEASAS

Son enzimas que rompen los enlaces peptídicos de las proteínas. En el caso del pulmón principalmente de la elastina, favoreciendo la formación de enfisema. Paralelamente puede existir un desbalance con antiproteasas endógenas favoreciendo aún más la agresión pulmonar.

- **Elastasa del neutrófilo (NE):** la instilación traqueal en animales de NE induce enfisema e infiltración neutrofílica¹⁰². Existe aumento del cociente NE/A1AT en el LBA de pacientes EPOC¹⁰³, y se ha relacionado con el declive de FEV₁¹⁰⁴. La NE es un importante secretagogo mucoso de glándulas submucosas¹⁰⁵.
- **Cisteína proteasas:** están involucradas en la aparición de enfisema¹⁰⁶.
- **Metaloproteinasas de matriz (MMP):** han despertado gran interés en los últimos años. Han sido clasificadas en subclases según la especificidad del sustrato o componente de la matriz extracelular que degradan. Las principales MMPs que participan en el proceso inflamatorio y en la destrucción del parénquima pulmonar son *MMP1*, *MMP2* y *MMP9*¹⁰⁷.

1.7.5 ANTIPROTEASAS

Generalmente las proteasas son contrarrestadas por un aumento en la producción de antiproteasas endógenas. La mayor antiproteasa es la A1AT. Laurell y Erikson en 1963 descubrieran la asociación entre la carencia de A1AT y el enfisema¹⁰⁸, convirtiéndose así en el primer factor genético relacionado con el desarrollo de enfisema, y que a día de hoy, continua siendo la mutación más estudiada y conocida, con aplicación clínica en el tratamiento de estos pacientes. En torno al 1% de los pacientes con EPOC presenta este déficit. Entre otras antiproteasas nos encontramos con el inhibidor de la leucoproteasa secretora (SLPI) y el inhibidor tisular de MMP.

Por tanto, cualquier alteración estructural en los genes que median la etiopatogenia en la EPOC puede alterar este proceso y producir la enfermedad. Este hecho podría explicar la diferencia entre los fumadores que desarrollan EPOC y los que no la desarrollan.

1.8 GENÉTICA

En 1953 se produjo el descubrimiento por Watson y Crick de la estructura del ácido desoxirribonucleico (ADN, DNA por sus siglas en inglés) como una doble hélice formada por dos cadenas complementarias de nucleótidos con bases enfrentadas entre sí, de tal modo que la Adenina (A) se encuentra unida a la timina (T) mediante dos puentes de hidrógeno, y la guanina (G) a la citosina (C) por tres puentes de hidrógeno (figura 11)¹⁰⁹.

La función del genoma es transmitir información para la síntesis de proteínas de una generación a otra. La información para la síntesis de proteínas está contenida en unas unidades dentro del DNA que denominamos genes. Al analizar el genoma humano se ha comprobado que alrededor del 95% de los nucleótidos no contiene información para la síntesis de proteínas, es decir, no forman parte de los genes, o, lo que es lo mismo, que los genes que codifican proteínas ocupan menos del 5 % del genoma humano.

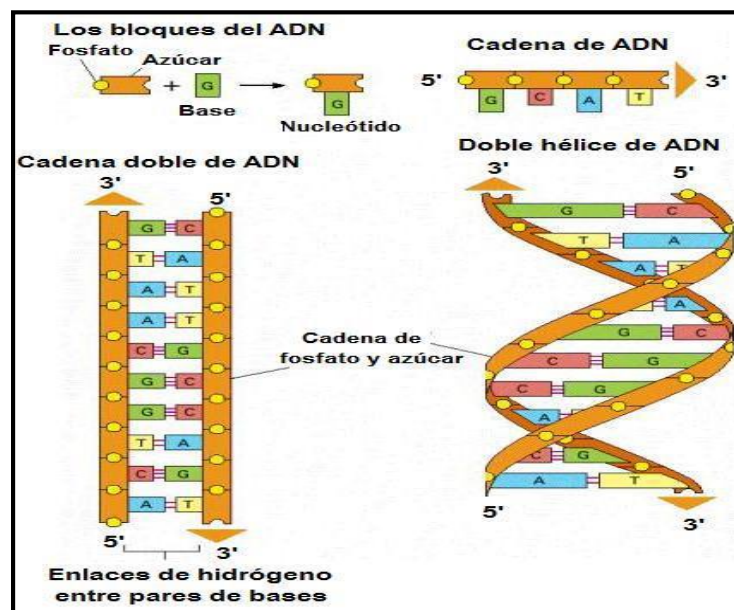


Figura 11.- Estructura del DNA.

Por otro lado, la secuencia de nucleótidos del DNA es dinámica y cambia de generación en generación. Estos cambios se denominan mutaciones y se producen por errores de la enzima encargada de duplicar el DNA cada vez que la célula se divide (DNA polimerasa), o por la acción de factores ambientales como la luz ultravioleta del sol o determinados agentes ambientales contaminantes. La mayoría de estas mutaciones no suelen modificar las proteínas del individuo y, por tanto, no tienen repercusión, ya que los genes constituyen menos del 5 % del DNA. Si las mutaciones tienen lugar en genes que

codifican proteínas imprescindibles para el correcto funcionamiento de las células, aparecen las enfermedades hereditarias y, cuando estas mutaciones aparecen en las células de un individuo adulto, pueden ser las responsables de enfermedades como el cáncer.

Aproximadamente el 99.9% de la secuencia del DNA de dos individuos diferentes es la misma. Una proporción significativa de las diferencias encontradas en los individuos, es decir, sus diferencias fenotípicas y/o susceptibilidades a ciertas enfermedades, radica en el 0.1% de variación.

Se denomina polimorfismo a las variaciones en la secuencia de las bases del DNA entre individuos de una población. A diferencia de las mutaciones patogénicas, los polimorfismos son variaciones normales en la secuencia de DNA entre unos individuos y otros, y son mucho más frecuentes que las mutaciones patogénicas¹¹⁰. Existen millones de polimorfismos que mayoritariamente afectan a un nucleótido (Single Nucleotide Polymorphism, SNP)¹¹¹. Cabe mencionar que la variabilidad fenotípica de cada individuo, así como la susceptibilidad o la resistencia individual a distintas enfermedades, radican principalmente en los SNP.

Los polimorfismos, al igual que las mutaciones, pueden consistir en la sustitución de un nucleótido por otro, en la inserción de uno o varios nucleótidos nuevos, o en la delección de nucleótidos previamente existentes. Según su localización los polimorfismos pueden incumbir a regiones codificantes o no codificantes del DNA:

- Aquellos que en las regiones codificantes producen un cambio de aminoácido, se denominan no sinónimos y son los que en mayor proporción alteran la función de la proteína y, por tanto, los más estudiados. Si este cambio introduce un codón de parada se denomina mutación “nonsense”, mientras que si codifica un nuevo aminoácido será una mutación de cambio de sentido, “missense”.
- Si la mutación al traducirse no produce ningún cambio en la secuencia aminoacídica se dice que es sinónima o “silent”. Las mutaciones de las zonas no codificantes son también importantes, porque pueden producir una alteración del splicing (empalme), o impedir la unión de factores de transcripción.

La idea de poder conocer los patrones genéticos que se encuentran detrás del desarrollo de las enfermedades y que son compartidos por individuos, familias y/o poblaciones es muy atractiva, ya que abre la posibilidad de identificar variaciones genéticas y procesos biológicos que son información fundamental para el avance en el conocimiento de la fisiopatología de las enfermedades, y la potencial aplicación de este conocimiento en el desarrollo de sistemas diagnósticos y posibles dianas terapéuticas.

Como es bien conocido, el consumo de tabaco sigue siendo el principal factor de riesgo para el desarrollo de EPOC. El tabaquismo es una enfermedad compleja y multifactorial en la que están implicados factores ambientales y genéticos.

La incidencia del factor genético como determinante del consumo de tabaco fue evaluada por primera vez por *Fisher et al* en 1958¹¹², quienes señalaron la posibilidad de la existencia de una relación entre genotipo, consumo de tabaco y cáncer de pulmón, sugiriendo la existencia de genes que durante la juventud predispondrían a las personas a ser fumadoras y que, más tarde, durante la edad adulta, podrían favorecer el desarrollo de cáncer de pulmón. Así, aunque inicialmente más ligado a la búsqueda del factor genético que relacionase tabaco y cáncer de pulmón, Fisher puso en marcha también el interés por descubrir la influencia del genotipo en el inicio, la consolidación y el mantenimiento del consumo de tabaco.

En este sentido se ha comprobado que la **subunidad alfa 5 del receptor nicotínico (CHRNA5)** participa en la composición de múltiples receptores nicotínicos^{113,114} que contribuyen a la estimulación de la liberación de dopamina en el núcleo estriado, una región implicada en vías de recompensa y que es crucial para el desarrollo de la dependencia nicotínica¹¹⁵. Diversos estudios ya han demostrado que los individuos con variaciones específicas en el gen del CHRNA5 tienen más posibilidades de ser dependientes de la nicotina, jugando dicho gen un papel importante en los efectos psicoactivos de la nicotina a corto y largo plazo.

En 2007, *Saccone et al*, demostraron que el polimorfismo rs16969968 ocasionaba una mayor dependencia a la nicotina¹¹⁶. Posteriormente distintos artículos han confirmado la asociación de rs16969968 con la condición de fumador^{117,118}, la dependencia a la nicotina^{119,120} y con la cantidad de cigarrillos fumados por día¹²¹.

Young y colaboradores en 2008 reclutaron sujetos caucásicos: 454 sujetos con cáncer pulmonar, 458 con EPOC y 488 controles fumadores con una historia tabáquica de al menos 15 paquetes/año. Demostró la asociación con la EPOC y, además, que el genotipo AA en este polimorfismo era más frecuente en pacientes con cáncer de pulmón y EPOC respecto a los controles (16%,14% y 9% respectivamente)¹²². Estudios más recientes han corroborado la asociación con EPOC^{123,124}.

Otros polimorfismos de este gen han sido relacionados con el riesgo para desarrollar EPOC. *Pillai et al* en 2009 demostraron que el alelo C del polimorfismo rs8034191 tenía un riesgo atribuible de 12,2% para el desarrollo de EPOC respecto a la población general¹²⁵ y *Wang et al*, en 2010, relacionaron el polimorfismo rs1051730 con el hábito tabáquico, la EPOC y también el cáncer de pulmón¹²⁶.

Como ya se ha expuesto anteriormente, el humo del tabaco contiene miles de sustancias químicas que incluyen altas concentraciones de oxidantes y radicales libre y, al menos, 70 son carcinógenas. En la metabolización de toxinas intervienen las glutatión-S-transferasas (GST) que constituyen una familia de enzimas que intervienen en la detoxificación celular y en la neutralización de carcinógenos. Ya en 1990, *Seidegard et al*, comunicaron una relación entre alteraciones en el gen de la **Glutatión Transferasa mu 1 (GSTM1)** con un mayor riesgo para desarrollar cáncer de pulmón entre fumadores¹²⁷, lo cual se siguió constatando en estudios posteriores años después¹²⁸ y continúa siendo foco de estudio actualmente¹²⁹⁻¹³¹.

No sólo se ha demostrado la asociación con el cáncer pulmonar y otros tipos de neoplasias, sino que también se ha demostrado la asociación con la EPOC. En 1997 *Harrison et al* estudiaron la frecuencia de la delección en la GSTM1 en fumadores con enfisema y cáncer de pulmón, comprobando que en el 65% de los pacientes con ambas patologías presentaban una mayor frecuencia de la delección¹³².

El estudio de *Jian-Qing et al* analizó polimorfismos en diferentes agentes antioxidantes y su asociación con la pérdida de función pulmonar. Cuando se estudiaron por separado, ninguno de los genotipos de las GST tuvieron relación estadísticamente significativa; sin embargo, cuando se analizaron las combinaciones genotípicas se observó que delecciones concurrentes de GSTT1 y GSTM1, con la presencia de genotipo GSTP1 AA, incrementaba el riesgo de presentar una pérdida acelerada de la función pulmonar en

fumadores, además que la homocigosis en GSTP1 AA y una historia familiar de EPOC, estaban asociadas también con un empeoramiento en la función pulmonar¹³³. *Kant Shukla et al* lo relacionaron con la presencia de EPOC en la edad media de la vida (45-65 años)¹³⁴. Un artículo publicado recientemente incluso plantea su determinación para el diagnóstico y como biomarcador de la enfermedad¹³⁵.

Un gran avance en los últimos años en el estudio de la genética lo ha constituido el estudio de asociación del genoma completo (en inglés, *GWAS (Genome-wide association study)* o *WGAS (Whole genome association study)*). Es un análisis de una variación genética a lo largo de todo el genoma humano con el objetivo de identificar su asociación a un rasgo observable. Los *GWAS* suelen centrarse en asociaciones entre los polimorfismos de SNPs y rasgos como las principales enfermedades.

El primer estudio realizado sobre *GWAS* sobre función pulmonar fue publicado en el año 2007 sobre la cohorte de Framingham. Se identificaron dos SNPs asociados con las medidas de función pulmonar, el receptor de IL-6 localizado en el cromosoma 1 y en el codón no sinónimo de la glutatión transferasa S omega 2 (*GSTO2*) localizado en el cromosoma 10¹³⁶.

Desde entonces, son cada vez más numerosos los estudios que se han realizado sobre *GWAS* y EPOC, los cuales apoyan la teoría de la susceptibilidad genética en esta enfermedad crónica¹³⁷⁻¹⁴³ y estimulan la investigación al respecto.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 HIPÓTESIS

Los polimorfismos de los genes de las citocinas IL-4 e IL-8 y de los genes CHRNA5 y GSTM1 pueden modificar la susceptibilidad a desarrollar EPOC.

2.2 OBJETIVO PRINCIPAL

Analizar la relación entre la EPOC y los polimorfismos en los genes que codifican las citocinas IL-4 e IL-8 y los genes CHRNA5 y GSTM1.

2.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Describir las características clínicas y epidemiológicas generales de los pacientes diagnosticados de EPOC en el Servicio de Neumología del Hospital Universitario de Salamanca en el año 2010.
2. Estudiar la posible relación existente entre el tabaco y las variantes polimórficas en los genes de las citocinas y los genes analizados.
3. A la vista de los resultados obtenidos, proponer medidas de intervención, en primer lugar, para la prevención de la EPOC en individuos genéticamente susceptibles.

PACIENTES Y MÉTODO

3.1 DISEÑO Y ÁMBITO DE ESTUDIO

Para alcanzar los objetivos planteados en este trabajo, se diseñó un estudio analítico, longitudinal, prospectivo de casos y controles. En un estudio de este tipo se identifica a un grupo de personas con una enfermedad (casos) y se les compara con un grupo apropiado que no tenga la enfermedad (controles). La relación entre uno o varios factores y la presencia de la enfermedad deberá estudiarse comparando la frecuencia de exposición entre los casos y los controles; si la frecuencia es mayor o menor en el grupo de casos que en los controles, podremos decir que hay una asociación entre la causa y el efecto.

3.2 POBLACIÓN DE ESTUDIO Y SELECCIÓN DE PACIENTES

La población del estudio está constituida por el conjunto de individuos que cumplen los criterios predeterminados y que es accesible al investigador como el conjunto de sujetos a estudiar. Está integrada por los pacientes fumadores mayores de 35 años que acudieron a la consulta externa de Neumología y que accedieron participar en el estudio. Finalmente quedó integrada por 234 pacientes.

- **Criterios de inclusión:** para nuestro estudio, todo paciente fumador activo mayor de 35 años que hubiera acudido a la consulta externa de Neumología era subsidiario de entrar en el estudio. Era indispensable la firma del consentimiento informado (anexo 1) siguiendo las normas legales para *Estudios Clínicos en España* y las del *Comité de Ética del Hospital Universitario de Salamanca*. El período de inclusión abarcó desde el 1 de enero hasta el 31 de diciembre de 2010.
- **Criterios de exclusión:** todos aquellos pacientes que cumpliendo los criterios de inclusión no firmasen el consentimiento informado.

La selección de los individuos, tanto de casos como de controles, se ha llevado a cabo en las consultas externas del Servicio de Neumología, del Hospital Universitario de Salamanca, desde el 1 de enero de 2010 hasta el 31 de diciembre de 2010.

A todos los pacientes incluidos en el estudio se les realizó una anamnesis detallada y las siguientes determinaciones:

1. Datos demográficos: edad y género.
2. Antecedentes familiares de EPOC.
3. Infecciones respiratorias frecuentes en la infancia.
4. Profesión de riesgo.
5. Consumo de tabaco cuantificado mediante el índice de paquetes/año (IPA), que se determina con la siguiente fórmula: número de cigarros día X años fumados / 20.
6. Prueba funcional respiratoria mediante espirometría con test broncodilatador: se ha analizado el cociente postbroncodilatador (postBD) FEV₁/FVC, el FEV₁ pre y postBD. Con este valor se determinó el grado de obstrucción según la American Thoracic Society/ European Respiratory Society¹⁴⁴.
7. Medición del grado de disnea mediante la escala MRC.
8. Datos analíticos: A1AT.

3.3 PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE DATOS

Se extrajo una muestra de 10 ml de sangre periférica mediante venopunción. Las células nucleadas se aislaron mediante centrifugación repetida y lisis eritrocitaria con solución hipotónica (centrifugación de la sangre total en 50 ml de agua bidestilada-ddH₂O- durante 30 minutos, a 4°C y a 1500 rpm). Tras la recuperación de la interfase y lisis de los glóbulos rojos con agua destilada, se lavaron las células mononucleadas en tampón *Fornace* (0.25M Sacarosa, 50mM Tris-HCl (pH: 7.5, 25mM KCl, 5mM MgCl₂) y se precipitaron mediante centrifugación a 580 g durante 20 minutos.

