



Universitat  
Pompeu Fabra  
*Barcelona*

# Estructura, biología y función muscular esquelética en mujeres con EPOC

Pilar Ausín Herrero

---



# **Estructura, biología y función muscular esquelética en mujeres con EPOC**

**Pilar Ausín Herrero**

**TESI DOCTORAL UPF / 2015**

Directors de la tesi

**Prof. Joaquim Gea Guiral**

**Dr. Juana Martínez Llorens**

Departament de Ciències Experimentals i de la Salut



**Universitat  
Pompeu Fabra**  
*Barcelona*



# ÍNDICE

11	<b>AGRADECIMIENTOS</b>
15	<b>RESUMEN</b>
17	<b>ABSTRACT</b>
19	<b>PREFACIO</b>
19	Comunicaciones
19	Subvenciones
20	Otros estudios
23	<b>ABREVIATURAS</b>
27	<b>I. INTRODUCCIÓN</b>
27	<b>1 La Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica</b>
27	1.1 Definición
28	1.2 Índices multidimensionales
28	1.2.1 Índice BODE
29	1.2.2 Clasificación GOLD
30	1.2.3 Clasificación GesEPOC
32	1.3 Epidemiología y sexo
32	1.4 Susceptibilidad y sexo
33	<b>2 Fisiopatología de la EPOC</b>
33	2.1 Compartimento pulmonar
33	a) Vía aérea y sexo
34	b) Parénquima pulmonar, EPOC y sexo
35	c) Inflamación pulmonar y sexo
40	2.2 Función pulmonar
41	a) Estado nutricional y función muscular
45	b) Actividad física y capacidad de esfuerzo
47	2.3 Inflamación y estrés oxidativo en el compartimento sistémico

48	<b>3. Clínica</b>
48	3.1 Síntomas
48	3.2 Comorbilidades y manifestaciones sistémicas
49	a) Enfermedad cardiovascular
50	b) Hipertensión arterial
50	c) Osteoporosis
50	d) Ansiedad/depresión
51	e) Cáncer de pulmón
52	f) Síndrome metabólico y diabetes mellitus
52	g) Disfunción muscular
53	<b>4. Calidad de vida relacionada con la salud</b>
54	<b>5. Tratamiento</b>
54	5.1 Deshabituación tabáquica
54	5.2 Fármacos
54	a) Broncodilatadores inhalados
55	b) Teofilina
56	c) Glucocorticoides
57	d) Antiinflamatorios
57	e) Antibióticos
58	5.3 Rehabilitación respiratoria
59	5.4 Oxigenoterapia domiciliaria
60	<b>6. Inflamación sistémica</b>
63	<b>7. Afectación muscular</b>
63	7.1 Estructura y función muscular esquelético
66	7.2 Daño y reparación del músculo
68	7.3 Disfunción muscular en la EPOC
68	7.3.1 Factores implicados en la disfunción muscular
70	7.3.2 Músculos respiratorios y EPOC
71	7.3.3 Músculos periféricos en pacientes con EPOC
73	7.4 Pruebas de función muscular

77	<b>II. HIPÓTESIS</b>
79	<b>III. OBJETIVOS</b>
81	<b>IV. MÉTODOS</b>
81	<b>1. Diseño del estudio y aspectos éticos</b>
81	<b>2. Población de estudio</b>
82	<b>3. Evaluación clínica, nutricional, funcional y de calidad de vida</b>
82	3.1 Evaluación clínica
82	3.2 Evaluación nutricional
82	3.3 Función pulmonar convencional
82	3.4 Actividad física
83	3.5 Función de músculos periféricos
83	a) Fuerza de presión de la mano (handgrip)
83	b) Fuerza del cuádriceps
83	3.6 Capacidad de ejercicio
83	3.7 Calidad de vida
84	<b>4. Procesado de las muestras de sangre</b>
84	<b>5. Procesado de las muestras musculares</b>
84	5.1 Fenotipo fibrilar
85	5.2 Fracción de músculo anormal (daño y reparación)
86	5.3 Niveles de transripsomas
87	5.4 Niveles de citoquinas en el músculo
87	<b>6. Condensado exhalado</b>
87	6.1 Obtención de la muestra
88	6.2 Análisis de biomarcadores
88	<b>7. Análisis Estadístico</b>

91	<b>V. RESULTADOS</b>
91	<b>1. Descripción de la población estudiada</b>
91	1.1 Consideraciones generales
91	1.2 Características clínicas, nutricionales y funcionales
98	<b>2. Inflamación</b>
98	2.1 Inflamación sistémica
100	2.2 Inflamación pulmonar
100	<b>3. Vitamina D y metabolismo osteocálcico</b>
104	<b>4. Músculo esquelético</b>
104	4.1 Estructura
104	a) Tipos de fibras
107	b) Tamaño de fibras
108	c) Músculo anormal
111	4.2 Niveles de transcripción genética en músculo
113	4.3 Citoquinas inflamatorias en el músculo
115	<b>5. Relación entre inflamación sistémica, muscular y pulmonar</b>
117	<b>VI. DISCUSIÓN</b>
117	<b>1. Características generales</b>
117	<b>2. Función pulmonar</b>
118	<b>3. Actividad física y capacidad de esfuerzo</b>
119	<b>4. Calidad de vida y síntomas clínicos</b>
120	<b>5. Inflamación sistémica</b>
120	<b>6. Inflamación pulmonar</b>
121	<b>7. Vitamina D</b>
122	<b>8. Estructura y función muscular</b>
122	8.1 Estructura muscular
122	a) Tipos de fibras
123	b) Tamaño de fibras
123	c) Músculo anormal



125	8.2 Niveles de transcripción génica
126	8.3 Niveles proteicos de citoquinas en músculo
126	8.4 Teoría estrogénica
127	<b>9. Relación entre inflamación sistémica, muscular y pulmonar</b>
128	<b>10. Implicaciones clínicas</b>
129	<b>11. Limitaciones</b>
130	<b>12. Fortalezas</b>
133	<b>VII. CONCLUSION</b>
135	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>
173	<b>ADDENDUM</b>



## AGRADECIMIENTOS

Esta tesis no se habría podido realizar sin la ayuda de muchas personas a los que debo dar las gracias.

En primer lugar, mi agradecimiento a todos los pacientes que han participado en este estudio por su gran generosidad, algunos de ellos ya no están. Gracias de corazón. A los “sanos”, familiares algunos de pacientes, mis más sinceras gracias.

Al Dr. Gea, por haber dirigido esta tesis y por ser un ejemplo, mi gratitud y mi respeto.

A la Dra. Martínez Llorens, por haberme acompañado en todo el camino, y por su amistad. Gracias.

Gracias a mis compañeros, Nuria, Sergi, Roberto, Cristina, Albert, Marisol, Diego, Eva, Miquel, Víctor, Carles, Toni F, Toni S, Nacho, Diana, Clara, Elena... por hacer que disfrute cada día viniendo a trabajar, y a los que echamos un poquito de menos, Dr. Broquetas, Mauricio y Alba por vuestras enseñanzas y por tantos buenos ratos.

Gracias a Roser, por ayudarme y por cuidarme.

Gracias a Mireia, sabes que esta tesis también te pertenece.

Gracias a Ana y Ángela por vuestra disposición y vuestra ayuda.

Gracias a Susana por haber trabajado tan a gusto con ella durante unos cuantos años en nuestro hospital de día.

Quiero expresar también mi agradecimiento a la Dra. Esther Barreiro por haberme permitido realizar los experimentos en su laboratorio y hacerme sentir como en casa. Gracias a Marina, Esther Puig, Carme y Xiscu por enseñarme y ayudarme.

Y ahora sí, Gracias a mi familia. A mi padre que siempre ha sido mi espejo, siempre quise ser como él, y por él me hice médico. Y a mi madre, por su dedicación, por su apoyo y por su amor. A Abel por ser mi compañero y por quererme tanto. Y a mis hijos Blanca y Alonso, que nacieron durante mis años de doctorado, han cambiado todo y son la razón de todo.