El botón de células nucleadas se resuspendió en tampón *Fornace* a una concentración estimada de 5x10⁶ células/mL, tras lo cual se añadió *EDTA* (ácido etilendiamino-tetracético, concentración final 10mM), SDS (dodecil-sulfato sódico, concentración final 1%) y *Proteinasa K* (Boehringer Mannheim, concentración final 50µg/mL). La mezcla se incubó a 55°C durante 8-16 horas, tras la cual se procedió a purificar el ADN con fenol y cloroformo. La concentración y el grado de contaminación proteica del DNA así obtenido se calculó tras medir la absorbancia a 260 y 280nm, respectivamente, en un espectrofotómetro (GeneQuant, Pharmacia) por medio de la siguiente fórmula:

$$\mu\text{g de ADN/ml} = (\text{D.O. } 260) \times (\text{factor de dilución}) \times (50)$$

D.O: desviación óptica. 50: factor de corrección incluido ya que la unidad de densidad óptica con una luz incidente de 260nm es el valor de absorbancia que tienen 50µg de DNA /mL.

El cociente D.O.260/D.O.280 se utiliza para determinar el grado de contaminación proteica, considerando como valores adecuados un cociente entre 1.65 y 2.0. Valores inferiores a los señalados indican contaminación por proteínas o por solventes orgánicos, realizándose en estos casos una purificación del DNA; valores superiores parecen indicar un exceso de RNA, el cual se eliminó tratando la solución de DNA con RNAsa y purificando nuevamente según el método anteriormente descrito.

La muestra de DNA, con una concentración aproximada entre 1,000 y 1,500 µg/mL, se almacenó en tubos *Eppendorf*® a -20°C, con el fin de evitar tanto la degradación progresiva del DNA como su posible contaminación por microorganismos.

La amplificación de fragmentos de DNA se realizó con los productos comerciales de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) Supermix (Gibco-BRL) y Master Mix (Promega) y se emplearon entre 1µL y 4µL de la mezcla de los dos oligonucleótidos flanqueantes y 1µL del DNA obtenido por el método reflejado con anterioridad (concentración = 0,1-0,2µg/mL).

Para asegurar que no existía contaminación y que las reacciones eran específicas para cada muestra de partida se preparó, como control, una reacción conteniendo todos los reactivos antes citados excepto DNA molde. Todas las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un termociclador automático y la manipulación post-PCR se realizó en un laboratorio distinto de donde se llevó a cabo la extracción del DNA. La discriminación alélica se llevó a cabo por dos procedimientos distintos, dependiendo del tipo de interleucina y del gen estudiado.

Discriminación alélica mediante PCR son sondas Taqman

Mediante este procedimiento se analizó los polimorfismos de los genes en IL-4, IL-8 y CHRNA5. En la PCR con sondas *Taqman* los procesos de amplificación y detección se producen de manera simultánea en el mismo vial cerrado, sin necesidad de ninguna acción posterior. Además, mediante detección por fluorescencia se puede medir durante la

amplificación la cantidad de DNA sintetizado en cada momento, ya que la emisión de fluorescencia producida en la reacción es proporcional a la cantidad de DNA formado. Esto permite conocer y registrar en todo momento la cinética de la reacción de amplificación.

Los termocicladores para llevar a cabo la PCR con sondas *Taqman* incorporan un lector de fluorescencia y están diseñados para poder medir en cualquier momento la fluorescencia emitida en cada uno de los viales donde se realice la amplificación.

Los sistemas de detección por fluorescencia empleados en la PCR con este tipo de sondas pueden ser de dos tipos: agentes intercalantes y sondas específicas marcadas con fluorocromo; para discriminación alélica se emplearon las segundas. Estas sondas de hibridación específica son oligonucleótidos marcados con un fluorocromo donador en el extremo 5' que emite fluorescencia al ser excitado, y un aceptor en el extremo 3', que absorbe la fluorescencia liberada por el donador. Para que esto ocurra, las moléculas donadora y aceptora deben estar espacialmente próximas. Además, el espectro de emisión de la primera se ha de solapar con el espectro de absorción de la segunda. En este ensayo los fluorocromos empleados fueron VIC y FAM.

Mientras esta sonda está intacta, la fluorescencia emitida por el donador es absorbida por el aceptor. Sin embargo, durante la amplificación del DNA diana la sonda se hibrida con su cadena complementaria. Al desplazarse a lo largo de la cadena, en su acción de síntesis, la DNA polimerasa de *Thermus aquaticus*, que tiene su actividad 5' exonucleasa, hidroliza el extremo libre 5' de la sonda, produciéndose la liberación del fluorocromo donador. Como donador y aceptor están ahora espacialmente alejados, la fluorescencia emitida por el primero es captada por el lector (figura 12).

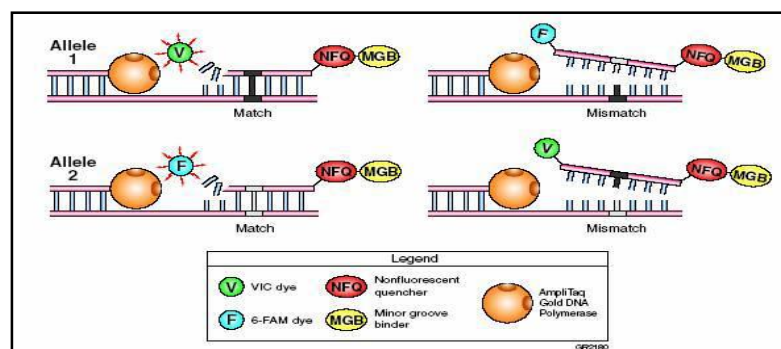


Figura 12.- Mecanismo de la PCR con sondas Taqman.

El incremento de DNA en cada ciclo se corresponde con un aumento de hibridación de las sondas, lo que conlleva un aumento en la misma proporción de la fluorescencia emitida.

El empleo de estas sondas garantiza la especificidad de la detección y permite identificar polimorfismos o mutaciones puntuales. Este estudio se realizó en un termociclador de Applied Biosystems, que dispone de varios canales de lectura y permite detectar la emisión de distintos fluorocromos a la vez. De esa manera, se pueden usar varias sondas marcadas con distintos fluorocromos, para identificar los distintos alelos descritos en cada uno de los genes estudiados (figura 13).

Discriminación alélica mediante digestión con nucleasas de restricción

Mediante este procedimiento se analizó GSTM1. Se incubaron 15µL de producto de PCR con 10 unidades de la endonucleasa de restricción correspondiente y 2µL de tampón de digestión a 37°C durante 6 horas. Posteriormente los alelos se identificaron mediante su visualización por electroforesis en gel de agarosa al 2,5% teñido con *Sybr Safe* (sustancia fluorescente). Ver figura 14.

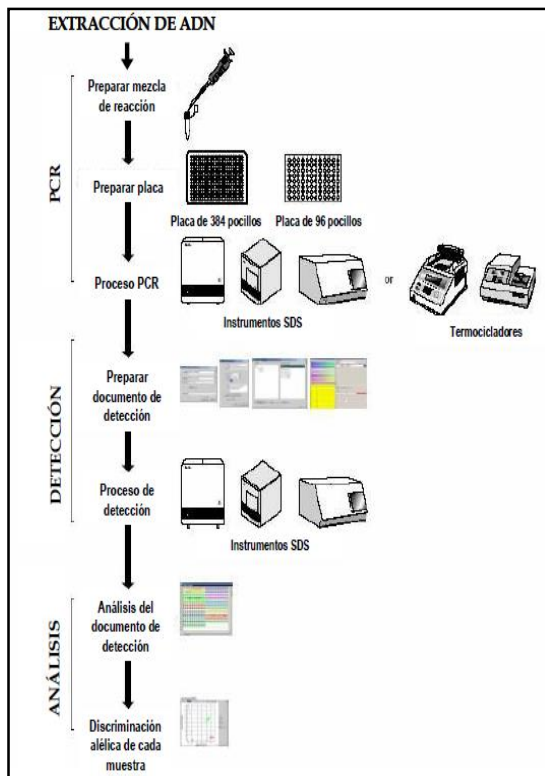


Figura 13.- Discriminación alélica mediante PCR con sondas Taqman.

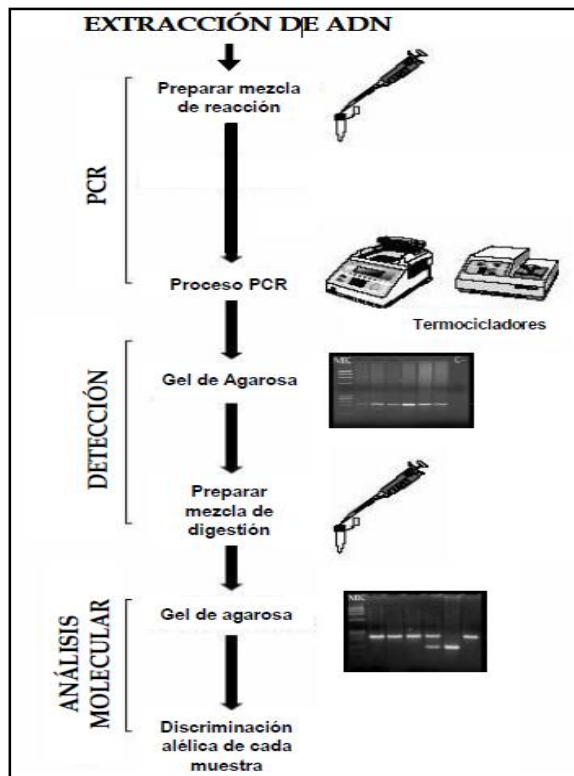


Figura 14.- Discriminación alélica mediante digestión con enzimas de restricción.

3.3.1 ESTUDIO DEL GEN DE LA IL-4, IL-8 y CHRNA-5

Se estudiaron mediante PCR con sondas Taqman los polimorfismos de los genes que codifican IL-4, IL-8 y CHRNA 5 (tabla 4):

IL-4: -33 C>T

IL-8: -352 A>T

CHRNA5: C.1392

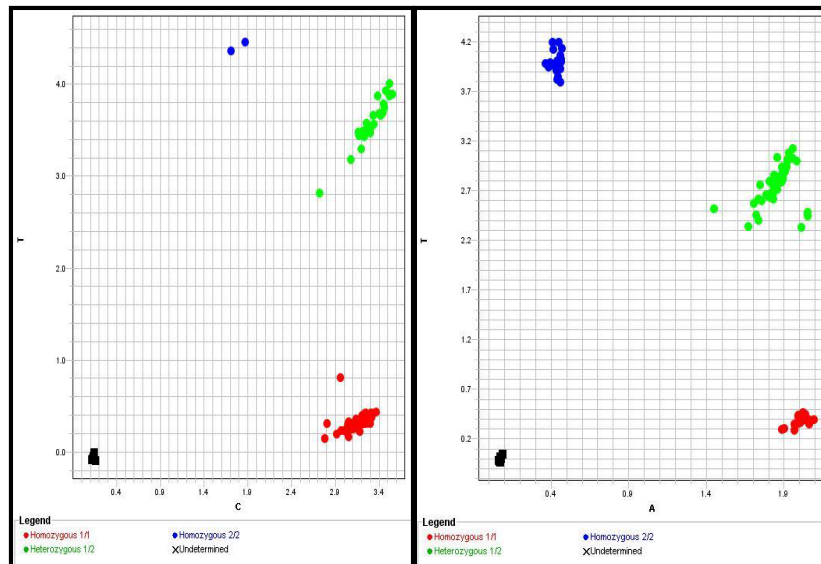
Tabla 4.- SNPs objeto de estudio.

GEN	SNP ID	REFERENCIA COMERCIAL	CAMBIO EN EL DNA	CAMBIO EN PROTEÍNA
IL-4	rs2070874	C__16176215_10	-33 C>T	-
IL-8	rs4073	C__11748116_10	-352 A>T	-
CHRNA5	rs16969968	C__26000428_20	1392 A>G	p.D398N

Para realizar la PCR se utilizó una mezcla de 5µL de Master Mix (Promega), 2.5µL de compuesto por sondas y oligonucleótidos (*Primers*), 42.5 µL de agua destilada (libre de nucleasas). De esa mezcla se extrajeron 9.5 µL a los que se añadieron 2 µL de DNA. Las condiciones empleadas se describen a continuación:

- **1 ciclo:** T^a 60°C durante 30 segundos, para la lectura del fondo de DNA.
- **50 ciclos:**
 - T^a 95°C durante 10 minutos.
 - T^a 92°C durante 15 segundos, desnaturalización del DNA (separación de las 2 hebras).
 - T^a 92°C durante 1 minuto; temperatura de anidamiento, se produce la unión de la enzima Taq-polimerasa.
- **1 ciclo:** T^a 60°C durante 30 segundos, en el que se produce la formación de la doble hélice.

Tras el análisis de la detección de fluorescencia se obtuvieron las representaciones gráficas de los resultados. En las figuras 15 y 16 se detallan ejemplos gráficos.



Figuras 15 y 16.- Representación gráfica de la detección mediante fluorescencia.

3.3.2 ESTUDIO DEL GEN DEL GSTM1

Mediante PCR multiplex se estudió la presencia o ausencia de deleciones en los genes GSTM1. Los cebadores y condiciones necesarios para llevar a cabo la PCR y los amplicones resultantes se recogen en la tabla 5. Tras la PCR se obtuvieron hasta dos tipos de amplicones diferentes: de 231 pb y de 158 pb. En función de las posibles combinaciones se dedujo el genotipo de cada individuo.

Tabla 5.- Condiciones empleadas para el estudio de las deleciones de los genes GSTM1.

CEBADORES
C(+):
SENTIDO: 5'-CGCCATCTTGCTACATGCCCCG-3'
GSTM1:
SENTIDO: 5'-ATCTTCTCCTCTTCTGTCTC-3'
ANTI-SENTIDO: 5'-TCACCGGATCATGGCCAGCA-3'
PROGRAMA DE PCR
95°C 5 MINUTOS
30 CICLOS (94°C 30"/58°C 30 "/72°C 45")
72°C 8 MINUTOS
FRAGMENTOS RESULTANTES DE PCR Y CORRESPONDENCIA CON EL GENOTIPO
231 Y 158 PB: GSTM1 (+).
158 : GSTM1 (-).

3.4 PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Para el análisis descriptivo se calcularon los porcentajes para las variables cualitativas. La media, desviación típica, mediana y rango intercuartílico para las variables cuantitativas. El test t (distribuciones normales) y la U de Mann Whitney (distribuciones no normales) se han utilizado para analizar las diferencias de las variables cuantitativas sociodemográficas y clínicas entre los casos y controles.

El test de Kolmogorov-Smirnov se ha utilizado para contrastar la normalidad de las variables cuantitativas. Para el análisis de asociación entre los polimorfismos y los casos-controles se ha utilizado el test Chi-cuadrado para tablas de contingencia. Cuando los porcentajes de frecuencias esperadas menores de 5 era grande, se ha utilizado el test exacto de Fisher. La regresión logística para la estimación de los odds-ratios en el modelo codominante. La variable edad se ha utilizado como covariable en la regresión logística. Se han calculado los intervalos de confianza al 95%.

La interacción genotipo-ambiente se ha analizado mediante los Árboles de Clasificación y Regresión (CART, Classification and Regression Tree)¹⁴⁵. Este análisis es un proceso iterativo de partición de la muestra total en base a las asociaciones de los predictores con la variable respuesta (casos-controles). La división se considera siempre binaria. El mejor predictor en cada segmentación se elige de entre todos el que presenta mayor valor del test de ratio de verosimilitud o p-valor asociado al mismo.

El proceso de partición finaliza cuando no se detecta asociación entre las predictoras y la variable de interés, o bien, el tamaño de la muestra es muy pequeño. El tamaño muestral máximo elegido para finalizar el proceso de segmentación fue de 20 individuos. Para evitar el incremento de error tipo I debido a la gran cantidad de comparaciones que se realizan en este análisis, se ha utilizado la penalización descrita en Sall (2002)¹⁴⁶ la cual no es tan restrictiva como la propuesta por Bonferroni y usualmente utilizada en estos procedimientos.

Para la valoración del ajuste del modelo se ha utilizado el pseudo R^2 de McFadden y la deviance. La validación de los árboles de clasificación se ha realizado mediante el *5-fold*

cross validation donde la muestra original se divide en cinco submuestras y se utiliza para validar el ajuste del árbol obtenido.

El software utilizado para la realización de los análisis descriptivos, regresión logística y tablas de contingencia ha sido: *IBM SPSS versión 23*. Para el análisis de los árboles de clasificación se ha utilizado el algoritmo implementado en *SAS JMP versión 12*.

RESULTADOS

4.1 VARIABLES SOCIODEMOGRÁFICAS

Se han estudiado 234 pacientes fumadores fijando el punto de corte del 70% en el cociente FEV1/FVC postbroncodilatador para clasificarlos como EPOC. Aquellos pacientes con un cociente menor del 70%, de acuerdo a las normativas clínicas, fueron catalogados de EPOC. De esta manera 124 pacientes (53%) tenían EPOC mientras que los 110 restantes (47%) no lo tenían. La media del cociente FEV1/FVC en el conjunto de la muestra fue de $64,95 \pm 15,01\%$ con un rango entre 27 y 94 %. En el grupo EPOC de $53,16 \pm 10,32\%$ con un rango de 27 a 69%.