*A mis padres,  
a Abel,  
a Blanca y Alonso,  
y a ti también Luna.*



## RESUMEN

La disfunción muscular es una importante afectación sistémica en la EPOC, con un origen multifactorial e impacto en la actividad física, capacidad de ejercicio, calidad de vida y mortalidad de los pacientes. Hasta el momento se sabe que existen diferencias clínicas, funcionales y biológicas de la enfermedad en relación al sexo. Sin embargo no se ha analizado en profundidad si existen también diferencias respecto de la disfunción y estructura muscular. **Objetivo:** Analizar las diferencias en la presentación clínica y específicamente en la función, estructura y biología musculares, en función del sexo. **Métodos:** Se incluyeron 21 mujeres y 19 hombres con EPOC estable así como 8 mujeres y 7 hombres sanos. Se analizaron variables clínicas, de función pulmonar y muscular, actividad física y capacidad de esfuerzo así como marcadores de inflamación sistémica y pulmonar (condensado exhalado). Además se realizó biopsia abierta del *vastus lateralis* del cuádriceps a todos los sujetos, estudiándose la estructura (tipo y tamaño de fibras, así como signos histológicos de daño-regeneración) e inflamación musculares. **Resultados:** Las pacientes con EPOC presentan más signos histológicos de daño en el músculo cuádriceps que los hombres con la enfermedad a pesar de que los niveles de afectación funcional, estado nutricional, inflamación sistémica y actividad física fueron similares. Este fenómeno era evidente aún en estadios moderados de la enfermedad. Sin embargo, los signos precoces de regeneración muscular fueron inferiores en las mujeres con EPOC respecto de los varones. Así mismo, el *shift* hacia un aumento en la proporción de fibras de tipo II fue también inferior en las mujeres con EPOC. Asimismo, las mujeres con EPOC presentan mayor disminución de fuerza muscular, de la capacidad de esfuerzo y de los niveles de vitamina D, así como una tendencia a una superior percepción de la disnea. También se confirma la ausencia de relaciones en los niveles de inflamación entre los compartimentos sistémico, pulmonar y muscular. **Conclusiones:** Las mujeres con EPOC presentan una afectación muscular diferenciada de los varones con mayores signos de daño, menores de reparación y menor *shift* hacia fibras de tipo II. Existen diferentes factores que se asocian a la afectación muscular en estas mujeres, como los niveles de vitamina D, la hipoxia o el nivel de actividad física, aunque no pueden descartarse otros como la acción estrogénica que también podrían contribuir a estas diferencias.





## ABSTRACT

Skeletal muscle dysfunction is an important systemic manifestation of the COPD. This dysfunction has a multifactorial origin that provokes significant impact on physical activity, exercise tolerance, quality of life and mortality of the patients. Several studies have showed differences related to gender in disease expression including symptoms, functional aspects and biology, however the effect of gender in muscle dysfunction in COPD is so far an unexplored area. **Aim:** to determine whether gender modifies clinical presentation and functional status of the disease, with special focus on muscle structure, biology and function. **Methods:** 21 female and 19 male COPD patients as well as 8 healthy women and 7 healthy men were consecutively recruited. Anthropometry, body composition, lung function, symptoms, health-related quality of life, physical activity, limb muscle function, exercise capacity, markers of systemic and pulmonary (breath condensate) inflammation were assessed in all the subjects. Open biopsies of the *vastus lateralis* muscle were obtained in all the subjects and analysis of muscle structure (fiber typing, fiber size and muscle damage-regeneration signs) and muscular inflammation were performed. **Results:** COPD women showed more evident histological signs of muscle injury in quadriceps muscle than COPD men in spite of similar functional and nutritional impairment, systemic inflammation and physical activity between both groups. This phenomenon was evident even in moderate stage of the disease. However the early regeneration signs were lower in COPD women compare to COPD men. Moreover, muscular shift from type I to type II fibers was also lower in women COPD in comparison with COPD men. Furthermore, women COPD showed lower quadriceps force, exercise capacity and vitamin D and higher perception of dyspnoea in COPD women. It also confirms the lack of relationship between systemic, pulmonary and muscular inflammation. **Conclusions:** COPD women show differences in muscular structure compared to COPD men with more signs of injury, less signs of regeneration and lower shift from type I to type II fibers. There are some factors related to muscular dysfunction in COPD women as vitamin D levels, hypoxia or level of physical activity, however other factors as oestrogens activity could also contribute to these differences.



# PREFACIO

## Comunicaciones

Los resultados preliminares de esta tesis doctoral han sido presentados previamente en los siguientes congresos:

### Congresos Internacionales:

- **Ausín P**, Martínez-Llorens J, Ferrer A, Casadevall C, Barreiro E, Gea J. Gender differences in COPD patients: Skeletal muscle structure and biology. 2013 ATS International Conference in Philadelphia, United States. Am J Respir Crit Care Med 187, 2013:A6024.
- Martínez-Llorens J, **Ausín Herrero P**, Casadevall C, Barreiro E, Gea J. Gender differences in COPD patients: Skeletal muscle function and structure. 23rd Annual Congress ERS in Barcelona, Spain. Eur Respir J 2013;42 (suppl 57); 2s.

### Congresos Nacionales:

- **Ausín P**, Sánchez-Corredera F, Martínez-Llorens J, Admetlló M, Barreiro E, Gea J. Afectación muscular en pacientes con EPOC en función del sexo. 45 Congreso Nacional SEPAR. La Coruña, España. Arch Bronconeumol. 2012;48:84-124. Pag 85.
- **Ausín P**, Martínez-Llorens J, Admetlló M, Balaña A, Gea J. Disnea, actividad física y capacidad de esfuerzo en mujeres con EPOC. 45 Congreso Nacional SEPAR. La Coruña, España. Arch Bronconeumol. 2012;48:84-124 Pag 91.
- **Ausín P**, Martínez-Llorens J, Sánchez F, Admetlló M, Barreiro E, J Gea. Afectación muscular en mujeres con EPOC. XIII Symposium sobre Enfermedad Pulmonar Obstructiva crónica. Barcelona 2012.

## Subvenciones

Beca de la Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica 2008. Influencia del género sobre las afectaciones sistémicas de la EPOC en población mediterránea. Financiación: 12.000 euros.

## Otros estudios

Durante los años de realización de la presente Tesis doctoral, he tenido oportunidad de participar en otros estudios relacionados con la disfunción muscular en el paciente con EPOC. Dichos estudios han dado lugar a diversas publicaciones:

- 1** Casadevall C, Coronell C, **Ausín P**, Martínez-Llorens J, Orozco-Levi M, Barreiro E, Gea J. Citocinas inflamatorias y factores de reparación en los músculos intercostales de pacientes con EPOC grave. *Arch Bronconeumol* 2009;45:279-85.
- 2** Femoselle C, Rabinovich R, **Ausín P**, Puig-Vilanova E, Coronell C, Sanchez F, Roca J, Gea J, Barreiro Does oxidative stress modulate limb muscle atrophy in severe COPD patients? *E. Eur Respir J.* 2012;40:851-62.
- 3** Puig-Vilanova E, **Ausín P**, Martínez-Llorens J, Gea J, Barreiro E. Do epigenetic events take place in the vastus lateralis of patients with mild chronic obstructive pulmonary disease? *PLoS One.* 2014; 11;9 (7).
- 4** Puig-Vilanova E, Rodríguez DA, Lloreta J, **Ausín P**, Pascual-Guardia S, Broquetas J, Roca J, Gea J, Barreiro E. Oxidative stress, redox signaling pathways, and autophagy in cachectic muscle of male patients with advanced COPD and lung cancer. *Free Radic Biol Med.* 2015;79:91-108.
- 5** Puig-Vilanova E, Martínez-Llorens J, **Ausín P**, Roca J, Gea J, Barreiro E. Quadriceps muscle weakness and atrophy are associated with a differential epigenetic profile in advance COPD. *Clin Sci (Lond).* 2015;128:905-21.