4.1.1 EDAD

La edad media del conjunto de pacientes estudiados fue de $60,91 \pm 12,91$ años con un rango entre 40 y 87 años. Se observan diferencias significativa entre los dos grupos objeto de estudio (p -valor $< 0,0001$). Al representar las edades se observa como las distribuciones son asimétricas y el grupo que no presenta EPOC presenta menor edad ($53,018 \pm 11,40$ años) que los que sí tienen EPOC ($67,91 \pm 9,78$ años). Por ello es importante considerar esta variable en los análisis genéticos. Estos resultados pueden observarse en la tabla 6 y gráficamente en la figura 17.

Tabla 6.- Distribución de la población con y sin EPOC en función de la edad.

EPOC	N	Media	Desviación estándar	Media de error estándar
SI	124	67,91	9,78	0,87
NO	110	53,01	11,40	1,08

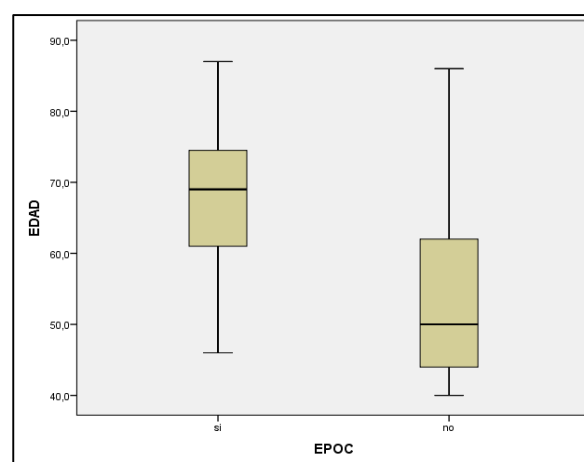


Figura 17.- Representación gráfica de edades entre EPOC y no EPOC.

4.1.2 GÉNERO

178 pacientes (76 %) eran hombres y 56 mujeres (24 %). Al igual que sucede con la edad, también se observaron diferencias significativas entre los dos grupos (p -valor $<0,0001$) ya que de los 124 pacientes fumadores diagnosticados de EPOC, tan solo 13 (10,5%) fueron mujeres y los otros 111 pacientes (89,5%) varones. Los resultados se exponen en la tabla 7 y de forma gráfica en la figura 18.

Tabla 7.- Tabla cruzada género/EPOC.

		EPOC		Total	
		SI	NO		
GÉNERO	Mujer	Recuento	13	43	56
		% dentro de EPOC	10,50%	39,10%	24 %
	Hombre	Recuento	111	67	178
		% dentro de EPOC	89,50%	60,90%	76 %
Total		Recuento	124	110	234
		% dentro de EPOC	100%	100%	100%

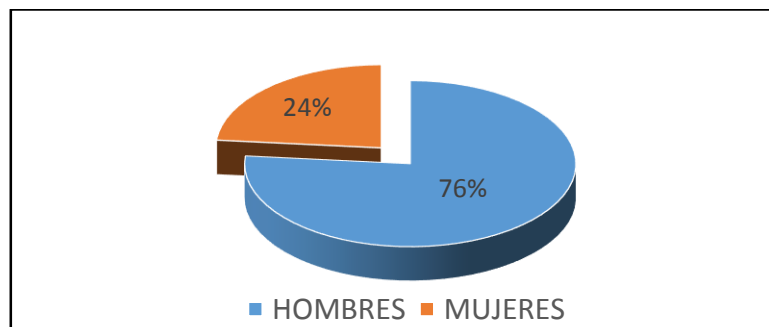


Figura 18.- Distribución de los pacientes de la muestra por género.

4.1.3 TABAQUISMO ACUMULADO

Para medir la intensidad del consumo acumulado de tabaco se utilizó el índice paquetes-año (IPA), calculado como:

$$\text{Paquetes/año (IPA): número de cigarrillos al día} \times \text{años fumando} / 20$$

El IPA medio fue de $55,15 \pm 32,40$ con un rango de 20 a 172 paquetes/año. Si analizamos el IPA entre los pacientes con y sin EPOC se observan diferencias significativas (p -valor $<0,0001$) de manera que los pacientes con EPOC presentaban un mayor consumo de

tabaco con un IPA medio de $67,75 \pm 32,63$ paquetes/año y en los que no tenían EPOC fue de $40,94 \pm 25,66$ paquetes/año. Los valores descriptivos se detallan en la tabla 8.

Tabla 8.- Valores descriptivos IPA en pacientes con y sin EPOC.

EPOC	N	Media	Desviación estándar	Media de error estándar	Mediana	Rango Inter cuartílico
SI	124	67,75	32,63	2,93	57,50	47
NO	110	40,94	25,66	2,44	35	25

Si se analizan las distribuciones de ambos grupos mediante los box-plot se observa que en ambos grupos las distribuciones son asimétricas a la derecha, hay mayor concentración de observaciones para valores bajos pero mayor variabilidad en valores altos. En el grupo sin EPOC hay varios donde el índice de tabaquismo es bastante más grande que la mayoría (figura 19).

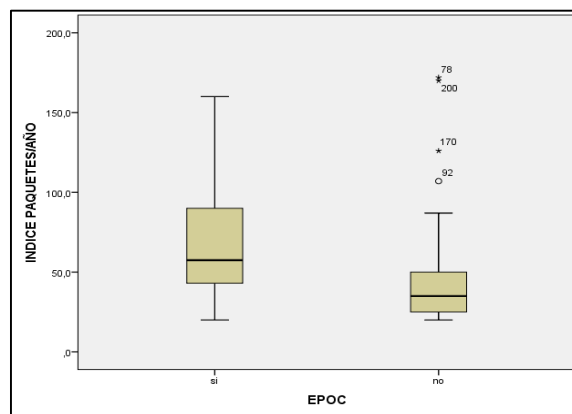


Figura 19.- Distribución gráfica IPA EPOC/no EPOC.

Los resultados observados relacionando el IPA con el género muestran una distribución del índice asimétrica, es decir, no sigue una distribución normal (figura 20).

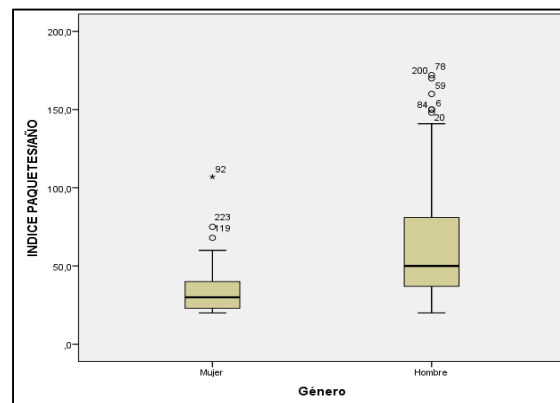


Figura 20.- Distribución gráfica del IPA por género.

El test de Normalidad (Kolmogorov Sminorv) es estadísticamente significativo para ambos grupos (p -valor $<0,0001$) tanto en mujeres como hombres.

Se ha realizado el test no paramétrico de la U de Mann-Whitney para observar si existen diferencias en el índice de paquetes/año entre hombre y mujeres y se ha detectado significación estadística (p -valor $<0,0001$). Los resultados se exponen en la tabla 9.

Tabla 9.- Relación IPA y género.

	Género	N	Media	Desviación estándar	Mediana	Rango Intercuartílico
IPA	Mujer	55	34,87	16,38	30	17
	Hombre	178	61,44	33,65	50	44,30

4.1.4 VOLUMEN ESPIRADO EN EL PRIMER SEGUNDO (FEV₁)

El valor medio del FEV₁ de toda la muestra fue de $2,85 \pm 0,69$ litros (l). Al analizar este valor de manera separada entre el grupo de pacientes con y sin EPOC se han obtenido diferencias significativas (p -valor $<0,0001$). El FEV₁ medio para pacientes sin EPOC fue de $1,92 \pm 0,80$ l frente a los pacientes EPOC que presentaban un valor medio de $1,47 \pm 0,64$ l (tabla 10). Las distribuciones son más o menos simétricas, si bien en ambos grupos hay valores atípicos en magnitudes altas de FEV₁ (figura 21).

Tabla 10.- Valores descriptivos FEV₁ EPOC/no EPOC.

	EPOC	N	Media	Desviación estándar	Media de error estándar	Mediana	Rango Intercuartílico
FEV ₁	SI	124	1,47	0,64	0,05	1,33	0,86
	NO	110	1,92	0,80	0,07	2,84	0,95

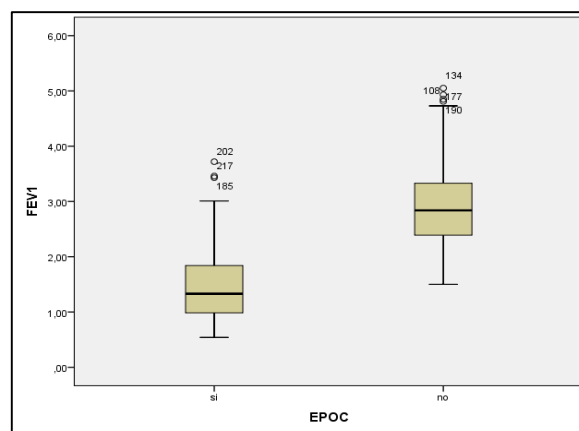


Figura 21.- Distribución gráfica FEV₁ EPOC/no EPOC.

El grado de obstrucción en la espirometría se clasificó de acuerdo con los criterios de la *European Respiratory Society (ERS)*¹⁴⁴ según los valores porcentuales del FEV₁ (tabla 11) postbroncodilatador.

Tabla 11.- Clasificación de gravedad obstrucción del flujo aéreo según la ERS.

Nivel de gravedad	FEV ₁ (% valor de referencia)
Leve	> 70%
Moderada	60-69%
Moderadamente grave	50-59%
Grave	35-49%
Muy grave	< 35%

El grado de obstrucción de los pacientes con EPOC de nuestra muestra se refleja en la tabla 12. El grado predominante fue el leve con un 25,80% aunque está muy equilibrado con los grados grave y muy grave.

Tabla 12.- Grado de obstrucción de los pacientes EPOC.

	Frecuencia	Porcentaje
LEVE	32	25,80%
MODERADO	22	17,70%
MODERADO- GRAVE	12	9,60%
GRAVE	27	21,70%
MUY GRAVE	31	25 %

4.1.5 ALFA 1 ANTITRIPSINA

El valor medio de la determinación analítica de A1AT fue de 134,59±26,97 mg/dl (rango 56-270) en ambos grupos entre aquellos pacientes en los que fue determinada (en 203 pacientes). No se han detectado diferencias significativas entre el grupo de EPOC y no EPOC (p-valor=0,941). Tabla 13.

Tabla 13.- Determinación de niveles de Alfa-1 antitripsina.

	EPOC	N	Media	Desviación estándar	Media de error estándar
A1AT	SI	105	134,70	31,19	3,04
	NO	98	134,42	21,73	2,19

4.1.6 OTRAS VARIABLES CLÍNICAS

Grado de disnea en los pacientes EPOC

El grado de disnea se midió mediante la escala subjetiva modificada de la *Medical Research Council*²¹; los resultados se exponen en la tabla 14. Entre los pacientes diagnosticados de EPOC la disnea de grandes esfuerzos, grado 1, fue mayoritaria afectando al 63%. Hay que destacar que en la muestra ningún paciente reflejó la presencia de una disnea de mínimos esfuerzos (grado 4).

Tabla 14.- Grado de disnea en pacientes con EPOC.

GRADO DE DISNEA	Frecuencia		Porcentaje válido
	0	5	4%
1	78	62,90%	
2	28	22,60%	
3	13	10,50%	
Total	124	100%	

Antecedentes familiares

No se ha observado asociación significativa (p -valor=0,915) entre los pacientes diagnosticados de EPOC y la existencia de antecedentes familiares de enfermedad respiratoria en familiares de primer grado, al interrogar sobre ellos (tabla 15).

Tabla 15.- Antecedentes familiares.

ANTECEDENTES		EPOC		Total	
		SI	NO		
ANTECEDENTES	NO	Recuento	86	77	163
		% dentro de EPOC	69,40%	70%	69,70%
	SI	Recuento	38	33	71
		% dentro de EPOC	30,60%	30%	30,30%
TOTAL	Recuento	124	110	234	
	% dentro de EPOC	100%	100%	100%	

Profesión de riesgo

Con respecto a profesiones de riesgo para el desarrollo de enfermedades respiratorias por exposición a inhalantes tampoco se ha detectado una asociación significativa (p -valor=0,221). Los resultados se exponen en la tabla 16.

Tabla 16.- Asociación de EPOC con profesiones de riesgo.

		EPOC		Total	
		SI	NO		
PROFESIÓN DE RIESGO	NO	Recuento	120	109	229
		% dentro de EPOC	96,80%	99,10%	97,90%
	SI	Recuento	4	1	5
		% dentro de EPOC	3,20%	0,90%	2,10%
TOTAL		Recuento	124	110	234
		% dentro de EPOC	100%	100%	100%

4.2 ESTUDIO GENÉTICO

A continuación se exponen los resultados observados tras el estudio de los distintos polimorfismos.

4.2.1 IL-4

El polimorfismo -33 C>T en el gen IL-4 conlleva a que en la posición -33 en la región promotora del gen, puede existir tanto una citosina (C) como una timina (T). La sustitución se realiza en una región no codificante y por tanto no genera cambio cualitativo en la proteína. El estudio de este polimorfismo no ha mostrado asociación significativa (p -valor=0,22) entre padecer o no EPOC.

Se cumple la ley de Hardy-Weinberg en ambos grupos, la cual establece que la composición genética de una población permanece en equilibrio mientras no actúe la selección natural ni ningún otro factor, y no se produzca ninguna mutación, es decir, la herencia mendeliana, por sí misma, no engendra cambio evolutivo¹⁴⁷. Para los pacientes con EPOC (p -valor=0,16) y sin EPOC (p -valor=0,54). Si se estiman los odds-ratios se obtiene los resultados que se muestran en la tabla 17.

Tabla 17.- Odds-ratio genotípicas en IL-4.

Genotipo	NO N (%)	SI N (%)	OR	IC del 95%	p-valor
CC	73(43,50)	95(56,50)	1		
CT	32(56,10)	25(43,90)	0,60	(0,328;1,100)	0.09
TT	5(55,60)	4(44,40)	0,61	(0,159;2,371)	0.48

Si se analiza la asociación alélica se obtiene un p-valor próximo a la significación (p-valor=0,08). Ver tablas 18 y 19.

Tabla 18.- Frecuencias alélicas en IL-4.

ALELOS	NO	SI
C	178	215
T	42	33
	220	248

Tabla 19.- Porcentajes alélicos en IL-4.

ALELOS	NO	SI
C	80,91%	86,69%
T	19,09%	13,31%
	100%	100%

Al analizar los modelos dominante y recesivo se obtiene un p-valor próximo a la significación en el caso del modelo dominante (p-valor=0,08). Tabla 20.

Tabla 20.- Análisis modelo dominante y recesivo en IL-4.

	Genotipo	No evento; N (%)	Evento; N (%)	OR	IC del 95%	p-valor
DOMINANTE	CC	73(66,36)	95(76,61)	1		
	CT+TT	37(33,64)	29(23,39)	0,60	(0,34-1,07)	0,0820
RECESIVO	CC+CT	105(95,45)	120(96,77)	1		
	TT	5(4,55)	4(3,23)	0,70	(0,18-2,68)	0,60

A la vista de los resultados observados se puede asegurar que el genotipo CC se asocia más con EPOC que los genotipos CT+TT. Si se ajustan los resultados por edad e índice de tabaquismo se obtienen los resultados mostrados en la tabla 21.

Tabla 21.- Variables edad e IPA en la ecuación en IL-4

	B	Error estándar	OR	95% C.I. para OR		
				Inferior	Superior	
Paso 1°	IL4					
	IL-4 (CT)	-0,74	0,40	0,47	0,21	1,05
	IL-4 (TT)	-0,90	0,79	0,40	0,08	1,91
	EDAD	0,10	0,01	1,10	1,07	1,14
	IPA	0,01	0,00	1,01	1,00	1,03
	Constante	-6,92	0,97	0,001		

Los odds-ratios también modifican su magnitud en presencia de edad e índice de tabaquismo, pero su influencia no es tan grande como en los siguientes polimorfismos. Por tanto, se puede concluir que no existe asociación entre el polimorfismo estudiado en el gen IL-4 y una mayor predisposición para desarrollar EPOC.

4.2.2 IL-8

El polimorfismo estudiado en el gen IL-8 se localiza en la posición -352 A>T, lo que significa que en dicha posición de la secuencia de DNA puede existir una Adenina (A) o Timina (T). Este polimorfismo no genera cambio cualitativo en la proteína ya que se encuentra en región no codificante. En el análisis de este polimorfismo sí ha detectado una asociación significativa con el desarrollo de EPOC con una p-valor=0,028. La tabla de frecuencias y porcentajes la detallamos a continuación (tabla 22).

Tabla 22.- Frecuencias y porcentajes alélicos en IL-8.

GENOTIPO	NO (%)	SI (%)
TT	28 (25,45)	39 (31,45)
AT	67 (60,91)	55 (44,35)
AA	15 (13,64)	30 (24,19)
TOTAL	110	124

A diferencia de lo que ocurría con el gen que codifica IL-4, no se cumple la ley de Hardy-Weinberg en el grupo de no EPOC (p-valor=0,01) pero sí en los que presentan EPOC (p-valor=0,22). Al analizar las proporciones alélicas no se ha detectado una asociación significativa (p-valor=0,62). Los resultados se muestran en las tablas 23 y 24.