Además he intervenido en dos estudios relacionados con la valoración funcional respiratoria:

- 1** Martínez-Llorens J, **Ausin P**, Roig A, Balañá A, Admetlló M, Muñoz L, Gea J. Nasal inspiratory pressure: an alternative for the assessment of inspiratory muscle strength? Arch Bronconeumol. 2011;47:169-75.
- 2** Paredi P, Goldman M, Alamen A, **Ausin P**, Usmani OS, Pride NB, Barnes PJ. Comparison of inspiratory and expiratory resistance and reactance in patients with asthma and chronic obstructive pulmonary disease. Thorax. 2010;65:263-7.

Y en un estudio sobre nuevos biomarcadores en la EPOC:

To M, Ito K, **Ausin P**, Kharitonov SA, Barnes PJ. Osteoprotegerin in sputum is a potential biomarker in COPD. Chest. 2011;140:76-83.



## ABREVIATURAS

25 (OH) VitD: 25-hidroxivitamina-D  
 $\alpha$ 1-AT:  $\alpha$ 1-antitripsina  
ADN: Ácido desoxiribonucleico  
AMP: Adenosin monofosfato  
AP-1: Activador de proteína-1  
ARN: Ácido ribonucleico  
ATS: American Thoracic Society  
BODE: *Body mass index, Airflow Obstruction, Dysnea and Exercise capacity*  
Ca: Calcio  
CAT: *COPD Assessment Test*  
CO<sub>2</sub>: Dióxido de carbono  
CPK: Creatina fosfoquinasa  
CYP: Citocromo P450  
CSA: *Cross sectional area*  
DE: Desviación estándar  
DLCO: Capacidad de transferencia de CO  
EPOC: Enfermedad pulmonar obstructiva crónica  
ER $\alpha$ : Receptor estrogénico alpha  
ER $\beta$ : Receptor estrogénico beta  
ERS: European Respiratory Society  
FEV<sub>1</sub>: Volumen espiratorio forzado en el primer segundo  
FFMI: *Fat free Mass Index*  
G-CSF: Factor estimulante de colonias de granulocitos  
GH: Hormona de crecimiento  
GOLD: *Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease*  
GOT: Transaminasa glutámico oxalacética  
HDAC: Histona deacetilasa  
HGF: Factor de crecimiento de hepatocitos  
hsCRP: Proteína C-reactiva de alta sensibilidad  
IgE: Inmunoglobulina E  
IGF-1: Factor de crecimiento similar a la insulina  
IFN- $\gamma$ : Interferon -gamma  
IL: Interleuquinas  
IMC: Índice de masa corporal  
IMIM: Instituto de Investigación Médica  
LABA: Agonista  $\beta$ 2 de larga duración  
LDH: Lactate deshidrogenasa  
LAMA: Anticolinérgicos de larga duración

LT: Leucotrieno  
LTB<sub>4</sub>: Leucotrieno B<sub>4</sub>  
M-caderina: Caderina aislada en el tejido muscular  
MET: Equivalente metabólico  
Mg: Magnesio  
MGF: Factor de crecimiento mecánico  
MMRC: Escala modificada del *Medical Research Council*  
MMP: Mieloperoxidasa  
MRF-4: Factor miogénico regulador 4  
MyHC: Cadena pesada de la miosina  
MyHC-emb: Isoforma embrionaria de la miosina  
MyHC-peri. Isoforma perinatal de la miosina  
MyoD: Proteína 1 de diferenciación miogénica  
Myf-5: Factor miogénico 5  
MyoG: Factor de miogenina  
NETT: *Emphysema Treatment Trial*  
NFkB: Factor nuclear kappa beta  
P: Fósforo  
Pax: *Paired box protein*  
PECAM: Molécula de adhesión celular plaquetaria endotelial  
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa  
PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas  
PDE-4: Fosfodiesterasa 4  
PTH: Hormona paratiroidea  
QMVC: Contracción isométrica máxima del cuádriceps femoral  
RV: Volumen residual  
SGRQ: *Saint George Respiratory Questionnaire*  
SOD: Superóxido dismutasa  
SP-D: Proteína D surfactante  
TAC: Tomografía axial computerizada  
TGF-β: Factor de crecimiento transformante  
TLC: Capacidad pulmonar total  
TNF-α: Factor de necrosis tumoral alpha  
TNFR1: Receptor tipo 1 del TNF-α  
TNFR2: Receptor tipo 2 del TNF-α  
UA: Unidades arbitrarias  
VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular  
VO<sub>2</sub>: Consumo de oxígeno







# I. INTRODUCCIÓN

## 1. Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica

### 1.1 Definición

La enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) es una entidad prevenible y tratable, caracterizada por una limitación al flujo aéreo que no es totalmente reversible (1). Esta limitación al flujo aéreo es normalmente progresiva y está asociada a una respuesta inflamatoria anormal del pulmón ante determinadas partículas nocivas o gases, principalmente las derivadas del humo del tabaco. Aunque afecta principalmente al pulmón, también tiene importantes consecuencias sistémicas. Las exacerbaciones y comorbilidades contribuyen también a aumentar la gravedad de la enfermedad (2).

El diagnóstico de limitación al flujo aéreo se realiza por medio de la espirometría forzada, en la cual se debe constatar una disminución en el cociente entre el volumen espirado en el primer segundo ( $FEV_1$ ) y la capacidad vital forzada (FVC), que ha de ser menor de 70% después de la prueba broncodilatadora (1).

Clásicamente se ha clasificado la gravedad de la EPOC según el  $FEV_1$  (expresado como % del valor de referencia, según grupo étnico, género, edad, peso y talla) obtenido en fase de estabilidad clínica.

La clasificación del último consenso entre la *American Thoracic Society* (ATS) y la *European Respiratory Society* (ERS) del año 2004 es la siguiente (2):

GRAVEDAD de la EPOC	% $FEV_1$ /FVC	$FEV_1$ (% ref)
En riesgo	>70	>80%
Leve	<70	>80%
Moderado	<70	80-50%
Grave	<70	30-50%
Muy grave	<70	<30%

**Tabla 1:** Clasificación de la gravedad de la EPOC según la ATS-ERS 2004

## 1.2 Índices multidimensionales

La medición única del FEV<sub>1</sub> ya no parece ser suficiente para valorar adecuadamente la gravedad de la enfermedad, debiéndose considerar otros aspectos como los síntomas del paciente, la capacidad de ejercicio, el riesgo de exacerbaciones, la presencia de comorbilidades o el estado nutricional. A continuación se describen las nuevas clasificaciones de la EPOC según su gravedad, que además tienen implicaciones pronósticas.

### 1.2.1 Índice BODE

El índice de BODE (*Body mass index, Airflow Obstruction, Dysnea and Exercise capacity*) es una escala multidimensional de 10 puntos en los que las puntuaciones más altas indican mayor riesgo de muerte por EPOC. Este índice integra cuatro variables: la obstrucción bronquial medida con el FEV<sub>1</sub>, la capacidad de esfuerzo expresada mediante los metros caminados en la prueba de marcha de 6 minutos, el estado nutricional evaluado por el índice de masa corporal (IMC), y finalmente el grado de disnea utilizando la escala mMRC (*escala modificada del Medical Research Council*) (3). En la siguiente tabla se muestran cómo se puntúan cada una de estas cuatro variables:

	0	1	2	3
FEV <sub>1</sub> (%)	≥65	50-64	36-49	≤35
Distancia, prueba 6 minutos (m)	≥350	250-349	150-249	≤149
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	<21	≤21		
Puntuación escala disnea mMRC	0-1	2	3	4

**Tabla 2.** Variables y valores asignado para el cálculo del índice BODE

De esta forma se integra la EPOC como una entidad clínica con afectación multidimensional. Posteriormente se realiza la suma de puntos asignados a cada una de las cuatro variables, clasificando así a los pacientes con EPOC en cuatro cuartiles según el valor del índice BODE. Los pacientes en el cuartil más alto (valor de BODE entre 7 y 10) presentan una mortalidad del 80% a los 52 meses, mientras que los que se incluyen en el cuartil 1 (índice BODE entre 0 y 2) tienen una mortalidad a los 52 meses de únicamente el 20% (3, 4) (Tabla 3). El índice BODE es por tanto una clasificación de la EPOC que predice mortalidad tanto por causas exclusivamente respiratorias como por todas las causas (3, 4).