Tabla 23.- Frecuencias alélicas en IL-8

ALELOS	NO	SI
T	123	133
A	97	115
	220	248

Tabla 24.- Proporciones alélicas en IL-8.

PROPORCIÓN	NO	SI
ALELOS	NO	SI
T	55,91	53,63
A	44,09	46,37
	100%	100%

Al estimar los odds-ratio con el modelo logístico se obtienen los resultados que se exponen en la tabla 25.

Tabla 25.- Odds-ratios genotípico en IL-8.

GENOTIPO	NO N (%)	SI N (%)	OR	IC del 95%	p-valor
TT	28(41,80)	39(58,20)	1		
AT	67(54,90)	55(45,10)	0,58	(0,32;1,07)	0.08
AA	15(33,30)	30(66,70)	1,43	(0,65;3,15)	0.36

Los odds-ratios de las comparaciones TT-AA y TT-AT no son significativos, aunque en el caso de TT-AT está próximo a la significación. Si se realizan los modelos dominantes y recesivos se observan los resultados que se exponen en la tabla 26.

Tabla 26.- Odds-ratio comparaciones genotípicas en IL-8.

	Genotipo	No evento; N (%)	Evento; N (%)	OR	IC del 95%	p-valor
DOMINANTE	TT	28(25,45)	39(31,45)	1		
	AT+AA	82(74,55)	85(68,55)	0,74	(0,42-1,32)	0,31
RECESIVO	TT+AT	95(86,36)	94(75,81)	1		
	AA	15(13,64)	30(24,19)	2,02	(1,02-4)	0,04

Se ha observado significación estadística en el modelo recesivo, con un odds-ratio de 2,02. Es decir, que los portadores de genotipos TT+AT tienen dos veces menos de riesgo de sufrir EPOC que el genotipo AA, o lo que es lo mismo: los portadores del genotipo AA tienen el doble de riesgo de desarrollar EPOC que los portadores de los otros genotipos.

Igual que en el polimorfismo anterior se ha analizado el efecto de la edad y el IPA en la asociación encontrada (tabla 27).

Tabla 27.- Variables edad e IPA en la ecuación en IL-8.

	B	Error estándar	OR	95% C.I. para OR	
				Inferior	Superior
IL-8 (AT)	0,13	0,49	1,14	0,43	3,01
IL-8 (AA)	-0,48	0,39	0,61	0,28	1,32
EDAD	0,10	0,01	1,10	1,07	1,14
IPA	0,01	0,00	1,01	1,00	1,03
CONSTANTE	-6,72	1,00	0,00		

En este caso no se detecta significación en ninguno de los odds-ratio y hay un cambio importante en su magnitud, por lo tanto, la edad y el índice de tabaquismo aparecen como factores de confusión.

Para concluir, el análisis del polimorfismo -352 A>T de IL-8 y la susceptibilidad a desarrollar EPOC en pacientes fumadores muestra la existencia de significación estadística, aunque no se ha encontrado significación entre las distintas proporciones alélicas (TT-AA y TT-AT). El genotipo AA es dos veces más frecuentes en pacientes EPOC.

4.2.3 CHRNA5

El polimorfismo en posición 1392 A>G del gen CHRNA5 genera un cambio cualitativo a nivel de la proteína, de manera que en posición 398 se sustituye el ácido aspártico por un aminoácido asparragina (D398N). Al analizar la presencia de este polimorfismo con la susceptibilidad para desarrollar EPOC no se ha encontrado ninguna asociación estadística (p-valor=0,357). En la tabla 28 se refleja el análisis porcentual de los distintos alelos tanto para pacientes EPOC como sin EPOC. Se cumple la ley de Hardy-Weinberg en cada grupo. Para los EPOC (p-valor=0,852) y los no EPOC (p-valor =0,33).

Tabla 28.- Análisis porcentual alélico en CHRNA5.

GENOTIPO	NO (%)	SI (%)
GG	38 (34,55)	32 (25,81)
AG	49 (44,55)	63 (50,81)
AA	23 (20,91)	29 (23,39)
TOTAL	110	124

Tampoco se ha encontrado una asociación significativa en las proporciones alélicas (p-valor=0,2245). En las tablas 29 y 30 se muestran las frecuencias y porcentajes para cada alelo.

Tabla 29.- Frecuencias alélicas en CHRNA5.

Frecuencias	NO	SI
G	125	127
A	95	121
	220	248

Tabla 30.- Porcentajes alélicos en CHRNA5.

Porcentajes	NO	SI
G	56,82	51,21
A	43,18	48,79
	100%	100%

Aunque como ya hemos indicado no existe asociación, se realizó una regresión logística para observar la magnitud de los odds-ratio. Si ajustamos con los factores de confusión edad e IPA se observa una significación en el odds-ratio de 2,789 correspondiente a los genotipos GG y AG. Por lo tanto, se ha detectado que la edad y el IPA son factores de confusión debido al cambio tan importante que se produce en los odds-ratios cuando están presentes estas variables (tabla 31).

Tabla 31.- Variables edad e IPA en la ecuación en CHRNA5.

		B	Error estándar	OR	95% C.I. para OR	
					Inferior	Superior
Paso 1°	CHRNA5					
	CHRNA5(AA)	0,92	0,50	2,53	0,94	6,76
	CHRNA5(AG)	1,02	0,40	2,78	1,26	6,16
	EDAD	0,11	0,01	1,11	1,07	1,15
	IPA	0,01	0,00	1,01	1,00	1,03
	CONSTANTE	-8,24	1,13	0,00		

Por tanto en nuestro estudio no existe asociación estadística entre la presencia de este polimorfismo en el gen CHRNA5 y la susceptibilidad para desarrollar EPOC en pacientes fumadores.

4.2.4 GSTM1

El polimorfismo en el gen GSTM1 está ligado a su presencia o ausencia. En cuanto a la relación de polimorfismos en el gen GSTM1 y susceptibilidad para desarrollar EPOC, tampoco se ha detectado asociación (p-valor=0,93). Tabla 32.

Tabla 32.- Polimorfismos genéticos en GSTM1.

			EPOC		Total
			SI	NO	
GSTM1	PRESENTE	Recuento	51	45	96
		% dentro de EPOC	41,12%	40,90%	41,02%
	AUSENTE	Recuento	73	65	138
		% dentro de EPOC	58,87%	59,09%	58,97%
Total		Recuento	124	110	234
		% dentro de EPOC	100%	100%	100%

Si se realiza un ajuste por edad y género la asociación no es significativa, pero está próxima a la significación (p-valor=0,079), con un odds ratio de 0,543 y un intervalo de confianza (0,274; 1,073) (Tabla 33).

Tabla 33.- Variables edad y género en la ecuación en GSTM1.

		B	Error estándar	OR	95% C.I. para OR	
					Inferior	Superior
Paso 1 ^a	GÉNERO (varón)	-0,97	0,42	0,37	0,16	0,86
	EDAD	0,11	0,01	1,11	1,08	1,15
	GSTM1	-0,61	0,34	0,54	0,27	1,07
	Constante	-6,13	1,00	0,00		

Al segmentar por edad y género, se observa que en relación al género ni en hombres ni en mujeres se observan diferencias significativas (mujeres: p-valor=0,831; hombres: p-valor=0,304), por lo tanto, el género no parece que sea un efecto de confusión, pero sí la edad (tabla 34).

Tabla 34.- Tabla cruzada género GSTM1/EPOC.

		GÉNERO		EPOC		Total
				SI	NO	
MUJER	GSTM1	PRESENTE	Recuento	6	23	29
			% dentro de EPOC	50%	53,50%	52,70%
	AUSENTE	Recuento	6	20	26	
		% dentro de EPOC	50%	46,50%	47,30%	
	Total		Recuento	12	43	55
			% dentro de EPOC	100%	100%	100%
VARÓN	GSTM1	PRESENTE	Recuento	45	22	67
			% dentro de EPOC	40,50%	32,80%	37,60%
	AUSENTE	Recuento	66	45	111	
		% dentro de EPOC	59,50%	67,20%	62,40%	
	Total		Recuento	111	67	178
			% dentro de EPOC	100%	100%	100%

Para analizar el efecto de factor de confusión de la edad, la categorizaremos en menores de 60 años y mayores o iguales de 60. Se detecta una asociación en los menores de 60 años (p-valor=0,04) y no en los mayores de 60 (p-valor=0,406). Tabla 35.

El odds-ratio es de 2,11 en los menores de 60 años, es decir, aumenta el doble el riesgo de padecer EPOC en los que presentan el polimorfismo que entre los que no lo presentan. El intervalo de confianza al 95% es: 1,02- 4,35.

Tabla 35.- Tabla cruzada edad GSTM1/EPOC.

EDAD			EPOC		Total	
			SI	NO		
<60	GSTM1	PRESENTE	Recuento	27	37	64
			% dentro de EPOC	58,70%	40,20%	46,40%
	AUSENTE	Recuento	19	55	74	
			% dentro de EPOC	41,30%	59,80%	53,60%
	Total		Recuento	46	92	138
				% dentro de EPOC	100%	100%
≥ 60	GSTM1	PRESENTE	Recuento	24	8	32
			% dentro de EPOC	31,20%	44,40%	33,70%
	AUSENTE	Recuento	53	10	63	
			% dentro de EPOC	68,80%	55,60%	66,30%
	Total		Recuento	77	18	95
				% dentro de EPOC	100%	100%

Debido a los factores de confusión en la asociación entre la enfermedad y los polimorfismos se realizó un estudio exploratorio de la interacción genotipo-ambiente para ver el impacto que tienen estos polimorfismos en presencia de factores clínicos y sociodemográficos como son la edad, el género, el índice de tabaquismo, FEV₁ y antecedentes familiares.

Se ha realizado el estudio exploratorio con la variable FEV₁ y sin la misma. El FEV₁ constituye una piedra angular en el diagnóstico, seguimiento y pronóstico de la EPOC y su introducción podría sesgarnos los resultados en el estudio exploratorio.

1. CONSIDERANDO EL FEV₁

Se realizó un árbol de regresión (figura 22) que es un método de clasificación de los valores de una variable. En nuestro trabajo la variable es la presencia o ausencia de EPOC a partir de variables independientes como son las variables genéticas, sociodemográficas y clínicas descritas anteriormente. El método parte de la muestra y la divide recurrentemente en función de la máxima asociación entre las variables independientes (edad, género, IPA, FEV₁ y antecedentes familiares) y la variable dependiente (EPOC). Las variables importantes que definen las mayores diferencias porcentuales de presencia y ausencia de EPOC son FEV₁, género e IPA.

Se parte de una muestra de 243 pacientes donde el 47% no presentan EPOC y 53% son EPOC. La primera variable que está más asociada es el FEV₁, recodificada en valores menores de 1,95 l y mayores e iguales de 1,95 l. En el primer grupo el 92,4% de los individuos presentan EPOC y en el segundo sólo el 20,9%.

Los grupos de peor pronóstico son aquellos con FEV₁ <1,5 l y los que tienen un valor de FEV₁ entre 1,5 y 1,95 l de género masculino, ya que en el grupo definido por estas características el 84% de individuos presentan EPOC. Otro grupo de riesgo son los que presentan un FEV₁ entre 1,95 y 2,6 l con un IPA mayor o igual a 40, varón e IL-8 portador del genotipo AA.

Si con estos criterios se clasifica la muestra, los bien clasificados serían 208 de los 234 que han participado en el análisis, es decir, 88,9%. Estas variables clasifican mejor a los que presentan EPOC (92,7%), que los que no presentan EPOC (84,5%). Tabla 36.

Tabla 36.- Reclasificación de la muestra con FEV₁.

REAL	CONTEO PREDICHO	
	NO	SI
EPOC	93	17
NO	9	115

2. SIN CONSIDERAR EL FEV₁ (figura 23)

Al realizar el árbol de regresión sin considerar la variable FEV₁ destaca el efecto protector del genotipo GG del polimorfismo CHRNA5. Si vemos como clasifica este modelo a los pacientes, la tabla 37 de coincidencias es:

Tabla 37.- Reclasificación de la muestra sin considerar FEV₁.

REAL	CONTEO PREDICHO	
	NO	SI
EPOC		
NO	83	27
SI	16	108

De los 234 pacientes que han participado en el análisis 191 están bien clasificados (81,6%). De los pacientes que presentan EPOC los bien clasificados son un 87%.

RESULTADOS

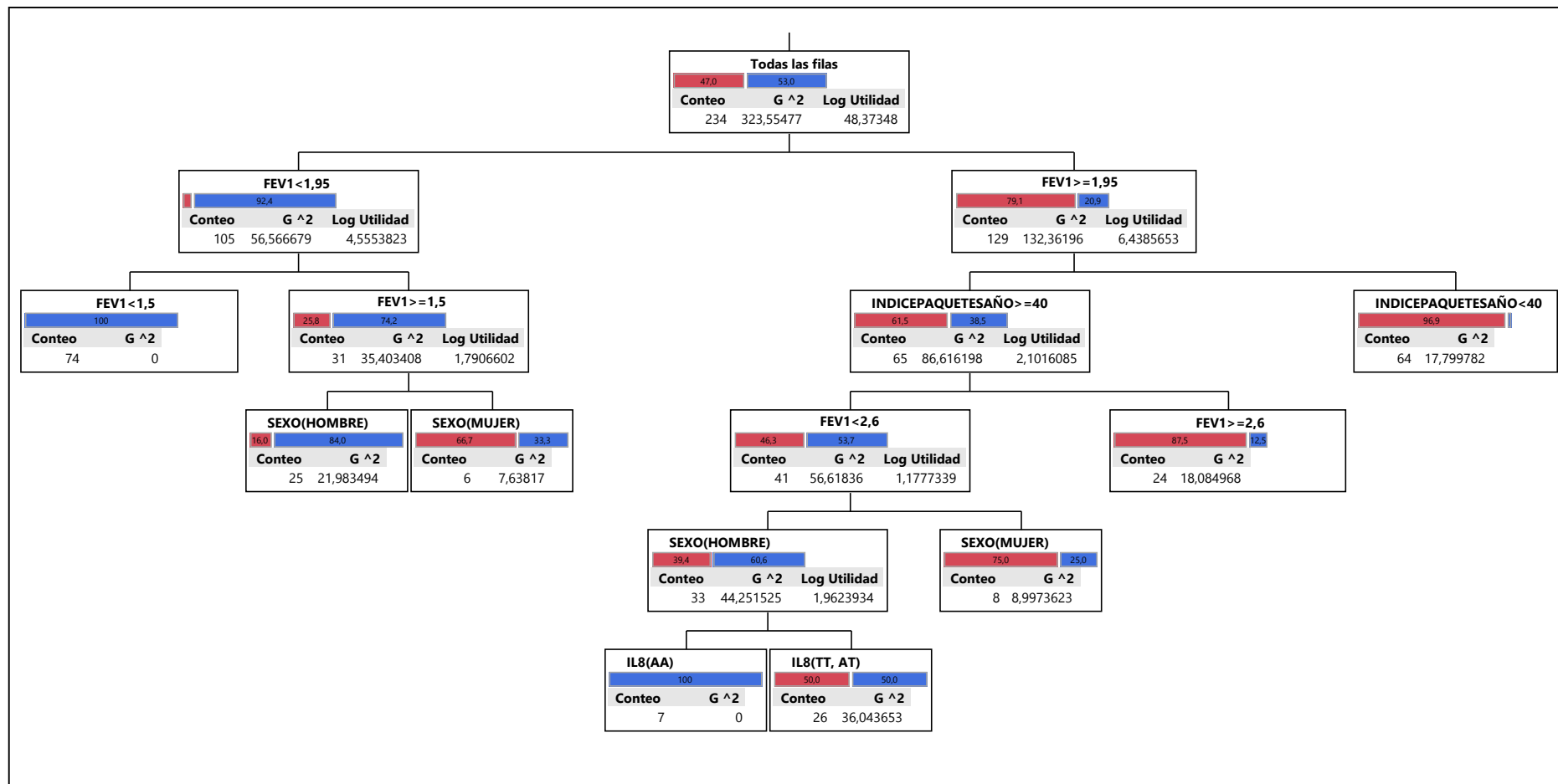


Figura 22.- Árbol de regresión considerando FEV₁. Azul pacientes con EPOC; Rojo: sin EPOC.

DISCUSIÓN

Los factores genéticos son objeto de investigación en los últimos años y constituyen una recomendación para la investigación de la EPOC en la normativa ATS/ERS²⁰. Su estudio podría, en un futuro, diseñar nuevas dianas terapéuticas más individualizadas. No obstante, no existe mucha información al respecto, y la que hay en numerosas ocasiones no es concluyente, motivo por el cual hemos desarrollado esta tesis tratando de dar respuesta a la hipótesis planteada en la misma: conocer si los polimorfismos de los genes de las citocinas IL-4 e IL-8 y los genes CHRNA5 y GSTM1 podrían estar implicados en el desarrollo de susceptibilidad al tabaco y como consecuencia desarrollar EPOC.

5.1 DISCUSIÓN DEL MÉTODO

Los sujetos que forman parte de nuestro estudio son pacientes del Servicio de Neumología del Hospital Universitario de Salamanca que acudían de forma consecutiva a la consulta general y accedieron a participar en el estudio. Al tratarse de un estudio prospectivo se incluyeron pacientes mayores de 35 años, con un IPA \geq 10, criterios habitualmente utilizados en estudios de rastreo de EPOC. Para confirmar o descartar el diagnóstico se solicitó una espirometría con test broncodilatador siguiendo las recomendaciones de GesEPOC⁷ y GOLD⁸.