Puntuación en escala BODE	Mortalidad global al año
0-2 puntos	20%
3-4 puntos	30%
5-6 puntos	40%
7-10 puntos	80%

**Tabla 3.** Mortalidad según la puntuación del índice BODE

### 1.2.2 Clasificación GOLD

La iniciativa global para la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (GOLD) recomienda la utilización de un sistema multidimensional basado en el grado de limitación al flujo aéreo ( $FEV_1$  post-broncodilatador), síntomas, riesgo de exacerbaciones y comorbilidades. De esta forma, clasifica a los pacientes en 4 categorías: GOLD A, B, C ó D, con implicaciones terapéuticas (1).

- La evaluación del grado de limitación al flujo aéreo se realiza por medio de la espirometría forzada. GOLD 1:  $FEV_1 \geq 80\%$  ref.; GOLD 2:  $FEV_1$  entre el 80 y 50% ref.; GOLD 3:  $FEV_1$  entre el 50 y 30% ref. y GOLD 4:  $FEV_1 < 30\%$  ref.
- Para la evaluación de los síntomas se recomienda el uso de cuestionarios validados, como la prueba de evaluación de la EPOC (CAT – *COPD Assessment Test*) (5) o el cuestionario clínico para la EPOC (CCQ – *Clinical COPD Questionnaire*) (6). También se utiliza la escala mMRC que proporciona exclusivamente una evaluación de la disnea.

- La evaluación del riesgo de exacerbaciones se realiza mediante la recogida del historial de episodios de ese tipo previos y tratados, valorándose la presencia de dos o más por año.
- Las comorbilidades pueden influir en los índices de mortalidad y hospitalización, por lo que se recomienda buscar su presencia sistemáticamente y tratarlas de manera adecuada.

En la siguiente tabla se muestran cada uno de las categorías de la clasificación GOLD para los pacientes con EPOC y las características de cada una de ellas.

Paciente	Características	Clasificación espirométrica	Exacerbaciones por año	CAT	mMRC
<b>A</b>	Bajo riesgo Pocos síntomas	GOLD 1-2	≤1	<10	0-1
<b>B</b>	Bajo riesgo Más síntomas	GOLD 1-2	≤1	≥10	≥2
<b>C</b>	Alto riesgo Pocos síntomas	GOLD 3-4	≥2	<10	0-1
<b>D</b>	Alto riesgo Más síntomas	GOLD 3-4	≥2	≥10	≥2

**Tabla 4:** Evaluación combinada de la EPOC según GOLD 2014

### 1.2.3 Clasificación GesEPOC

En esta clasificación se identifican cuatro fenotipos o formas clínicas de la enfermedad según los cuales se recomienda realizar un tratamiento particular. Los cuatro fenotipos de la clasificación GesEPOC son: no agudizador, mixto EPOC-asma, agudizador con enfisema y agudizador con bronquitis crónica (7). A continuación se describen brevemente las características de cada uno de estos fenotipos:

- Fenotipo agudizador: incluye a todo paciente con EPOC que presente 2 o más agudizaciones moderadas o graves al año. Éstas se definen como aquellas que precisan al menos tratamiento con corticosteroides sistémicos y/o antibióticos.

- Fenotipo mixto EPOC-asma: son pacientes con EPOC pero que además tienen un “componente asmático importante”. Los expertos han consensuado que estos pacientes deben presentar dos criterios mayores o uno mayor y dos menores de los incluidos en siguiente tabla:

Criterios Mayores
Prueba broncodilatadora: $FEV_1 > 15\%$ y $> 400$ ml
Eosinofilia en esputo
Antecedentes personales de asma

Criterios Menores
IgE total elevada
Antecedentes personales de atopia
Prueba broncodilatadora positiva en al menos 2 ocasiones (incremento del $FEV_1 > 12\%$ y $> 200$ ml)

- Fenotipo enfisema: incluye a aquellos pacientes con EPOC y diagnóstico clínico/radiológico/funcional de enfisema, que presentan además disnea e intolerancia al ejercicio como síntomas predominantes.
- Fenotipo bronquitis crónica: paciente con EPOC en el cual la hipersecreción bronquial es el síntoma predominante.

### 1.3 Epidemiología y sexo

La EPOC es un problema de salud muy prevalente, que afecta aproximadamente a un 10% de la población adulta en los países desarrollados (8, 9). La EPOC es además una causa importante de morbilidad, discapacidad y mortalidad a nivel mundial (10) (11). En 1997, se estimaba que podía llegar a ser la tercera causa de muerte hacia 2020 (12). Sin embargo, dicha posición ya se ha alcanzado en 2010 (13).

Históricamente ha tenido mayor prevalencia en varones y ello se ha relacionado con los diferentes patrones de hábito tabáquico de ambos sexos. Actualmente los estudios internacionales todavía muestran una mayor prevalencia en hombres que en mujeres (25% frente a 15%, respectivamente) (8), aunque en los últimos años se ha observado un aumento progresivo de la prevalencia en estas últimas. Por ejemplo, en España ha pasado del 17% en 2004 al 30% en 2007 (9). Además, existe un preocupante aumento en la incidencia de EPOC en mujeres de mediana edad (9, 14). Por otra parte, estudios realizados en Estados Unidos, donde las mujeres comenzaron a fumar en los años 40, muestran que la prevalencia actual de EPOC es incluso mayor en el sexo femenino (15) siendo ya el riesgo de muerte por EPOC similar en ambos sexos (16). Asimismo, recientes estudios epidemiológicos han constatado que la mortalidad de pacientes con EPOC, ajustada por la edad, se encuentra actualmente en descenso en los varones, y sin embargo sigue aumentando entre las mujeres (17).

En cuanto al riesgo de ser hospitalizado y la presencia de exacerbaciones en función del sexo, hay resultados contradictorios. Algunos estudios prospectivos han concluido que el riesgo de hospitalización (18), el de exacerbaciones (19) o la mortalidad debida a la EPOC son mayores en mujeres (20, 21). Sin embargo otros estudios sostienen que estas variables son más elevadas en los hombres con EPOC (22-25).

### 1.4 Susceptibilidad y sexo

Los autores de varios artículos han sugerido que las mujeres podrían ser más susceptibles al humo del tabaco y al desarrollo de EPOC que los hombres.

En un estudio realizado en adolescentes se observó que las fumadoras presentaban un menor desarrollo pulmonar (evaluado mediante el  $FEV_1$ ) que las no fumadoras. Estas diferencias sin embargo no se observaron entre los chicos (26). Otros estudios realizados en poblaciones de pacientes con EPOC concluyeron que las mujeres fumadoras tienen un deterioro más rápido de la función pulmonar en comparación con los varones (18, 27, 28). Sin embargo, al dejar de fumar las mujeres recuperan más función pulmonar que los hombres (29).



En el reciente estudio ECLIPSE se observó que las pacientes con EPOC tenían menos exposición tabáquica para el mismo grado de obstrucción al flujo aéreo o índice BODE que sus controles varones, sugiriendo de nuevo que las mujeres son más susceptibles al humo del tabaco (30). Por otra parte, un estudio realizado en Estados Unidos con más de 2500 pacientes con EPOC, seleccionó aquellos con *Severe early-COPD*, (definido como aquellos menores de 55 años y con FEV<sub>1</sub> inferior al 50% ref.), observando una mayor prevalencia en mujeres (31).

Hay diversos factores que pueden influir en la presencia o desarrollo de la EPOC de forma diferenciada en ambos sexos. Así, las mujeres tienen mayor exposición al humo de madera o carbón que los hombres (32), mientras que éstos estarían más expuestos a otros productos relacionados con trabajos clásicamente masculinos (minería, agricultura, industrias...).