Las pruebas de función pulmonar fueron realizadas en el Laboratorio de Función Pulmonar del Servicio de Neumología siguiendo los criterios de estandarización recomendados por la Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica (SEPAR)¹⁴⁷. El trabajo de laboratorio fue realizado en la Unidad de Medicina Molecular del Departamento de Medicina de la Universidad de Salamanca con ayuda de personal cualificado y homologado del mismo. Se utilizaron los procedimientos adecuados según los requerimientos del gen a estudio y siguiendo estrictamente los criterios de calidad establecidos en el laboratorio.

El tipo de estudio realizado ha sido un estudio de casos y controles, identificando personas con la enfermedad (u otro tipo de característica) y un grupo adecuado de personas de control con el que poder comparar. En nuestro caso el estudio se ha realizado de manera prospectiva, es decir, que se incorporan al estudio según se valoran en la consulta y se establece la sospecha clínica de EPOC.

El principio de Hardy-Weinberg aplicado en este estudio para calcular las frecuencias genotípicas, establece que la composición genética de una población permanece en equilibrio mientras no actúe la selección natural ni ningún otro factor, y no se produzca ninguna mutación¹⁴⁸. La comprobación de este principio se llevó a cabo mediante la prueba Chi-cuadrado de Pearson, utilizando las frecuencias genotípicas observadas que se han obtenido de los datos, y las frecuencias genotípicas esperadas obtenidas mediante este principio. Si el valor de p obtenido es mayor de 0,05 significa que la población tiene las proporciones de Hardy-Weinberg, es decir, está en equilibrio.

5.2 ANÁLISIS DE LA MUESTRA

Los 234 pacientes fumadores que participaron en el estudio eran mayoritariamente hombres: 178 pacientes (76%), frente a 56 mujeres (24%). La edad media fue de 60,91 años con un rango de edad entre 40 y 87 años.

Fueron diagnosticados de EPOC 124 pacientes (53%) de acuerdo a criterios clínicos y espirométricos, de los cuales 111 (89,5%) eran varones y 13 mujeres (10,5%). La distribución de la muestra por género es similar a la observada en otros estudios como EPISCAN⁴.

Como era previsible el IPA fue significativamente mayor en el grupo de pacientes con EPOC frente al de sujetos sin EPOC ($67,75 \pm 32,63$ vs $40,94 \pm 25,66$) con una relación estadísticamente significativa entre hombres y mujeres, de manera que el IPA medio es superior en hombres que en mujeres.

En cuanto al FEV₁ postbroncodilatador el valor total de la muestra fue de $2,85 \pm 0,69$ litros evidenciando una diferencia estadísticamente significativa (p -valor $< 0,0001$) entre los valores en pacientes EPOC ($1,46 \pm 0,64$ litros) respecto a los no EPOC, que fue de 0.5 litros más ($1,92 \pm 0,80$ litros).

El grado de obstrucción predominante en función del FEV₁, clasificado según los criterios de la ERS¹⁴⁴, fue el leve (32 pacientes; 25,8%), aunque está muy equilibrado con el siguiente en frecuencia, que fue la obstrucción muy grave, con un FEV₁ menor del 35%, en 31 pacientes (25%).

No se dispone de estudios similares al nuestro realizados en la clínica diaria, por lo que hemos comparado nuestros resultados con un estudio epidemiológico más amplio realizado en España, a pesar del sesgo que ello puede introducir. El estudio epidemiológico EPI-SCAN⁴, publicado en 2009, tuvo como objetivo principal estimar la prevalencia de EPOC en población de 40 a 80 años residente en España, e incluyó una serie de objetivos secundarios en relación a tendencias, factores de riesgo, variables diagnósticas y valores de referencia. Reveló una prevalencia de EPOC del 10,2% que fue casi tres veces superior en hombres que en mujeres, y aumentaba con la edad y la carga tabáquica, con una edad media de 56 años y un FEV₁ postbroncodilatador medio de 2.94 litros. Estos datos son similares en nuestro trabajo.

El IPA medio en EPI-SCAN fue de 26 paquetes/año, mientras que en nuestro trabajo fue de 55. Esta diferencia se podría explicar en base a la carga tabáquica, ya que en el EPI-SCAN también se incluyeron pacientes no fumadores mientras que en nuestra serie todos eran fumadores.

Este estudio epidemiológico clasificó los distintos grados de la EPOC según la guía GOLD publicada en 2007¹⁴⁹ en función de la obstrucción al flujo aéreo en la espirometría. De esta manera el 56,4% de los pacientes fueron clasificados como leves (estadio I; FEV₁ mayor del 80%), moderados (estadio II; FEV₁ entre el 50 y 80%) el 38,3%, severos (estadio III; FEV₁ entre el 49 y 30%) 4,6% y muy severos tan solo el 0,5% (estadio IV; FEV₁ menor del 30%)⁴.

En el diagnóstico y clasificación de la EPOC se han introducido numerosos cambios en los últimos años incorporando criterios diferentes al FEV₁ para clasificar la gravedad multifuncional de la enfermedad, tales como los fenotipos o las agudizaciones que no se contemplaban cuando se realizó este estudio. Por ese motivo no hemos podido incluir estos aspectos en el análisis de la población objeto de estudio.

Sin embargo, desde el punto de vista de los síntomas, la disnea se sigue considerando como un síntoma primordial y la forma de valoración sigue siendo mediante la escala MRC²¹. La disnea es el síntoma principal de la enfermedad y el que mayor pérdida de calidad de vida produce, aunque no es valorada de forma similar por todos los pacientes, especialmente por los de mayor edad.

Este síntoma aparece en fases avanzadas, es persistente, empeora con el ejercicio y se desarrolla de forma progresiva hasta limitar las actividades de la vida diaria. Cuando se consulta por este motivo es frecuente que la enfermedad tenga una evolución de años y que el paciente haya ido adaptándose a la limitación de sus actividades.

El grado de disnea ≥ 2 medido por la escala MRC se considera como umbral clínico de disnea relevante¹⁵⁰. En los pacientes incluidos en el estudio la disnea de grandes esfuerzos (grado 1) fue la mayoritaria en 78 pacientes (62,9%) y disnea ≥ 2 la presentaron 41 pacientes (33,1%). Es decir, que los pacientes incluidos en el estudio eran moderadamente sintomáticos. En un estudio de *Puente-Maestu et al*¹⁵¹, realizado en un grupo de 296 pacientes con EPOC y características clínicas similares a la población incluida en nuestro estudio, el valor medio de la disnea determinado con la escala MRC fue de 1.5, y el 48% de los pacientes referían disnea ≥ 2 , valor superior al observado en nuestro estudio.

Como se ha expuesto con anterioridad, el déficit de A1AT fue el primer factor genético conocido para la presencia de enfisema¹⁰⁸. A día de hoy continúa siendo la mutación más estudiada y conocida. En torno al 1% de los pacientes EPOC la presentan. Existen distintos estudios acerca de la asociación de polimorfismos genéticos en pacientes con déficit de A1AT. Se ha demostrado que polimorfismos en IL-10¹⁵², GSTP1¹⁵³ y CHRNA3¹⁵⁴ entre otros, pueden contribuir a una peor función pulmonar. No hemos encontrado estudios sobre los polimorfismos objeto de este trabajo.

En aquellos pacientes en los que se determinó el nivel de A1AT no se encontró ningún déficit ni diferencias significativas entre ambos grupos.

Tampoco se encontró asociación entre antecedentes familiares de enfermedades respiratorias ni aquellos pacientes que ejercían profesiones de riesgo.

Debido a los factores de confusión en la asociación entre la enfermedad y los polimorfismos genéticos, hemos realizado un estudio exploratorio de la interacción genotipo-ambiente para ver el impacto que tienen estos polimorfismos en presencia de factores clínicos y sociodemográficos como son la edad, el género, IPA, FEV₁ y antecedentes familiares. Para ello se utilizó el sistema del árbol de regresión. Es una técnica de análisis discriminante no paramétrica que permite predecir la asignación de muestras a grupos predefinidos en función de una serie de variables predictoras.

Como es conocido el FEV₁ constituye un valor vital en el diagnóstico, pronóstico y seguimiento del paciente EPOC. Al introducir esta variable en el sistema, el análisis queda muy marcado por la misma, debido a la gran asociación con la enfermedad y con la edad, por ello decidimos realizar dos árboles de regresión con y sin FEV₁.

Al realizar el análisis con FEV₁ hemos objetivado que aquellos pacientes con un valor menor de 1,5 l tienen un peor pronóstico y los pacientes que presentaban un valor entre 1.95 y 2,6 l con IPA igual o mayor a 40, varones y que eran portadores del genotipo AA de la IL-8, interleuquina que como hemos comprobado sí tenía relación significativa con la susceptibilidad a desarrollar EPOC, también presentan un peor pronóstico.

Ya en 1977 *Fletcher y Peto* analizaron la función pulmonar en 2.700 hombres durante 25 años. Demostraron que aquellos pacientes que tenían EPOC el riesgo de mortalidad se relacionaba con la caída de FEV₁¹¹. Posteriormente no han hecho más que aparecer publicaciones que han respaldado esta teoría¹⁵⁵⁻¹⁵⁸. Dado que la EPOC históricamente ha sido una enfermedad de varones, debido al retraso hasta hace 20 años en la iniciación masiva de la mujer en el hábito de fumar, es lógico que estudios más antiguos demuestren una mayor mortalidad en varones. Sin embargo, de acuerdo con estudios epidemiológicos recientes realizados en Estados Unidos, hay un cambio en la tendencia en el género femenino, tanto en el incremento del número de casos, ingresos hospitalarios y muertes por EPOC¹⁵⁹. Se han observado tendencias similares en otros países desarrollados¹⁶⁰.

Una consideración metodológica en nuestro trabajo, que podría ser más bien una crítica, fueron los criterios de inclusión basados en síntomas clínicos. Como único criterio clínico se incluyó la disnea que, aunque es el síntoma más prevalente, no es el único, como es la tos y la expectoración. No obstante, ya hemos señalado que de todos los criterios utilizados fueron la edad y el IPA los que determinaron la inclusión.

Aunque por otro lado, si nos remitimos a la definición de la EPOC por GOLD en 2007¹⁴⁹, no hace mención a síntomas (*“es una enfermedad prevenible y tratable con efectos extrapulmonares significativos que contribuyen a la severidad individual de los pacientes. Este componente pulmonar se caracteriza por una limitación del flujo aéreo no totalmente reversible. La limitación al flujo generalmente es progresiva y está asociada con una respuesta inflamatoria anormal del pulmón a las partículas o gases nocivos”*).

Cabe destacar que nuestro análisis estadístico, mediante árbol de regresión, clasificó de manera adecuada como EPOC al 92,7% de la muestra si consideramos el FEV₁ y al 87% si tener en cuenta el FEV₁, por lo que creemos que la inclusión de otros síntomas clínicos, como es el caso de la tos y la expectoración, no hubiese afectado a nuestros resultados.

5.3 ANÁLISIS GENÉTICO

IL-4 está asociada con la hiperreactividad bronquial, característica de enfermedades respiratorias como el asma bronquial y también presente en algunos pacientes con EPOC. También se ha comprobado que IL-4 induce a secreción mucosa⁴⁷. Por otro lado, como ya es conocido, existe una fuerte interacción entre la hiperrespuesta bronquial y el tabaco⁵⁰, siendo esta hiperrespuesta factor de riesgo para la mortalidad de pacientes EPOC⁵¹.

No se ha observado asociación entre la presencia del polimorfismo -33 C>T en el gen de la IL-4 y una mayor predisposición para desarrollar EPOC.

Al analizar el modelo dominante y recesivo se ha obtenido un valor próximo a la significación estadística (p-valor=0,08) de manera que el genotipo CC es más frecuente en pacientes EPOC. El estudio de *Hegab et al*¹⁶¹, en población japonesa y egipcia, no se pudo demostrar tampoco diferencias significativas en relación al polimorfismo de la IL-4 (33C>T) entre pacientes con EPOC y sanos.

Los resultados de la tesis doctoral de *Jiménez A (2011)*, que estudió la presencia de este polimorfismo con la predisposición a padecer cáncer de pulmón, también analizó la susceptibilidad para desarrollar EPOC sin encontrar relación estadísticamente significativa¹⁶². Nuestro estudio, con un número similar de pacientes EPOC, corrobora estos resultados.

IL-8 es un potente factor quimiotáctico para los leucocitos, fundamentalmente neutrófilos, favoreciendo su degranulación y estimulando la fagocitosis, por lo que desempeña un papel fundamental en el inicio y amplificación de reacciones inflamatorias. Como ya se ha expuesto anteriormente, sus niveles están marcadamente elevados en el esputo inducido⁷⁴ y en exacerbaciones en pacientes con EPOC^{75,76}. Niveles elevados de IL-8 se relacionan con una disminución de niveles de FEV₁ y un incremento de los niveles de disnea⁷⁸⁻⁸⁰ y también se han comprobado concentraciones elevadas en pacientes EPOC

hospitalizados con debilidad muscular⁸¹. Esta estrecha relación entre IL-8, neutrófilos y EPOC ha sugerido que puede ser una posible diana terapéutica.

Al revisar la literatura no son muchos los estudios que han analizado el rol de distintos polimorfismos en el gen IL-8 y EPOC además, en la mayoría no se han detectado hallazgos significativos. El estudio publicado por *Arinir y colaboradores* en 2005 no encontró relación significativa en el polimorfismo en la región promotora -251 A>T entre sujetos EPOC y controles sanos⁸³; en 2006 *Matheson y colaboradores* tampoco encontraron asociación entre este polimorfismo, la función pulmonar y la sintomatología entre pacientes EPOC en Melbourne (Australia)⁸⁴; *Danilko y colaboradores* en 2007 no encontraron tampoco diferencias significativas entre sujetos sanos y EPOC en el polimorfismo -251 A>C de IL-8 en cuanto a la susceptibilidad de desarrollar EPOC⁸⁵, mientras que *Shen et al* demostraron que el genotipo AA del polimorfismo -351 de IL-8 sí presentaba un mayor riesgo de desarrollar EPOC¹⁶³. El artículo publicado por *Córdoba-Lanús et al* más recientemente (2015) analizó la presencia del polimorfismo rs4073A en pacientes EPOC. Objetivó que los pacientes que presentaban este polimorfismo tenían una peor puntuación en la escala BODE y una importante caída en la función pulmonar durante los dos años de seguimiento del estudio, pero no demostraron que su presencia indujera una mayor susceptibilidad para desarrollar EPOC¹⁶⁴.

En cambio, en nuestro estudio, el polimorfismo -352 A>T en el gen IL-8 ha demostrado una asociación estadísticamente significativa (p -valor=0,028) con la susceptibilidad de desarrollar EPOC y además se ha detectado también que los portadores del genotipo AA tienen el doble de riesgo para desarrollar EPOC que los portadores de otros genotipos.

CHRNA5 participa en la composición de múltiples receptores nicotínicos^{113,114} que contribuyen a la estimulación de la liberación de dopamina en el núcleo estriado, una región implicada en las vías de recompensa, y que es crucial para el desarrollo de la dependencia nicotínica¹¹⁵. Diversos estudios ya han demostrado que los individuos con variaciones específicas en el gen del CHRNA5 tienen más posibilidades de ser dependientes de la nicotina, jugando dicho gen un papel importante en los efectos psicoactivos de la nicotina a corto y largo plazo.

La asociación causal entre el tabaco y el cáncer de pulmón está claramente establecida^{165,166}, y como ya se ha expuesto en este trabajo también, es el factor de riesgo más importante para el desarrollo de la EPOC⁸⁻¹⁰.

Distintos estudios han demostrado la asociación entre el polimorfismo objeto de este estudio rs16969968 (1392 A>G) y el cáncer de pulmón. Un ejemplo es el metaanálisis publicado por *XU y colaboradores* en 2015, realizado sobre 17.962 pacientes con cáncer de pulmón y 77.216 sujetos control, demostrando una asociación estadística, principalmente en fumadores caucásicos; además, evidenció que el genotipo AA de este polimorfismo presentaba un riesgo 1,6 veces mayor respecto a aquellos pacientes con genotipo GG¹⁶⁷. La explicación fundamental se basa en la interacción con factores ambientales, en este caso el tabaco.

Como hemos expuesto anteriormente, en 2007, *Saccone et al*, demostraron que el SNP rs16969968 se asociaba con una mayor dependencia a la nicotina¹¹⁶. Posteriormente distintos artículos han confirmado la asociación de este SNP con la condición de fumador^{117,118}, la dependencia a la nicotina^{119,120} y con la cantidad de cigarrillos fumados al día¹²¹.

Dado que la prevalencia de la EPOC es mayor que la del cáncer de pulmón, es posible que esta asociación genética, así como otras estudiadas sobre otros polimorfismos, puedan ser confundidas con la asociación con EPOC. Por ello *Young y colaboradores* en 2008 reclutaron sujetos caucásicos: 454 sujetos con cáncer pulmonar, 458 con EPOC y 488 controles fumadores con una historia tabáquica de al menos 15 paquetes/año. Estos autores demostraron la asociación con la EPOC, y además, que el genotipo AA en este polimorfismo era más frecuente tanto en pacientes con cáncer de pulmón y en pacientes con EPOC, que en los controles (16%,14% y 9% respectivamente)¹²². Estudios más recientes han corroborado dicha asociación^{123,124}.

En nuestro estudio no hemos encontrado relación estadística significativamente entre el polimorfismo 1392 A>G del gen de CHRNA5 y una mayor predisposición para desarrollar EPOC. Dado los hallazgos en la literatura respecto su relación causal con el tabaco, llama la atención no haber encontrado una asociación significativa con una mayor susceptibilidad para el desarrollo de la enfermedad.