La mayor susceptibilidad de las mujeres a las noxas podría explicarse por el mayor depósito de sustancias nocivas en el pulmón, un aclaramiento de toxinas poco efectivo y/o una exagerada respuesta biológica: aumentando la transformación de ciertos xenobióticos en metabolitos más tóxicos y disminuyendo la conjugación y eliminación de éstos (33).

## **2. Fisiopatología de la EPOC**

### **2.1 Compartimento pulmonar**

La limitación crónica al flujo aéreo característica de la EPOC es causada tanto por enfermedad de la vía aérea (bronquitis crónica, y para numerosos autores también bronquiectasias) como por la destrucción parenquimatosa (enfisema pulmonar) (1).

#### **a) Vía aérea y sexo**

La enfermedad de la pequeña vía aérea es la principal causante de la obstrucción y aumento de la resistencia al flujo aéreo en la EPOC. Los cambios asociados a ésta incluyen (34):

- 1** Obstrucción endoluminal debida a la pérdida de surfactante y su reemplazamiento por exudado inflamatorio y mucoso.
- 2** Engrosamiento de la pared bronquial por inflamación, fibrosis y aumento del músculo bronquial.
- 3** Edema de la adventicia y pérdida de la unión alvéolo-bronquial, lo que supone una pérdida de elasticidad parenquimatosa.

La obstrucción de la pequeña vía aérea en la EPOC se asocia a un engrosamiento de la pared bronquial. Esto se produce por un proceso de remodelado en la reparación anómala del tejido dañado y a la disfunción del aclaramiento mucociliar, lo que conduce a la acumulación de exudado inflamatorio en la luz bronquial. La colonización e infección de la vía aérea en pacientes con EPOC graves (estadio 3) y muy graves (estadio 4) se asocia además a una respuesta inmune adaptativa que explica el elevado número de linfocitos y su organización en folículos linfoides. Es interesante señalar que el engrosamiento de la pared bronquial se ha asociado a un deterioro en la calidad de vida y a un aumento en las exacerbaciones de la enfermedad (35).

### **Diferencias entre sexos**

En cuanto a las diferencias entre hombres y mujeres, un estudio realizado sobre los 1053 pacientes que participaron en el estudio NETT (*National Emphysema Treatment Trial*) observó que las mujeres con EPOC presentaban más enfermedad de vía aérea, caracterizada por un calibre menor de esta y engrosamiento de la pared bronquial en relación a la luz bronquial, incluso cuando se ajustó por FEV<sub>1</sub>, edad y hábito tabáquico. (36). Sin embargo, otros tres estudios posteriores, (uno de ellos incluso realizado sobre un subgrupo de pacientes supervivientes del estudio NETT) (37) contradijeron parcialmente dichos resultados, concluyendo que las mujeres con EPOC no muestran mayor engrosamiento de la pared bronquial que los hombres con la enfermedad (38, 39). Por otra parte, dos recientes estudios realizados con diferente metodología a los anteriores han mostrado que las mujeres que padecen EPOC tienen mayor engrosamiento bronquial y menor calibre en los bronquios subsegmentarios y subsubsegmentarios que los hombres con EPOC (40, 41).

### **b) Parénquima pulmonar, EPOC y sexo**

El enfisema se caracteriza por agrandamiento anormal y permanente de los espacios aéreos distales a los bronquios terminales, acompañado de destrucción de sus paredes (42). Según la distribución anatómica en el lobulillo, el enfisema se clasifica en centroacinar o centrolobulillar, cuando se afectan las partes centrales del acino y están preservados los alveolos distales, panacinar o panlobulillar si los acinos están agrandados uniformemente desde el nivel del bronquio respiratorio hasta el extremo ciego alveolar, paraseptal cuando la porción proximal del acino es normal y se afecta preferentemente la porción distal, e irregular si el acino se afecta de forma heterogénea y casi invariablemente se asocia a cicatrización (43).

Hay que señalar que sólo un 40% de los grandes fumadores desarrollan enfisema y por otra parte, éste puede hallarse en pacientes que todavía tienen una espirometría normal (44). Por otra parte, la presencia y gravedad del enfisema varía mucho entre los pacientes con EPOC. Existen diversos factores clínicos (edad, sexo, IMC, tabaquismo, FEV<sub>1</sub> y exacerbaciones) y biológicos (niveles de IL-6 y TNF- $\alpha$ ) (45) que se han asociado con el grado de enfisema. Así mismo, la progresión de éste también es muy variable dependiendo de algunos factores como el sexo, IMC, tabaquismo y marcadores de inflamación sistémica (fibrinógeno, IL-6, PCR, SP-D) (46).

Existe cierta relación, aunque no muy fuerte, entre el grado de enfisema y el índice acumulado de tabaquismo (44). Sin embargo, no existe ninguna asociación entre este último índice y la progresión de la destrucción pulmonar (46).

Finalmente, el grado de enfisema se ha asociado al deterioro en la calidad de vida, al índice BODE y a sus diversos componentes (escala de disnea, IMC y prueba de marcha) (35).

### **Diferencias entre sexos**

Como ya se ha mencionado previamente, el estudio NETT observó que las mujeres tenían enfisema menos extenso, más central y con espacios sin parénquima de menor tamaño que los hombres (36). Estos hallazgos fueron confirmados en estudios posteriores (39, 41, 47). No obstante, existe un estudio prospectivo sobre 1928 pacientes en el que se observó que las mujeres tenían menos enfisema al inicio del estudio pero presentaban una progresión más rápida a lo largo de éste que los varones (46).

### **c) Inflamación pulmonar y sexo**

El desarrollo de la EPOC se asocia a cambios estructurales y celulares que afectan tanto a las vías aéreas (centrales y periféricas) como al parénquima y arterias pulmonares, siendo secundarias a la reacción inflamatoria producida por el humo de tabaco. Esta respuesta inflamatoria persiste en pacientes tras el abandono del hábito tabáquico y puede verse, aunque disminuida, en individuos fumadores con función pulmonar normal (48).

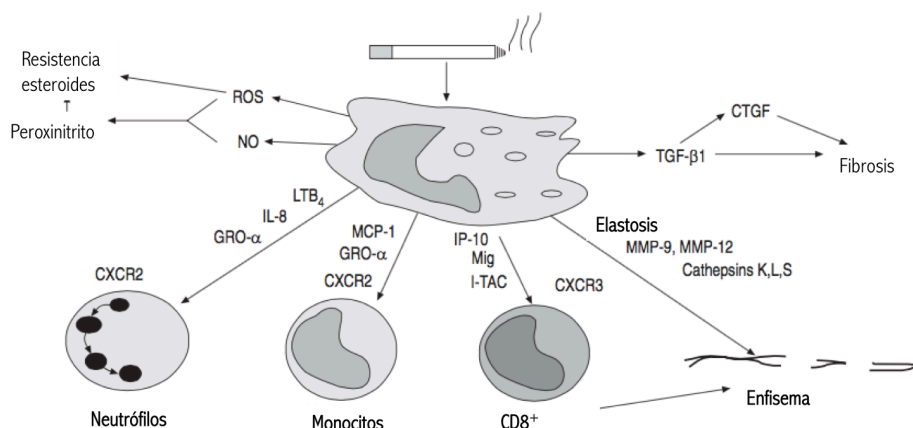
En la vía aérea central de los fumadores hay un importante componente de infiltrado celular, compuesto tanto de linfocitos T como de macrófagos. Los neutrófilos, escasos en la pared, se observan también con frecuencia en la luz bronquial. En la vía aérea periférica se observan infiltrados de macrófagos y mononucleares en la pared bronquial. Lo que diferencia a los fumadores (con o sin EPOC) es la presencia de un aumento de linfocitos T citotóxicos CD8<sup>+</sup>. En los primeros, éstos se correlacionan además con el FEV<sub>1</sub>, lo que

sugiere que tengan un papel en la progresión de la enfermedad (48, 49). También en el parénquima pulmonar se observa un aumento de linfocitos, que se asocia con el grado de destrucción tisular (48).