No obstante, si incluimos la edad y el tabaquismo en el modelo, hemos observado que cambia la asociación, detectando una significación en la odds-ratio, con un valor de 2,7 y 2,5 para los genotipos AA y AG, lo que plantea que el tabaco y la edad podrían ser factores de confusión y que, si realizásemos la asociación del polimorfismo y la presencia o ausencia de EPOC en grupos de individuos con edades y consumo de tabaco similares, posiblemente este polimorfismo mostraría una asociación.

Al introducir en el árbol de regresión los genotipos AA, AG y GG hemos comprobado que aquellos pacientes que tenían los dos primeros genotipos, el 100% de la muestra presentaba EPOC, mientras que si presentaban el genotipo GG, casi la cuarta parte (23%) no presentaba EPOC. Esto significa que el genotipo GG constituye un factor protector para no desarrollar EPOC. En la tesis realizada por *Bernabé MJ* (2012) se comprobó que el genotipo homocigoto GG del gen *CHRNA5* era más frecuente en controles que en fumadores, mientras que el genotipo AA lo era en fumadores; por tanto, se estableció la hipótesis que el genotipo GG podría actuar como un factor protector en el tabaquismo, mientras que aquellos pacientes con genotipo AA presentaban un factor de riesgo para el inicio al consumo y posiblemente dificulta también el abandono del mismo¹⁶⁸.

La Glutación Transferasa (GST) es una familia de isoenzimas que participan en la función detoxificante y en la neutralización de los carcinógenos. Diversos estudios han relacionado las alteraciones genéticas en este gen con la EPOC¹³²⁻¹³⁵. En nuestro trabajo no hemos encontrado asociación (p -valor=0,93). Si ajustamos los resultados con edad y género la asociación no es estadística, pero está próxima a la significación con un p -valor de 0,079.

Al analizar el factor de confusión de la edad lo categorizamos en dos grupos: aquellos pacientes con una edad superior a 60 años y otro grupo con edad menor a 60 años. Se ha detectado una asociación significativa (p -valor=0,04) en los pacientes menores de 60 años con un odds-ratio de 2,1, de manera que, en este grupo de pacientes, es dos veces más favorable tener EPOC si presentan esta variante polimórfica.

No está claro por qué ocurre este evento, hipotetizamos que pueda existir un sesgo en personas de mayor edad que fallecen antes y se pierden pacientes. Múltiples estudios han demostrado la asociación de mutación de *GSTM1* con distintas neoplasias desde la década de los 90. El interés sobre la relación entre mutaciones en *GSTM1* y las neoplasias

sigue creciendo, de hecho disponemos de artículos publicados en los últimos meses en carcinomas nasofaríngeos¹⁶⁹, de mama¹⁷⁰; leucemia¹⁷¹ y renal¹⁷² entre otros, y como ya se ha expuesto anteriormente, también con el cáncer de pulmón¹²⁷⁻¹³¹.

Está demostrado que la edad es un factor de riesgo para padecer neoplasias, por tanto, nuestra hipótesis acerca de perder pacientes con la edad pueda deberse a que fallecen antes por una mayor predisposición a padecer neoplasias. Sería interesante analizar si estos pacientes mayores de 60 años en el momento del estudio han desarrollado o no neoplasias, ello podría abrirnos una nueva línea de investigación.

A la vista de lo expuesto con anterioridad, podemos concluir que el polimorfismo estudiado en IL-8 sí predispone a una mayor susceptibilidad de desarrollo de EPOC. Aquellos pacientes menores de 60 años tienen una mayor predisposición a padecer EPOC en presencia del gen GSTM1. Los polimorfismo en el gen IL-4 y CHRNA 5 no modifican el riesgo de desarrollar EPOC.

Dado que no solo se espera que la EPOC constituya la tercera causa de mortalidad a nivel mundial, sino la pérdida de calidad de vida relacionada con la salud, se deben continuar e intensificar los esfuerzos en las investigaciones genéticas, para dilucidar posibles factores predisponentes de esta enfermedad y descubrir posibles dianas terapéuticas que permitan tratamientos más individualizados.

CONCLUSIONES

- 1.** El polimorfismo -352 A>T en el gen de la IL-8 confiere una mayor susceptibilidad para desarrollar EPOC en pacientes fumadores, de manera que los portadores del genotipo AA tienen el doble de riesgo de desarrollar EPOC que los portadores de los otros genotipos.

- 2.** No se han encontrado diferencias estadísticamente significativas para el desarrollo de EPOC en el polimorfismo -33 C>T del gen de la IL-4 y el polimorfismo 1392 A>G del gen CHRNA5.

- 3.** A pesar de no haber comprobado relación estadísticamente significativa en el polimorfismo 1392 A>G del gen CHRNA5 con la susceptibilidad para desarrollar EPOC, hemos comprobado que el genotipo GG para este polimorfismo constituye un factor de protección para no desarrollar EPOC.

- 4.** La presencia del gen GSTM1 aumenta el riesgo de padecer EPOC en menores de 60 años. En el caso de pacientes mayores de 60 años podría existir un sesgo y que los portadores de este genotipo fallezcan antes al tener predisposición al desarrollo de neoplasias.

BIBLIOGRAFÍA

1. Vogelmeier CF, Criner GJ, Martinez FJ, Anzueto A, Barnes PJ, Bourbeau J, et al. Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Lung Disease 2017 Report. GOLD Executive Summary. *Am J Respir Crit Care Med.* 2017; 195: 557-82.
2. Mathers CD, Loncar D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Med.* 2006; 3: e442.
3. Vos T, Flaxman AD, Naghavi M, Lozano R, Michaud C, Ezzati M, et al. Years lived with disability (YLDs) for 1160 sequelae of 289 diseases and injuries 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet.* 2012; 380: 2163-96.
4. Miravittles M, Soriano JB, García-Río F, Muñoz L, Duran-Tauleria E, Sanchez G, et al. Prevalence of COPD in Spain: impact of undiagnosed COPD on quality of life and daily life activities. *Thorax.* 2009; 64: 863-8.
5. Ancochea J, Miravittles, García-Río F, Muñoz L, Sánchez G, Sobradillo V, et al. Underdiagnosis of chronic obstructive pulmonary disease in women: quantification of the problem determinants and proposed actions. *Arch Bronconeumol.* 2013; 49: 223-9.
6. Ministerio de Sanidad y Política Social. Estrategia en EPOC del Sistema Nacional de Salud. Ed: Ministerio de Sanidad. Madrid, 2009.
7. Working Group GesEPOC. Clinical Practice Guideline for the diagnosis and treatment of Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD)-the Spanish COPD Guideline (GesEPOC). *Arch Bronconeumol.* 2017; 53 (Supl 1): 2-64.
8. Waldbott GL. Further observations on Smoker's Respiratory Syndrome. *Ann Intern Med.* 1953: 1026-31.
9. Palmer KN. The role of smoking in bronchitis. *British Medical Journal.* 1954; 1: 1473-4.
10. Oswald NC, Medvei VC. Chronic bronchitis; the effect of cigarette-smoking. *Lancet.* 1955; 269: 843-4.
11. Fletcher C, Peto R. The natural history of chronic airflow obstruction. *Br Med J.* 1977; 1: 1645-8.

12. Doll R, Peto R, Wheatley K, Gray R, Sutherland I. Mortality in relation to smoking: 40 years' observations on male British doctors. *BMJ*. 1994; 309: 901-11.
13. Kohansal R, Martinez-Camblor P, Agusti A, Auist As, Mannino DM, Soriano JB. The natural history of chronic airflow obstruction revisited: an analysis of the Framingham offspring cohort. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009; 180: 3-10.
14. Lokke A, Lange P, Scharling H, Fabricius P, Vestbo J. Developing COPD: a 25 year follow up study of the general population. *Thorax* 2006; 61: 935-9.
15. Yin P, Jiang CO, Cheng KK, Lam TH, Lam KH, Miller MR, et al. Passive smoking exposure and risk of COPD among adults in China: the Guangzhou Biobank. Cohort Study. *Lancet*. 2007; 370: 751-7.
16. Po JY, FitzGerald JM, Carlsten C. Respiratory disease associated with solid biomass fuel exposure in rural women and children: systematic review and meta-analysis. *Thorax*. 2011; 66: 232-9.
17. Arbex MA, De Souza Conceicao GM, Cendon SP, Arbex FF, Lopes AC, Moyses EP, et al. Urban air pollution and COPD-related emergency room visits. *J Epidemiol Community Health*. 2009; 63: 777-83.
18. Rushton L. Occupational causes of chronic obstructive pulmonary disease. *Rev Environ Health*. 2007; 22: 195-212.
19. Menezes AMB, Hallal PC, Perez-Padilla R, Jardim JRB, Muino A, Lopez MV, et al. Tuberculosis and airflow obstruction: evidence from the PLATINO study in Latin America. *Eur Respir J*. 2006; 30: 1180-5.
20. Celli B, Decramer M, Wedzicha JA, Wilson KC, Agustí A, Criner GJ, et al. An Official American Thoracic Society/European Respiratory Society Statement: Research questions in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J*. 2015; 45: 879-905.
21. Bestall JC, Paul EA, Garrod R, Garnham R, Jones PW, Wedzicha JA. Usefulness of the Medical Research Council (MRC) dyspnoea scale as a measure of disability in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax*. 1999; 54: 581-6.

22. Task force of GesEPOC. Clinical Practice Guideline for the Diagnosis and Treatment of Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) – Spanish Guideline for COPD (GesEPOC). *Arch Bronconeumol.* 2012; 48 (Supl 1): 2-58.
23. Miratvilles M, Soriano JB, Ancochea J, Muñoz L, Durán-Tauleria E, Sánchez G, et al. Characterisation of the overlap COPD-asthma phenotype. Focus on physical activity and health status. *Respir Med.* 2013; 107: 1053-60.
24. Hogg JC, Macklem PT, Thurlbeck WM. Site and nature of airway obstruction in chronic obstructive lung disease. *N Engl J Med.* 1968; 278: 1355-60.
25. García-Cosío B. De la biología a la clínica. EPOC. *Arch Bronconeumol.* 2007; 43 (Supl 2): 15-23.
26. Rahman I, MacNee W. Oxidant/antioxidant imbalance in smokers and chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax.* 1996; 51: 348-50.
27. MacNee W. Pulmonary and systemic oxidant/antioxidant imbalance in chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc.* 2005; 2: 50-60.
28. Enami S HM, Colussi AJ. Acidity enhances the formation of a persistent ozonide aqueous ascorbate/ozone gas interfaces. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008; 105: 7365-9.
29. Li XY, Donaldson K, MacNee W. Mechanisms of cigarette smoke induced increased airspace permeability. *Thorax.* 1996; 51: 465-71.
30. Jeffery PK. Structural and inflammatory changes in COPD: a comparison with asthma. *Thorax.* 1998; 53: 129-36.
31. Finkelstein R, Fraser RS, Ghezzi H, Cosio MG. Alveolar inflammation and its relation to emphysema in smokers. *Am J Respir Crit Care Med.* 1995; 152: 1666-72.
32. Keatings VM, Barnes PJ. Granulocyte activation markers in induced sputum: comparison between chronic obstructive pulmonary disease, asthma, and normal subjects. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997; 155: 449-53.
33. Tetley TD. New perspectives on basic mechanisms in lung disease. Proteinase imbalance: its role in lung disease. *Thorax.* 1993; 48: 560-5.

34. Núñez-Naveira L, Montero-Martínez C, Ramos-Barbón D. Oxidación, inflamación y modificaciones estructurales. *Arch Bronconeumol.* 2007; 43 (Supl 1):18-29.
35. Barnes PJ. Mediators of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Pharmacol Rev.* 2004; 56: 515-48.
36. Lambrecht BN, Prins JB, Hoogsteden HC. Lung dendritic cells and host immunity to infection. *Eur Respir J.* 2001; 18: 692-704.
37. Lams BE, Sousa AR, Rees PJ, Lee TH. Immunopathology of the small-airway submucosa in smokers with and without chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998; 158: 1518-23.
38. Saetta M, Baraldo S, Corbino L, Turato G, Braccioni F, Rea F, et al. CD8+ cells in the lungs of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999; 160: 711-7.
39. Sullivan AK, Simonian PL, Falta MT, Mitchell JD, Cosgrove GP, Brown KK, et al. Oligoclonal CD4+ T cells in the lungs of patients with severe emphysema. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005; 172: 590-6.
40. Cosio MG. Autoimmunity, T-cells and STAT-4 in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J.* 2004; 24: 3-5.
41. Cosio MG, Saetta M, Agustí A. Immunologic aspects of chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med.* 2009; 360: 2445-54.
42. Del Puerto-Nevado L, Pérez-Rial S, Girón-Martínez A, Peces-Barba G. Role of inflammation in the etiopathogenesis of COPD. *Arch Bronconeumol.* 2010; 46 (Supl 11): 2-7.
43. Agustí AG, Noguera A, Sauleda J, Sala E, Pons J, Busquets X. Systemic effects of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J.* 2003; 21: 347-60.
44. Filella X, Molina R, y Ballesta AM. Estructura y función de las citocinas. *Med Integral.* 2002; 39: 63-71.
45. Y. Noma, P. Sideras, T. Naito, S. Bergstedt-Lindqvist, C. Azuma, E. Severinson, et al. Cloning of cDNA encoding the murine IgG1 induction factor by a novel strategy using SP6 promoter. *Nature.* 1986; 319: 640-6.

46. Nelms K, Keegan A. D, Zamorano J, Ryan J. J, Paul W. E. The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic functions. *Annu Rev Immunol.* 1999; 17: 701-38.
47. Dabbagh K, Takeyama K, Lee HM, Ueki IF, Lausier JA, Nadel JA. IL-4 induces mucin gene expression and goblet cell metaplasia in vitro and in vivo. *J Immunol.* 1999; 162: 6233-7.
48. Postma DS, Bleecker ER, Amelung PJ, Holroyd KJ, Xu J, Panhuysen CI, et al. Genetic susceptibility to asthma-bronchial hyperresponsiveness coinherited with a major gene for atopy. *N Engl J Med.* 1995; 333: 894-900.
49. Venkayya R, Lam M, Willkom M, Grünig G, Corry DB, Erle DJ. The Th2 lymphocyte products IL-4 and IL-13 rapidly induce airway hyperresponsiveness through direct effects on resident airway cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2002; 26: 202-8.
50. Tashkin DP, Altose MD, Connett JE, Kanner RE, Lee WW, Wise RA. Methacholine reactivity predicts changes in lung function over time in smokers with early chronic obstructive pulmonary disease. The Lung Health Study Research Group. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996; 153: 1802-11.
51. Hoppers JJ, Postma DS, Rijcken B, Weiss ST, Schouten JP. Histamine airway hyperresponsiveness and mortality from chronic obstructive pulmonary disease: a cohort study. *Lancet.* 2000; 356: 1313-7.
52. Brightling CE, Monteiro W, Ward R, Parker D, Morgan MD, Wardlaw AJ, et al. Sputum eosinophilia and short-term response to prednisolone in chronic obstructive pulmonary disease: a randomised controlled trial. *Lancet.* 2000; 356: 1480-5.
53. Siva R, Green RH, Brightling CE, Shelley M, Hargadon B, McKenna S, et al. Eosinophilic airway inflammation and exacerbations of COPD: a randomised controlled trial. *Eur Resp J.* 2007; 29: 906-13.
54. Rufino R, Costa CH, Souza HS, Madi K, Silva JR. Induced sputum and peripheral blood cell profile in chronic obstructive pulmonary disease. *J Bras Pneumol.* 2007; 33: 510-8.
55. Pascoe S, Locantore N, Dransfield MT, Barnes NC, Pavord ID. Blood eosinophil counts, exacerbations, and response to the addition of inhaled fluticasone furoate to vilanterol in

- patients with chronic obstructive pulmonary disease: a secondary analysis of data from two parallel randomised controlled trials. *Lancet Respir Med.* 2015; 3: 435-42.
56. Dorneles GP, Vianna P, Del Duca Lima D, Galant L, Dias AS, Chies JA, et al. Cytokine response to the 6-min walk test in individuals with different degrees of COPD. *Clin Respir J.* 2016; 10: 326-32.
57. Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1975; 72: 3666-70.
58. Mukhopadhyay S, Hoidal JR, Mukherjee TK. Role of TNF- α in pulmonary pathophysiology. *Respir Res.* 2006; 7: 125.
59. Di Francia M, Barbier D, Mege JL, Orehek J. Tumor necrosis factor- α levels and weight loss in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 1994; 150: 1453-5.
60. Ferrari R, Caram LM, Faganello MM, Sanchez FF, Tanni SE, Godoy I. Relation between systemic inflammatory markers, peripheral muscle mass, and strength in limb muscles in stable COPD patients. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* 2015; 10: 1553-8.
61. Zhang L, Gu H, Gu Y, Zeng X. Association between TNF- α -308 G/A polymorphism and COPD susceptibility: a meta-analysis update. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* 2016; 11: 1367-79.
62. Fu JJ, McDonald VM, Baines KJ, Gibson PG. Airway IL-1 β and Systemic inflammation as predictors of future exacerbation risk in asthma and COPD. *Chest.* 2015; 148: 618-29.
63. Wang Z, Zheng T, Zhu Z, Homer RJ, Riese RJ, Chapman Jr HA, et al. Interferon γ induction of pulmonary emphysema in the adult murine lung. *J Exp Med.* 2000; 192: 1587-600.
64. Di Stefano A, Caramori G, Capelli A, Gnemmi I, Ricciardolo F, Oates T, et al. STAT4 activation in smokers and patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J.* 2004; 24: 78-85.
65. Song W, Zhao J, Li Z. Interleukin-6 in bronchoalveolar lavage fluid from patients with COPD. *Chin Med J (Engl).* 2001; 114: 1140-2.