La interacción, cuyos detalles no son del todo conocidos, de macrófagos, neutrófilos y linfocitos parece ser la responsable del proceso inflamatorio pulmonar. Sin embargo, el macrófago es el que parece jugar un papel central, de forma que una vez activado por el humo del tabaco segregaría distintas proteínas capaces de desencadenar toda la cascada de la inflamación (Fig. 1) (50). Esta cascada incluye diferentes mecanismos de defensa e inflamación, en los que participa una compleja red de citoquinas, cuyo objetivo es activar y reclutar células durante la respuesta inmunitaria. En la EPOC, la exposición a partículas del tabaco produce lesión en las células epiteliales, lo que activa la respuesta inmunitaria a través de receptores *toll-like* (proteínas transmembrana que forman parte del sistema inmunitario), favoreciendo el reclutamiento de células inflamatorias. En primer lugar serán los monocitos, que se diferenciarán a macrófagos, los cuales a su vez segregarán citoquinas que favorecerán el reclutamiento de neutrófilos (51). El factor de necrosis tumoral (TNF)- $\alpha$  es una de estas citoquina con potente acción proinflamatoria, que ejerce su actividad mediante la interacción con dos receptores de membrana, TNF-RI y TNF-RII (48). El TNF- $\alpha$  coordina el proceso inflamatorio en la célula, y estimula el aumento en la expresión de moléculas de adhesión en leucocitos y células endoteliales, con una regulación al alza de otras citoquinas proinflamatorias, como la interleuquina (IL)-1, IL-6 y leucotrieno (LT) $B_4$ . (48). En pacientes con EPOC grave, se ha encontrado un aumento de los valores de TNF- $\alpha$  en el esputo inducido (52), y distintos estudios indican que la producción endógena de IL-8 juega un papel principal en el reclutamiento de neutrófilos, su activación y la amplificación de la respuesta inflamatoria posterior. La IL-8 se ha detectado además en el lavado alveolar de fumadores activos y en el esputo de pacientes con EPOC. Sus valores en esputo se correlacionan muy bien con el grado de obstrucción al flujo aéreo (50, 53). Por su parte, los macrófagos alveolares también secretan enzimas elastolíticas, como las mieloperoxidasa (MMP)-2, MMP-9, MMP-12, catepsinas K, L y S y elastasa. Los macrófagos de pacientes con EPOC secretan más proteínas inflamatorias y tienen más capacidad elastolítica que los fumadores con función pulmonar normal (50, 54).

La inflamación también estaría regulada por una disminución de citoquinas antiinflamatorias o inhibitorias, como la IL-10, IL-11, el receptor antagonista de la IL-1, el factor de crecimiento transformante (TGF)- $\beta$ , IL-11 y el receptor antagonista de la IL-1, que se liberan con el objetivo de limitar la duración y extensión del proceso inflamatorio (50).

Muchos de estos mediadores inflamatorios que se expresan en la EPOC están controlados por el factor de transcripción nuclear- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), que se encuentra sobreexpresado en los macrófagos alveolares de los pacientes con EPOC. Este mecanismo molecular puede ser clave en el desarrollo del proceso inflamatorio que afecta a la vía aérea (50, 53).



**Figura 1.** Papel de los macrófagos en la EPOC. Tomada de Barnes PJ, Shapiro SD, Pauwels RA. *Chronic obstructive pulmonary disease: molecular and cellular mechanisms. Eur Respir J. 2003;22:672-88*

Estos cambios inflamatorios y el desequilibrio proteasa/antiproteasa presentes en los pacientes con EPOC también se observan en algunos fumadores que no han desarrollado obstrucción bronquial, aunque en menor medida. Este hecho sugiere que el descenso acelerado de la función pulmonar en algunos pacientes se puede deber a una amplificación de la respuesta inflamatoria al humo del tabaco. Se ha sugerido que las diferencias entre los sujetos fumadores para el desarrollo de la EPOC podrían explicarse en parte por polimorfismos en los genes que se encargan de codificar las citoquinas, las proteínas antiinflamatorias y/o las antiproteasas (50). Otra hipótesis atribuye un papel etiopatogénico a procesos virales latentes. En este último sentido, se ha aislado con más frecuencia la secuencia E1A de adenovirus latentes en los pulmones de pacientes con enfisema que en fumadores control, y éste se correlacionaría con un incremento de la respuesta inflamatoria (50). Otro mecanismo molecular que puede estar implicado en la amplificación de la respuesta inflamatoria es una disminución en la actividad de la deacetilasa de las histonas (HDAC) en los macrófagos alveolares. La HDAC está implicada en la transcripción de los genes inflamatorios al revertir la acetilación de las histonas nucleares. En pacientes con EPOC hay una marcada reducción en la actividad de esta enzima, comparado con fumadores sin enfermedad, lo que podría explicar una amplificación en la expresión de genes inflamatorios (50).

### **Desequilibrio proteasa-antiproteasa**

Una de las teorías más aceptadas para la formación del enfisema es la presencia de un desequilibrio entre proteasas y antiproteasas. Las primeras son enzimas capaces de lisar componentes del tejido conectivo, especialmente la elastina, con la consecuente aparición de enfisema. Las principales proteasas son la elastasa neutrófila, la proteinasa 3 y la catepsina. Las metaloproteasas de matriz procedentes de macrófagos y neutrófilos también ejercen una gran influencia en la patogénesis del enfisema. Estas enzimas proteolíticas están a su vez reguladas por antiproteasas, principalmente  $\alpha$ 1-antitripsina ( $\alpha$ 1-AT) en el parénquima pulmonar y el inhibidor de las leucoproteasas en la vía aérea. El humo del tabaco produce inflamación y aumenta la liberación de proteasas. Sin embargo, en fumadores que desarrollan EPOC la producción de antiproteasas puede ser insuficiente para tamponar dicho fenómeno, quizás por polimorfismos genéticos que afectan a la función o producción de estas proteínas (53).

### **Estrés Oxidativo**

El humo del tabaco contiene una mezcla de más de 4.700 componentes químicos, entre los que se incluyen una gran concentración de radicales libres y otros oxidantes. El proceso celular normal que se produce en el pulmón por la inhalación de partículas de polución genera también oxidación. Sin embargo, en circunstancias normales se produce un equilibrio entre el efecto tóxico de los oxidantes y el protector que deriva de los sistemas antioxidantes, tanto intra como extracelulares. Un desequilibrio a favor de los mecanismos oxidantes da lugar a lo que se conoce como estrés oxidativo, pudiéndose modificar la estructura y función de proteínas, lípidos y ADN. Tanto en los sujetos fumadores como en pacientes con EPOC se produce estrés oxidativo, que además está amplificado por la presencia de las células inflamatorias, como los macrófagos y los neutrófilos. Éstos a su vez son capaces de producir también sustancias oxidativas que pueden dañar directamente los componentes de la matriz pulmonar. Además, se ha observado cómo los oxidantes del cigarrillo pueden interferir en la síntesis de elastina y en el proceso reparador tisular, lo que contribuye a la aparición de enfisema (53). Los principales antioxidantes del tracto respiratorio son la mucina, el glutatión reducido, la SOD (superóxido dismutasa), la catalasa, el ácido úrico, la albúmina y el ácido ascórbico (55). Hay muy poca información acerca de los valores o la función de estos antioxidantes en fumadores y todavía menos en pacientes con EPOC. No obstante, la presencia de glutatión intra y extracelular parece crítico en el mantenimiento de la homeostasis oxidación-antioxidación (53). Algunos estudios han mostrado niveles más elevados de glutatión en el lavado broncoalveolar de fumadores (56), a pesar de que el humo de tabaco afecta a su producción. Incluso así parece ser insuficiente para contrarrestar el exceso de actividad oxidativa.

## Diferencias entre sexos

La existencia de diferencias en la inflamación en relación al sexo local es un tema poco estudiado hasta el momento. No obstante se ha postulado una teoría en relación a la regulación hormonal del estrés oxidativo. Como hemos mencionado, el tabaco contiene gran cantidad de compuestos químicos, incluido nitrosamina, NNK (4-[metilnitrosamino]-1-[3-piridil]-1-butanona), *minor* alcaloides (e.g., nornicotina, anatabina y anabasina), derivados de N-nitroso, e hidrocarburos policíclicos aromáticos. Al fumar, estos compuestos son rápidamente absorbidos y metabolizados; en una primera fase por oxidación y finalmente mediante conjugación. La primera de estas fases ocurre en 2 etapas, la inicial mediada por el citocromo P450 (CYP) y la segunda por enzimas aldehído-oxidasas. Si se produce un desequilibrio entre estas dos fases, aumentando la fase oxidativa y no la fase de conjugación, se incrementa el estrés oxidativo. Las mujeres fumadoras tienen mayor expresión de CYP que los hombres (Figura 2), quizás debido a que este citocromo está regulado por dos receptores estrogénicos, en concreto el ER y ERb. Ambos receptores son ligandos de los factores de transcripción y miembros del *nuclear receptor family*. Se sabe que ERa se expresa más en mujeres que en hombres, lo que produciría un aumento de estrés oxidativo mientras que ERb se expresa en igual proporción en ambos sexos lo que produciría un aumento de estrés oxidativo (33, 57).



**Figura 2.** Regulación del citocromo P450 por los estrógenos aumentando el estrés oxidativo. Tomada de Sin DD1, Cohen SB, Day A, Coxson H, Paré PD. *Understanding the biological differences in susceptibility to chronic obstructive pulmonary disease between men and women. Proc Am Thorac Soc. 2007;4:671-4.*

## 2.2 Función pulmonar

La principal característica fisiopatológica de la EPOC es la limitación espiratoria al flujo aéreo, como consecuencia del estrechamiento de la vía aérea y, en menor medida, de la pérdida de elasticidad y destrucción del parénquima pulmonar como resultado del enfisema, y de la oclusión de la luz bronquial por secreciones mucosas. A medida que progresa la obstrucción, el vaciado pulmonar es más lento y el intervalo entre los esfuerzos inspiratorios no permite la espiración completa. Esto, junto a otros fenómenos como el desplazamiento del punto de igual presión o los cambios en el volumen de cierre produce hiperinsuflación y/o atrapamiento aéreo. Esta situación empeora todavía más con el ejercicio, al tener que aumentar el volumen corriente y generarse hiperinsuflación dinámica. Como consecuencia de ello, el diafragma se acorta y se hace menos efectivo para generar la tensión deseada. Además, la hiperinsuflación cambia el radio de curvatura de este músculo, colocándolo en desventaja mecánica, ya que sus diversas porciones pasan a actuar “en paralelo”, lo que supone una sobrecarga adicional para los restantes músculos inspiratorios. Todo ello lleva a un incremento de la sensación de esfuerzo muscular y la consiguiente disnea. Estos efectos deletéreos de la hiperinsuflación se ven amplificados, como se ha mencionado, durante el ejercicio (44, 58).

En estadios avanzados de la enfermedad, la obstrucción en la vía aérea periférica, la destrucción del parénquima y las alteraciones vasculares pulmonares reducen la capacidad pulmonar para el intercambio de gases, lo que produce hipoxemia y, en una fase posterior, hipercapnia. El desequilibrio en las relaciones ventilación/perfusión es el principal mecanismo implicado en la hipoxemia de los pacientes con EPOC. La hipercapnia crónica generalmente refleja un grado extremo de desequilibrio ventilación/perfusión y/o la disfunción de la musculatura inspiratoria, con un componente de hipoventilación alveolar (44, 58).

### Diferencias entre sexos

A pesar de que las mujeres presentan menor extensión del enfisema en los estudios morfológicos, curiosamente algunos autores han observado que la capacidad de transferencia de CO (DLCO) está más afectada que en los hombres (59). Esta discordancia entre los hallazgos estructurales y funcionales podría explicarse por la distribución del enfisema, ya que se ha sugerido que la afectación parenquimatosa central altera más la capacidad de transferencia de CO que la periférica (60). Otro estudio también mostró una mayor afectación de la  $DL_{CO}$  en mujeres con EPOC, aunque en este caso se asociaba a una mayor hiperinsuflación, sugiriendo mayor grado de enfisema (61). Este último estudio también señala que las mujeres son más susceptibles a la pérdida de masa muscular y, aunque existía una asociación entre la pérdida de masa muscular y la  $DL_{CO}$  en ambos sexos, era mucho más acentuada en el femenino (61).



En cuanto a la hiperreactividad bronquial, también se han descrito diferencias en función del sexo. Las mujeres con EPOC presentan más hiperreactividad que los hombres, lo que podría ser explicado por una mayor afectación de la vía aérea (62) o por factores inmunológicos u hormonales (63). De hecho, varias subclases de leucocitos tienen receptores hormonales. Así, la progesterona induce cambios en la producción de IL-8 (64) y puede actuar a favor de la producción de citoquinas a través de células Th2 (65).

### **a) Estado nutricional y función muscular**

Las alteraciones nutricionales son frecuentes en los pacientes con EPOC, y se han descrito problemas tanto a nivel de la ingesta calórica, como del metabolismo basal e intermediario y de la composición corporal (66). Pérdidas de peso sin causa aparente pueden ocurrir hasta en el 50% de los pacientes con EPOC en estadio grave, pero también en el 10-15% de los enfermos en estadios leve-moderado (67). Sin embargo, esta pérdida de peso presenta una gran variabilidad geográfica. Mientras que en Estados Unidos y Europa del Norte y del Este estas alteraciones parece afectar al 10-30% de los pacientes con EPOC (68), en España el bajo peso afecta únicamente al 2-3% de la población con la enfermedad (69).

Actualmente existen tres formas diferentes de identificar alteraciones nutricionales asociadas a la EPOC en la clínica (70):

- El porcentaje del peso del paciente sobre su peso ideal, aceptándose como bajo peso unos valores inferiores al 80-85%
- Índice de masa corporal (IMC) inferior a 18,5 kg/m<sup>2</sup>, siendo grave por debajo de 16 kg/m<sup>2</sup> y muy grave si está por debajo de 15 kg/m<sup>2</sup>
- Índice libre de masa grasa (*Fat free Mass Index* ó FFMI) inferior a 16 kg/m<sup>2</sup> en varones y 15 kg/m<sup>2</sup> en mujeres

La composición corporal se evalúa habitualmente mediante la impedancia bioeléctrica, basada en la resistencia de los tejidos al paso de una corriente eléctrica de baja intensidad (70). Esta técnica permite obtener el FFMI.

La pérdida de peso de los pacientes con EPOC se produce fundamentalmente a costa de la disminución de masa muscular, siendo menos importante la destrucción de grasa y masa ósea. También puede haber alteraciones en la composición corporal en ausencia de pérdida de peso, sobre todo en mujeres (66, 71). La pérdida de masa muscular conlleva un empeoramiento en la calidad de vida y en el pronóstico de la enfermedad (72, 73). A

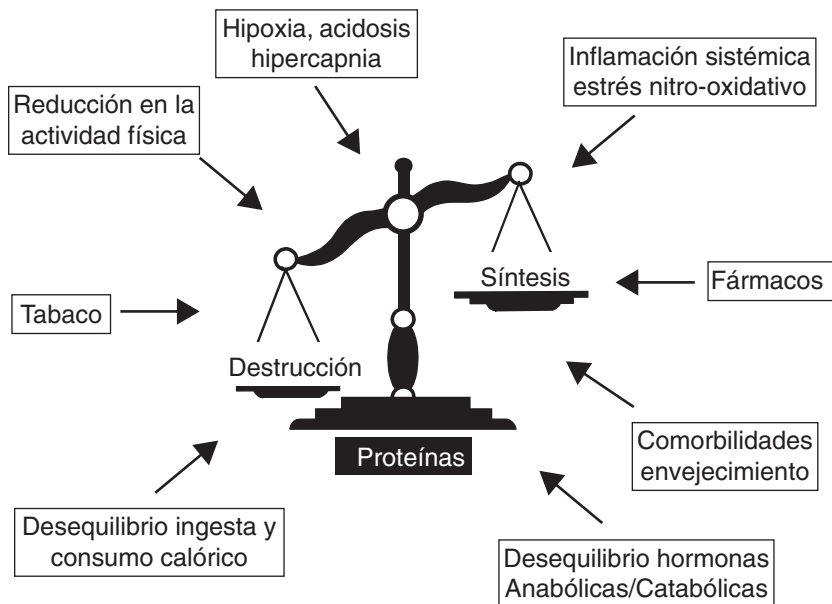
nivel de los músculos respiratorios los pacientes con bajo peso o baja masa muscular pueden presentar problemas de ventilación, sobre todo durante el ejercicio y en las exacerbaciones, mientras que la afectación de los músculos periféricos conllevará la pérdida de fuerza en ellos (68) así como una limitación en la actividad física y la capacidad de ejercicio (70). Es interesante reseñar que en muchos casos, estas alteraciones nutricionales están asociadas, desde el punto de vista funcional, a alteraciones en la capacidad de transferencia de CO (74).