66. Reader JR, Hyde DM, Schelegle ES, Aldrich MC, Stoddard AM, McLane MP, et al. Interleukin-9 induces mucous cell metaplasia independent of inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2003; 28: 664-72.
67. Veldhoen M, Uyttenhove C, van Snick J, Helmby H, Westendorf A, Buer J, et al. Transforming growth factor-beta 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. *Nat Immunol.* 2008; 9: 1341-6.
68. Balbi B, Bason C, Balleari E, Fiasella F, Pesci A, Ghio R, et al. Increased bronchoalveolar granulocytes and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor during exacerbations of chronic bronchitis. *Eur Respir J.* 1997; 10: 846-50.
69. Takanashi S, Hasegawa Y, Kanehira Y, Yamamoto K, Fujimoto K, Satoh K, et al. Interleukin-10 level in sputum is reduced in bronchial asthma, COPD and in smokers. *Eur Respir J.* 1999; 14: 309-14.
70. Williams L, Bradley L, Smith A, Foxwell B. Signal transducer and activator of transcription 3 is the dominant mediator of the anti-inflammatory effects of IL-10 in human macrophages. *J Immunol.* 2004; 172: 567-76.
71. Castellucci M, Rossato M, Calzetti F, Tamassia N, Zeminian S, Cassatella MA, et al. IL-10 disrupts the Brd4-docking sites to inhibit LPS-induced CXCL8 and TNF- α expression in monocytes: Implications for chronic obstructive pulmonary disease. *J Allergy Clin Immunol.* 2015; 136: 781-91.
72. Shim JJ, Dabbagh K, Ueki IF, Dao-Pick T, Burgel PR, Takeyama K, et al. IL-13 induces mucin production by stimulating epidermal growth factor receptors and by activating neutrophils. *Am J Physiol.* 2001; 280: L134-40.
73. Dickinson JD, Alevy Y, Malvin NP, Patel KK, Gunsten SP, Holtzman MJ, et al. IL13 activates autophagy to regulate secretion in airway epithelial cell. *Autophagy.* 2016; 12: 397-409.
74. Keatings VM, Collins PD, Scott DM, Barnes PJ. Differences in interleukin-8 and tumor necrosis factor- α in induced sputum from patients with chronic obstructive pulmonary disease or asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996; 153: 530-34.

75. Crooks SW, Bayley DL, Hill SL, Stockley RA. Bronchial inflammation in acute bacterial exacerbations of chronic bronchitis: the role of leukotriene B4. *Eur Respir J.* 2000; 15: 274-80.
76. Nocker RE, Schoonbrood DF, Van de Graaf EA, Hack CE, Lutter R, Jansen HM, et al. Interleukin-8 in airway inflammation in patients with asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Int Arch Allergy Immunol.* 1996; 109: 183-91.
77. Woolhouse IS, Bayley DL, Stockley RA. Sputum chemotactic activity in chronic obstructive pulmonary disease: effect of 1-antitrypsin deficiency and the role of leukotriene B4 and interleukin 8. *Thorax.* 2002; 57: 709-14.
78. Garcia-Rio F, Miravittles M, Soriano JB, Muñoz L, Duran-Tauleria E, Sánchez G, et al. EPI-SCAN Steering Committee. Systemic inflammation in chronic obstructive pulmonary disease: a population-based study. *Respir Res.* 2010; 11: 63.
79. Aaron SD, Vandemheen KL, Ramsay T, Zhang C, Avnur Z, Nikolcheva T, et al. Multi analyte profiling and variability of inflammatory markers in blood and induced sputum in patients with stable COPD. *Resp Res.* 2012; 11: 41.
80. Damiá Ade D, Gimeno JC, Ferrer MJ, Fabregas ML, Folch PA, Paya JM. A study of the effect of proinflammatory cytokines on the epithelial cells of smokers, with or without COPD. *Arch Bronconeumol.* 2011; 47: 447-53.
81. Spruit MA, Gosselink R, Troosters T, Kasran A, Gayan-Ramirez G, Bogaerts P, et al. Muscle force during an acute exacerbation in hospitalised patients with COPD and its relationship with CXCL8 and IGF-I. *Thorax.* 2003; 58: 752-6.
82. Mahler DA, Huang S, Tabrizi M, Bell GM. Efficacy and safety of a monoclonal antibody recognizing interleukin-8 in COPD: a pilot study. *Chest.* 2004; 126: 926-34.
83. Arinir U, Klein W, Rohde G, Stemmler S, Epplen JT, Schultze-Werninghaus G. Polymorphisms in the interleukin-8 gene in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Electrophoresis.* 2005; 26: 2888-91.
84. Matheson MC, Ellis JA, Raven J, Walters EH, Abramson MJ. Association of IL8, CXCR2 and TNF-a polymorphisms and airway disease. *J Hum Genet.* 2006; 51: 196-203.

85. Danilko KV, Korytina GF, Akhmidishina LZ, Ianbaeva DG, Zagidullin ShZ, Victorova TV. Association of cytokines genes (ILL, IL1RN, TNF, LTA, IL6, IL8, IL0) polymorphic markers with chronic obstructive pulmonary disease. *Mol Biol (Mosk)*. 2007; 41: 26-30.
86. Jones CE, Chan K. Interleukin-17 stimulates the expression of interleukin- 8, growth-related oncogene- α and granulocyte-colony-stimulating factor by human airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2002; 26: 748-53.
87. Schulz C, Kratzel K, Wolf K, Schroll S, Kohler M, Pfeifer M. Activation of bronchial epithelial cells in smokers without airway obstruction and patients with COPD. *Chest*. 2004; 125: 1706–13.
88. Traves SL, Culpitt S, Russell REK, Barnes PJ, Donnelly LE. Elevated levels of the chemokines GRO- α and MCP-1 in sputum samples from COPD patients. *Thorax*. 2002; 57: 590-5.
89. Capelli A, Di Stefano A, Gnemmi I, Balbo P, Cerutti CG, Balbi B, et al. Increased MCP-1 and MIP-1 β in bronchoalveolar lavage fluid of chronic bronchitis. *Eur Respir J*. 1999; 14: 160-5.
90. Clark-Lewis I, Mattioli I, Gong JH, Loetscher P. Structure-function relationship between the human chemokine receptor CXCR3 and its ligands. *J Biol Chem*. 2003; 278: 289-95.
91. Agostini C, Facco M, Siviero M, Carollo D, Galvan S, Cattelan AM, et al. CXC chemokines IP-10 and mig expression and direct migration of pulmonary CD8/CXCR3 T cells in the lungs of patients with HIV infection and T-cell alveolitis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000; 162: 1466-73.
92. Saetta M, Distefano A, Maestrelli P, Graziella T, Rugieri MP, Roggeri A, et al. Airway eosinophilia in chronic bronchitis during exacerbations. *Am J Respir Crit Care Med*. 1994; 150: 1646-52.
93. Tanino M, Betsuyaku T, Takeyabu K, Tanino Y, Yamaguchi E, Miyamoto K, et al. Increased levels of interleukin-8 in BAL fluid from smokers susceptible to pulmonary emphysema. *Thorax*. 2002; 57: 405-11.

94. De Boer WI, van Schadewijk A, Sont JK, Sharma HS, Stolk J, Hiemstra PS, et al. Transforming growth factor β 1 and recruitment of macrophages and mast cells in airways in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998; 158: 1951-7.
95. Ihn H. Pathogenesis of fibrosis: role of TGF- β 1 and CTGF. *Curr Opin Rheumatol.* 2002; 14: 681-5.
96. Ishikawa T, Kume H, Kondo M, Ito Y, Yamaki K, Shimokata K. Inhibitory effects of interferon- γ on the heterologous desensitization of β -adrenoceptors by transforming growth factor- β 1 in tracheal smooth muscle. *Clin Exp Allergy.* 2003; 33: 808-15.
97. Wu L, Chau J, Young RP, Pokorny V, Mills GD, Hopkins R, et al. Transforming growth factor- β 1 genotype and susceptibility to chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax.* 2004; 59: 126-9.
98. Nadel JA, Burgel PR. The role of epidermal growth factor in mucus production. *Curr Opin Pharmacol.* 2001; 1: 254-8.
99. Wagner PD. Vascular endothelial growth factor and the pathogenesis of emphysema. *Am J Med.* 2003; 114: 413-4.
100. Kanazawa H, Asai K, Hirata K, Yoshikawa J. Possible effects of vascular endothelial growth factor in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Med.* 2003; 114: 354-8.
101. Kranenburg AR, de Boer WI, van Krieken JH, Mooi WJ, Walters JE, Saxena PR, et al. Enhanced expression of fibroblast growth factors and receptor FGFR-1 during vascular remodeling in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2002; 27: 517-25.
102. Senior RM, Tegner H, Kuhn C, Ohlsson K, Starcher BC, Pierce JA. The induction of pulmonary emphysema with human leukocyte elastase. *Am Rev Respir Dis.* 1997; 116: 469-75.
103. Yoshioka A, Betsuyaku T, Nishimura M, Miyamoto K, Kondo T, Kawakami Y. Excessive neutrophil elastase in bronchoalveolar lavage fluid in subclinical emphysema. *Am J Respir Crit Care Med.* 1995; 152: 2127-32.

104. Betsuyaku T, Nishimura M, Takeyabu K, Tanino M, Miyamoto K, Kawakami Y. Decline in FEV1 in community-based older volunteers with higher levels of neutrophil elastase in bronchoalveolar lavage fluid. *Respiration*. 2000; 67: 261-7.
105. Sommerhoff CP, Nadel JA, Basbaum CB, Caughey GH. Neutrophil elastase and cathepsin G stimulate secretion from cultured bovine airway gland serous cells. *J Clin Investig*. 1990; 85: 682-9.
106. Chapman HA, Riese RJ, Shi GP. Emerging roles for cysteine proteases in human biology. *Annu Rev Physiol*. 1997; 59: 63-88.
107. Hernández-Montoya J, Pérez-Rubio G, Pérez Ramos J, Montaña Ramírez M, Ramos Abraham C, Ramírez Venegas A, et al. Participación de las metaloproteinasas de matriz extracelular en la EPOC. *Neumol Cir Torax*. 2014; 73: 128-127.
108. Laurell CB, Eriksson S. The electrophoretic alpha-1-globulin pattern of serum in alpha-1-antitrypsin deficiency. *Scand J Clin Lab Invest*. 1963; 15: 132-40.
109. Watson JD, Crick FH. Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*. 1953; 171: 737-8.
110. Nebert DW. Suggestions for the nomenclature of human alleles: relevance to ecogenetics, pharmacogenetics and molecular epidemiology. *Pharmacogenetics* 2000; 10: 279-90.
111. Brooks AJ. The essence of SNPs. *Gene* 1999; 134: 177-86.
112. Fisher L, Kaij L, Denker S, Jonson E. Smoking habits of monozygotic twins. *Br Med J*. 1958; 1: 1090-5.
113. Ramirez Latorre J, Yu CR, Qu X, Perin F, Karlin A, Role L. Functional contributions of alpha 5 subunit to neuronal acetylcholine receptor channels. *Nature*. 1996; 380: 347-51.
114. Groot-Kormelink PJ, Boorman JP, Sivilotti LG. Formation of functional alpha3beta4alpha5 human neuronal nicotinic receptors in *Xenopus* oocytes: a reporter mutation approach. *Br J Pharmacol*. 2001; 134: 789-96.
115. Salminen O, Murphy KL, McIntosh JM, Drago J, Marks MJ, Collins AC, et al. Subunit composition and pharmacology of two classes of striatal presynaptic nicotinic acetylcholine receptors mediating dopamine release in mice. *Mol Pharmacol*. 2004; 65: 1526-35.

- 116.** Saccone SF, Hinrichs AL, Saccone NL, Chase GA, Konvicka K, Madden PA, et al. Cholinergic nicotinic receptor genes implicated in a nicotine dependence association study targeting 348 candidate genes with 3713 SNPs. *Hum Mol Genet.* 2007; 16: 36-49.
- 117.** Bierut LJ, Stitzel JA, Wang JC, Hinrichs AL, Grucza RA, Xuei X, et al. Variants in nicotinic receptors and risk for nicotine dependence. *Am J Psychiatry.* 2008; 165: 1163-71.
- 118.** Johnson EO, Chen LS, Breslau N, Hatsukami D, Robbins T, Saccone NL, et al. Peer smoking and the nicotinic receptor genes: an examination of genetic and environmental risks for nicotine dependence. *Addiction.* 2010; 105: 2014-22.
- 119.** Chen X, Chen J, Williamson VS, An SS, Hettema JM, Aggen SH, et al. Variants in nicotinic acetylcholine receptors alpha5 and alpha3 increase risks to nicotine dependence. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2009; 150B: 926-33.
- 120.** Saccone NL, Saccone SF, Hinrichs AL, Stitzel JA, Duan W, Pergadia ML, et al. Multiple distinct risk loci for nicotine dependence identified by dense coverage of the complete family of nicotinic receptor subunit (CHRN) genes. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2009; (Suppl B): 453-66.
- 121.** Lips EH, Gaborieau V, McKay JD, Chabrier A, Hung RJ, Boffetta P, et al. Association between a 15q25 gene variant, smoking quantity and tobacco-related cancers among 17.000 individuals. *Int J Epidemiol.* 2010; 39: 563-77.
- 122.** Young RP, Hopkins RJ, Hay BA, Epton MJ, Black PN, Gamble GD. Lung cancer gene associated with COPD: triple whammy or possible confounding effect?. *Respir J.* 2008; 32: 1158-64.
- 123.** Wilk JB, Shrine NR, Loehr LR, Zhao JH, Manichaikul A, Lopez LM, et al. Genome-wide association studies identify CHRNA5/3 and HTR4 in the development of airflow obstruction. *Am J Respir Crit Care Med.* 2012; 186: 622-32.
- 124.** Zhao Z, Peng F, Zhou Y, Hu G, He H, He F, et al. Exon sequencing identifies a novel CHRNA3-CHRNA5-CHRNA4 variant that increases the risk for chronic obstructive pulmonary disease. *Respirology.* 2015; 20: 790-8.

- 125.** Pillai SG, Ge D, Zhu G, Kong X, Shianna KV, Need AC, et al. A genome-wide association study in chronic obstructive pulmonary disease (COPD): identification of two major susceptibility loci. *PLoS Genet.* 2009; 5:e1000421.
- 126.** Wang J, Spitz MR, Amos CI, Wilkinson AV, Wu S, Shete S. Mediating effects of smoking and chronic obstructive pulmonary disease on the relation between the CHRNA5-A3 genetic locus and lung cancer risk. *Cancer.* 2010; 116: 3458-62.
- 127.** Seidegard J, Pero R.W, Markowitz M.M, Roush G, Miller D.G, Beattie E.J. Isoenzyme(s) of glutathione transferase (class mu) as a marker for the susceptibility to lung cancer: a follow up study. *Carcinogenesis.* 1990; 11: 33-6.
- 128.** Ketterer B, Harris JM, Talaska G, Meyer DJ, Pemble SE, Taylor JB, et al. The human glutathione S-transferase supergene family, its polymorphism, and its effects on susceptibility to lung cancer. *Environ Health Perspect.* 1992; 98: 87-94.
- 129.** Li XM, Yu XW, Yuan Y, Pu MZ, Zhang HX, Wang KJ, et al. Glutathione S-transferase P1, gene-gene interaction, and lung cancer susceptibility in the Chinese population: An updated meta-analysis and review. *J Cancer Res Ther.* 2015; 11: 565-70.
- 130.** Wu G, Jiang B, Liu X, Shen Y, Yang S. Association of GSTs gene polymorphisms with treatment outcome of advanced non-small cell lung cancer patients with cisplatin-based chemotherapy. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015; 8: 13346-52.
- 131.** Ramos Hernández C, Mouronte-Roibás C, Barros-Dios JM, Fernández-Villar A, Ruano-Ravina A. Deletion of GSTM1 and GSTT1 genes and lung cancer survival: a systematic review. *Tumori.* 2017; 103: 338-44.
- 132.** Harrison DJ, Cantlay AM, Rae F, Lamb D, Smith CA. Frequency of glutathione S-transferase M1 deletion in smokers with emphysema and lung cancer. *Hum Exp Toxicol.* 1997; 16: 356-60.
- 133.** He JQ, Ruan J, Connett JE, Anthonisen NR, Paré PD, Sandford AJ. Antioxidant gene polymorphisms and susceptibility to a rapid decline in lung function in smokers. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002; 166: 323-8.

- 134.**Kant Shukla R, Kant S, Mittal B, Bhattacharya S. Comparative study of GST polymorphism in relation to age in COPD and lung cancer. *Tuberk Toraks*. 2013; 61: 275-82.
- 135.**Malic Z, Topic A, Francuski D, Stankovic M, Nagorni-Obradovic L, Markovic, et al. Oxidative Stress and Genetic Variants of Xenobiotic-Metabolising Enzymes Associated with COPD Development and Severity in Serbian Adults. *COPD*. 2017; 14: 95-104.
- 136.**Wilk JB, Walter RE, Laramie JM, Gottlieb DJ, O'Connor GT. Framingham Heart Study genome-wide association: results for pulmonary function measures. *BMC Med Genet*. 2007; 8 (Suppl 1): S8.
- 137.**Wilk JB, Chen TH, Gottlieb DJ, Walter RE, Nagle MW, Brandler BJ, et al. A genome-wide association study of pulmonary function measures in the Framingham Heart Study. *PLoS Genet*. 2009; 5: e1000429.
- 138.**Hancock DB, Eijgelsheim M, Wilk JB, Gharib SA, Loehr LR, Marciante KD, et al. Meta-analyses of genome-wide association studies identify multiple loci associated with pulmonary function. *Nat Genet*. 2010; 42: 45-52.
- 139.**Boezen HM. Genome-wide association studies: what do they teach us about asthma and chronic obstructive pulmonary disease?. *Proc Am Thorac Soc*. 2009; 6: 701-3.
- 140.**Young RP, Hopkins RJ, Whittington CF, Hay BA, Epton MJ, Gamble GD. Individual and cumulative effects of GWAS susceptibility loci in lung cancer: associations after sub-phenotyping for COPD. *PLoS One*. 2011; 6: e16476.
- 141.**Nakamura H. Genetics of COPD. *Allergol Int*. 2011; 60: 253-8.
- 142.**Soler Artigas M, Wain LV, Tobin MD. Genome-wide association studies in lung disease. *Thorax*. 2012; 67: 271-80.
- 143.**Wain LV, Shrine N, Miller S, Jackson VE, Ntalla I, Artigas MS, et al. Novel insights into the genetics of smoking behaviour, lung function, and chronic obstructive pulmonary disease (UK BiLEVE): a genetic association study in UK Biobank. *Lancet Respir Med*. 2015; 3: 769-81.
- 144.**Pellegrino G, Viegi P, Enright V, Brusasco RO. Interpretative strategies for Lung function tests. *Eur Respir J*. 2005; 26: 948-68.

- 145.**Breiman, L, J. H. Friedman, R. A. Olshen, and C. J. Stone. Classification and regression trees. Monterey, Calif., U.S.A.: Chapman and Hall/CRC; 1984. 368p.
- 146.**Sall, J. Monte Carlo calibration of distributions of partition statistics. SAS Institute. Retrieved 2015 from <http://www.jmp.com/content/dam/jmp/documents/en/white-papers/montecarlo.pdf>.
- 147.**Casán P, Burgos J.A, Barberá J.A, Giner J. En: Puente Maestu L, coordinador. Espirometría. Procedimientos de evaluación de la función pulmonar. Manual de procedimientos SEPAR. Módulo 3. Barcelona: Egraf; 2002. p4-15.
- 148.**Kalmes R, Huret JL. Modelo de Hardy-Weinberg. Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol.2001.URL.Disponible:<http://AtlasGeneticsOncology.org/Educ/HardySp.html>.
- 149.**Rabe KF, Hurd S, Anzueto A, Barnes PJ, Buist SA, Calverley P, et al. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary. Am J Respir Crit Care Med. 2007; 176: 532-55.
- 150.**Celli BR, Cote CG, Marin JM, Casanova C, Montes de Oca M, Mendez RA, et al. The body-mass index, airflow obstruction, dyspnea, and exercise capacity index in chronic obstructive pulmonary disease. N Engl J Med. 2004; 350: 1005-12.
- 151.**Puente-Maestu L, Calle M, Rodríguez-Hermosa JL, Campuzano A, de Miguel Díez J, Álvarez-Sala JL,et al. Health literacy and health outcomes in chronic obstructive pulmonary disease. Respir Med. 2016; 115: 78-82.
- 152.**DeMeo DL, Campbell EJ, Barker AF, Brantly M, Eden E, McElvaney NG, et al. IL 10 Polymorphisms Are Associated with Airflow Obstruction in Severe α_1 -Antitrypsin Deficiency Am J Respir Cell Mol Biol. 2008; 38: 114–20.
- 153.**Rodríguez F, de la Roza C, Jardi R, Schaper M, Vidal R, Miravittles M. Glutation S-Transferase P1 and Lung Function in patients with α_1 . Antitrypsin Deficiency and COPD. Chest. 2005; 127: 1537-43

- 154.**Kim WJ, Wood AM, Barker AF, Brantly ML, Campbell EJ, Eden E, et al. Association of IREB2 and CHRNA3 polymorphisms with airflow obstruction in severe alpha-1 antitrypsin deficiency. *Respir Res.* 2012; 13: 16.
- 155.**Bang KM, Gergen PJ, Kramer R, Cohen B. The effect of pulmonary impairment on all-cause mortality in a national cohort. *Chest* 1993; 103: 536-40.
- 156.** Beaty TH, Cohen BH, Newill CA, Menkes HA, Diamond EL, Chen CJ. Impaired pulmonary function as a risk factor for mortality. *Am J Epidemiol.* 1982; 116: 102-13.
- 157.** Hole DJ, Watt GC, Davey-Smith G, Hart CL, Gillis CR, Hawthorne VM. Impaired lung function and mortality risk in men and women: findings from the Renfrew and Paisley prospective population study. *BMJ.* 1996; 313: 711-5.
- 158.**Schunemann HJ, Dorn J, Grant BJ, Winkelstein Jr W, Trevisan M. Pulmonary function is a long-term predictor of mortality in the general population: 29-year follow-up of the Buffalo health study. *Chest.* 2000; 118: 656-64.
- 159.**Mannino DM, Homa DM, Akinbami LJ, Ford ES, Redd SC. Chronic Pulmonary Disease Surveillance- United States, 1971-2000. *MMWR Surveill Summ.* 2002; 51: 1-16.
- 160.**Mannino DM. COPD: epidemiology, prevalence, morbidity and mortality, and disease heterogeneity. *Chest.* 2002; 121: 121S-6S.
- 161.**Hegab AE, Sakamoto T, Saitoh W, Massoud HH, Massoud HM, Hassanein KM, et al. Polymorphisms of IL4, IL13, and ADRB2 genes in COPD. *Chest.* 2004; 126: 1832-9.
- 162.**Jiménez Masa AE. Cáncer de pulmón y citocinas: variantes clínicas y genéticas. [Tesis doctoral]: Departamento de Medicina, Facultad de Medicina, Universidad de Salamanca; 2012.
- 163.** Shen M, Vermeulen R, Chapman RS, Berndt SI, He X, Chanock S, et al. A report of cytokine polymorphisms and COPD risk in Xuan Wei, China. *Int J Hyg Environ Health.* 2008; 211: 352–56.
- 164.**Córdoba-Lanús E, Baz-Dávila R, Espinoza-Jiménez A, Rodríguez-Pérez MC, Varo N, de-Torres JP, et al. IL-8 gene variants are associated with lung function decline and

- multidimensional BODE index in COPD patients but not with disease susceptibility: a validation study. *COPD*. 2015; 12: 55-61.
- 165.**Ochsner A. Tremendous increase in cancer of the lung; is tobacco a cause?. *Life Health*. 1946; 62: 6.
- 166.**Wynder EL, Graham EA Tobacco smoking as a possible etiologic factor in bronchiogenic carcinoma; a study of 684 proved cases. *J Am Med Assoc*. 1950; 143: 329-36.
- 167.**Xu ZW, Wang GN, Dong ZZ, Li TH, Cao C, Jin YH. CHRNA5 rs16969968 Polymorphism Association with Risk of Lung Cancer--Evidence from 17.962 Lung Cancer Cases and 77.216 Control Subjects. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2015; 16: 6685-90.
- 168.**Bernabé Barrios MJ. Valor de los polimorfismos de los genes CHRNA3A5B4 en la adicción al tabaco. Influencia de los mismos en el proceso de adicción. [Tesis doctoral]; Departamento de Medicina, Facultad de Medicina, Universidad de Salamanca; 2012.
- 169.**Wu MY, Huang SJ, Yang F, Qin XT, Liu D, Ding Y. Detection of nasopharyngeal carcinoma susceptibility with single nucleotide polymorphism analysis using next-generation sequencing technology. *Oncotarget*. 2017; 8: 52708-52723.
- 170.**Campos CZ, Losi Guembarovski R, de Oliveira CEC, Banin Hirata BK, Vitiello GAF. Glutathione S-transferases deletions may act as prognosis and therapeutic markers in breast cancer. *Clin Exp Med*. 2017; doi: 10.1007/s10238-017-0461-6.
- 171.**Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi, et al. Relation of GSTM1 Polymorphism with Leukemia. 2017; 25: 318-21.
- 172.**Li J, Zhu JF, Zhang W, Liu B, Ma HZ. GSTM1 genotype is an independent prognostic factor in clear cell renal cell carcinoma. *Urol Oncol*. 2017; 35: 409-17.

ANEXOS

MODELO CONSENTIMIENTO INFORMADO

- He sido informado por el médico responsable que va a realizarse en el Servicio de Neumología del Hospital Clínico Universitario de Salamanca un estudio de investigación sobre la relación entre determinados genes y el desarrollo de Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC) en personas fumadoras.
- La EPOC se desarrolla en aproximadamente un 20% de las personas que fuman más de 20 cigarrillos al día durante 20 años al menos, y esto implica que además de factores ambientales (tabaco, polución, etc) estén implicados factores genéticos que no están bien estudiados.
- El objetivo principal del estudio es estudiar si existe algún patrón genético concreto que predisponga al desarrollo de EPOC en personas fumadoras.
- Para ello se van a comparar a 2 grupos de personas:
 1. Personas fumadoras sin enfermedades respiratorias crónicas (Asma, Tuberculosis antigua, Bronquiectasias) ni tumores pulmonares y sin EPOC.
 2. Personas fumadoras sin otras enfermedades respiratorias crónicas ni tumores pulmonares que estén diagnosticadas de EPOC.
- El médico responsable me ha solicitado mi autorización y firma de consentimiento para que participe en este estudio de investigación, donde se me realizará:
 - Una extracción de sangre para estudio de algunos genes.
 - Una espirometría forzada (si no la tuviese realizada en el último año). Esta prueba consiste en medir la cantidad de aire que puedo meter y sacar de mis pulmones en una respiración forzada.
- Asimismo, me ha explicado que no tengo ninguna obligación de participar, que es totalmente voluntario y que mi participación no afectará mi cuidado médico ni las decisiones sobre el tratamiento de mi enfermedad (si la tuviese).
- Me ha proporcionado una copia de la información completa acerca del estudio y me ha dado la oportunidad de preguntar sobre cualquier duda relacionada con el estudio. He leído y comprendido todo lo que me ha explicado, y consiento en participar en el estudio.

Identificación del paciente	
Nombre y Apellidos: _____	Tfno: _____
Firma:	Firma:
El paciente	El Investigador

Salamanca , a de de 2.01

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Pruebas complementarias en el estudio de la EPOC.

Tabla 2: Escala de disnea mMRC.

Tabla 3: Principales mediadores inflamatorios en la EPOC.

Tabla 4: SNPs objeto de estudio.

Tabla 5: Condiciones empleadas para el estudio de las deleciones de los genes GSTM1.

Tabla 6: Distribución de la población con y sin EPOC en función de la edad.

Tabla 7: Tabla cruzada género/EPOC.

Tabla 8: Valores descriptivos IPA en pacientes con y sin EPOC.

Tabla 9: Relación IPA y género.

Tabla 10: Valores descriptivos FEV₁ EPOC/no EPOC.

Tabla 11: Clasificación de gravedad obstrucción del flujo aéreo según la ERS.

Tabla 12: Grado de obstrucción de los pacientes EPOC.

Tabla 13: Determinación de niveles de Alfa 1 antitripsina.

Tabla 14: Grado de disnea en pacientes EPOC.

Tabla 15: Antecedentes familiares.

Tabla 16: Asociación de EPOC con profesiones de riesgo.

Tabla 17: Odds-ratio genotípicas en IL-4.

Tabla 18: Frecuencias alélicas en IL-4.

Tabla 19: Porcentajes alélicos en IL-4.

Tabla 20: Análisis modelo dominante y recesivo en IL-4.

Tabla 21: Variables edad e IPA en la ecuación en IL-4.

Tabla 22: Frecuencias y porcentajes alélicos en IL-8.

Tabla 23: Frecuencias alélicas en IL-8.

Tabla 24: Proporciones alélicas en IL-8.

Tabla 25: Odds-ratio genotípicos en IL-8.

Tabla 26: Odds-ratio comparaciones genotípicas en IL-8.

Tabla 27: Variables edad e IPA en la ecuación en IL-8.

Tabla 28: Análisis porcentual alélico en CHRNA5.

Tabla 29: Frecuencias alélicas en CHRNA5.

Tabla 30: Porcentajes alélicos en CHRNA5.

Tabla 31: Variables edad e IPA en la ecuación en CHRNA5.

Tabla 32: Polimorfismos genéticos en GSTM1.

Tabla 33: Variables edad y género en la ecuación en GSTM1.

Tabla 34: Tabla cruzada género GSTM1/EPOC.

Tabla 35: Tabla cruzada edad GSTM1/EPOC.

Tabla 36: Reclasificación de la muestra con FEV₁.

Tabla 37: Reclasificación de la muestra sin considerar FEV₁.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Algoritmo de sospecha diagnóstica de la EPOC.

Figura 2: Fenotipos clínicos de la EPOC.

Figura 3: Confirmación diagnóstica de ACO.

Figura 4: “Treatise of disease of the chest”.

Figura 5: John Hutchinson y su espirómetro.

Figura 6: Etiopatogenia de la EPOC.

Figura 7: Células inmunitarias participantes en la EPOC.

Figura 8: Papel del macrófago en la EPOC.

Figura 9: Esquema mediadores inflamatorios.

Figura 10: Efecto autocrino, paracrino y endocrino de las citocinas.

Figura 11: Estructura del DNA.

Figura 12: Mecanismo de la PCR con sondas Taqman.

Figura 13: Discriminación alélica mediante PCR con sondas Taqman.

Figura 14: Discriminación alélica mediante digestión con enzimas de restricción.

Figura 15 y 16: Representación gráfica de la detección mediante fluorescencia.

Figura 17: Representación gráfica de edades entre EPOC y no EPOC.

Figura 18: Distribución de los pacientes de la muestra por género.

Figura 19: Distribución gráfica IPA EPOC/no EPOC.

Figura 20: Distribución gráfica del IPA por género.

Figura 21: Distribución gráfica FEV₁ EPOC/no EPOC.

Figura 22: Árbol de regresión considerando FEV₁.

Figura 23: Árbol de regresión sin considerar FEV₁.

ABREVIATURAS

EPOC: Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica.

GBD: Global Burden of Disease (carga mundial de morbilidad).

CVRS: Calidad de vida relacionada con la salud.

ATS: American Thoracic Society.

ERS: European Respiratory Society.

GesEPOC: Guía Española de la EPOC.

GOLD: Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease.

FEV₁: Flujo espirado en el primer segundo.

FVC: Capacidad vital forzada.

IPA: Índice paquetes/año.

PBD: Prueba broncodilatadora.

TC: tomografía computerizada.

DLCO: capacidad de difusión de monóxido de carbono.

6WTM: prueba de marcha de seis minutos.

MRC: Medical Research Council.

ACO: Asthma-COPD Overlap (solapamiento asma-EPOC).

PostBD: Post broncodilatador.

PreBD: Pre broncodilatador.

ml: mililitros.

LAMA: Agentes muscarínicos de acción larga.

LABA: Agonistas beta-2 adrenérgicos.

MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad.

HLA: Antígeno leucocitario humano

NO: Óxido nítrico.

ROS: Especies reactivas de oxígeno.

CXCR: Receptor de citoquinas.

EGFR: Receptor de factor de crecimiento epidérmico.

TGF: Factor de crecimiento transformante.

CTGF: Factor de crecimiento de tejido conectivo.

IL-4: Interleucina 4.

TNF α : Factor de necrosis tumoral alfa.

IL-1 β : Interleucina 1 beta.

INF- γ : Interferón gamma.

IL-6: Interleucina 6.

IL-9: Interleucina 9.

GM-CSF: Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos.

IL-10: Interleucina 10.

IL-13: Interleucina 13.

IL-8: Interleucina 8.

GRO- α : Oncogen alfa relacionado con el crecimiento.

MCP-1: Proteína quimiotáctica de monocitos 1.

ENA: Péptido activador de neutrófilos.

TGF β 1: Factor de crecimiento transformante beta 1.

EGF: Factor de crecimiento epidérmico.

VEGF: Factor de crecimiento de endotelio vascular.

NE: Elastasa del neutrófilo.

MMP: Metaloproteasa.

A1AT: Alfa 1 antitripsina.

LBA: Lavado broncoalveolar.

KDA: kilodaltons.

ADN/DNA: Ácido dexosirribonucleico.

ARN/RNA: Ácido ribonucleico.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

Tri-HCl: Trihidroximetilaminometano.

EDTA: Ácido etildiaminotetraacético.

SDS: Dodecil-sulfatosódico.

A: Adenina.

T: Timina.

G: Guanina.

C: Citosina.

SNP: Single Nucleotide Polymorphism (polimorfismo de nucleótido único).

GWAS: Genome-wide association study (estudio del genoma completo).

CHRNA5: Subunidad alfa 5 del receptor nicotínico.

GST: Glutación Transferasa.

GSTM1: Glutación Transferasa mu 1.

g: gramos.

M: Molar.

mM: mili molar.

KCl: Cloruro potásico.

MgCL: Cloruro magnésico.

rpm: revoluciones por minuto.

°C: Grados centígrados.

H₂O: agua.

nm: nanómetros.

Litros: l

µg: microgramos.

µl: microlitros.

D.O: Desviación óptica.

N: Asparragina.

D: Aspártico.

pb: Pares de bases.

SEPAR: Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica.

BODE: Body mass index (índice de masa corporal), airflow obstruction (obstrucción de la vía aérea), dysnea (disnea) and (y) exercise (ejercicio).