La pérdida de peso, y especialmente de masa magra probablemente tiene un origen multifactorial (70, 75). En primer lugar se ha involucrado el tabaco, ya que es un anorexígeno de efecto central, y condiciona además la aparición de inflamación sistémica y desequilibrio entre síntesis y destrucción de proteínas. También se ha descrito un desequilibrio energético, con aumento del gasto energético basal que se estima en un 120% del normal. Esto es debido fundamentalmente al incremento del trabajo respiratorio en relación con la obstrucción y a la desventaja en la mecánica respiratoria ocasionada por la hiperinsuflación pulmonar (76). Además, diversas circunstancias como las exacerbaciones y el ejercicio empeoran todavía más este escenario (77). Otro factor que incide directamente en el estado nutricional y que está asociado al pronóstico de la enfermedad es la disminución en el nivel de actividad física (78). Es más, se ha demostrado que el incremento de la actividad física puede favorecer también la recuperación nutricional (79). Otro aspecto a destacar sería el desequilibrio entre hormonas anabólicas y catabólicas, ya que diversos estudios han mostrado una disminución de los valores circulantes de hormonas anabolizantes como la testosterona, la hormona del crecimiento y el factor de crecimiento asociado a la insulina en pacientes con EPOC (80, 81). No hay que olvidar tampoco el efecto de la inflamación y del estrés oxidativo. Estos últimos factores se hallan presentes tanto a nivel sistémico como en el músculo y la grasa de los pacientes con EPOC. Los mediadores inflamatorios pueden activar diferentes procesos biológicos y vías metabólicas que favorecen las alteraciones en el estado nutricional (70). Por ejemplo, se ha demostrado que los niveles plasmáticos de TNF- $\alpha$  y de sus receptores I y II, así como de algunas otras citoquinas (IL-6 e IL-8) se encuentran más elevados en los pacientes con EPOC que presentan pérdida de peso que en sus controles con peso normal (72, 82-85). La hipoxia puede también influir en la producción de algunos péptidos implicados en el apetito (leptina, ghrelina y proteincinasa activada por AMP), puede reducir las concentraciones de determinadas hormonas anabolizantes, y provoca inflamación y estrés oxidativo a nivel sistémico a través del sistema nervioso simpático (86). Además puede activar factores de transcripción nuclear, como el NF-kB, responsable a su vez de la regulación de la respuesta inflamatoria, activación de la degradación proteica y aparición de anorexia (87). A su vez, la hipercapnia se asocia frecuentemente a acidosis que puede inducir un descenso en la reserva energética y desequilibrio entre

síntesis y destrucción proteicas (70). También se han descritos otros factores externos a la EPOC, pero frecuentemente asociados a ella, como posibles etiologías adicionales de la pérdida ponderal y de masa muscular. Entre ellos, diversas comorbilidades (insuficiencia cardiaca, diabetes mellitus, cáncer) y el envejecimiento (88-91). Finalmente algunos de los fármacos utilizados en el tratamiento de la EPOC también podrían jugar un papel en la pérdida ponderal de estos pacientes. Así los glucocorticoides, utilizados de forma sistémica principalmente durante las exacerbaciones, inhiben la síntesis proteica y activan el catabolismo causando una miopatía y/o pérdida de masa muscular (70). Los fármacos agonistas  $\beta_2$  por su parte, pueden aumentar también el gasto energético incluso en reposo (92).

### **Mecanismos moleculares implicados**

Probablemente el principal mecanismo en la pérdida de masa muscular de los pacientes con EPOC sea el desequilibrio entre la síntesis y destrucción proteicas (Fig. 3) (70). El sistema más importante de destrucción proteica está ligado al proteasoma, que es un complejo encargado de realizar la degradación de aquellas proteínas que han sido previamente marcadas por el sistema de la ubiquitina o que han sido modificadas por el estrés oxidativo. Este mecanismo se encuentra claramente incrementado en los pacientes con EPOC y bajo peso (93). En el tejido muscular de estos pacientes se ha observado también la presencia de un mayor número de núcleos con signos apoptóticos (82), lo que probablemente sea reflejo del proceso de recambio nuclear, con disminución de la capacidad de síntesis proteica. En cuanto a la autofagia (sistema autofagosoma-lisosoma) parece que se hallaría también anormalmente incrementado en los músculos de pacientes con EPOC que presentan bajo peso (94). Otro mecanismo de proteólisis, asociado a la reducción de actividad física, es el de las calpaínas (enzimas muy presentes en el tejido muscular) que pueden llevar a una acción proteolítica perjudicial en situaciones como la reducción de actividad física. Por el momento no existe evidencia de su papel en la EPOC. Por otra parte, la inflamación sistémica y el estrés oxidativo influyen también en la activación de las vías de proteólisis (87).



**Figura 3.** Factores implicados en la aparición del desequilibrio entre síntesis y degradación proteica en los pacientes con EPOC y bajo peso. Tomada de. Gea J, Martínez-Llorens J, Barreiro E. *Alteraciones nutricionales en la enfermedad pulmonar obstructiva crónica. Med Clin (Barc).* 2014;143:78-84

### Diferencias entre sexos

Varios estudios muestran que las alteraciones nutricionales son más pronunciadas en mujeres que en hombres con EPOC (68). La prevalencia del bajo peso en los pacientes con EPOC de ambos sexos varía en los dos trabajos que lo describen. Engelen y col. estiman la prevalencia en hombres en un 16% mientras que en mujeres asciende a un 35% (95). Sin embargo Schols y col. calculan la prevalencia de bajo peso en un 34% en hombres y hasta en un 42% en mujeres (96). Algunos autores sostienen que las mujeres tienen menor masa magra que los hombres y este fenómeno es más pronunciado en las extremidades inferiores (97). Estos hallazgos también podrían estar relacionados con la mayor afectación en la capacidad de transferencia de CO (como marcador de enfisema) así como con los mayores índices de inflamación sistémica observados en las mujeres (68)

## **b) Actividad física y capacidad de esfuerzo**

### **Actividad física**

Se define como la capacidad no reglada efectuada por un sujeto en su vida cotidiana. La medición de la actividad física se puede realizar mediante cuestionarios específicos y también mediante sensores de movimiento, como podómetros y acelerómetros. Estos últimos instrumentos son los más adecuados para ser utilizados en pacientes con bajo grado de actividad dada su mayor capacidad para detectar niveles de baja intensidad (98). Diversos estudios han demostrado que los pacientes con EPOC realizan una menor actividad física que los sujetos de la población general (99-101). Esta disminución de la actividad física está ya presente en fases tempranas de la enfermedad y empeora a medida que aumenta la gravedad de ésta (102). Diversos factores se han relacionado con la pérdida de actividad física en los pacientes con EPOC. Entre otros, la limitación ventilatoria, los síntomas respiratorios, la depresión asociada y la pérdida de fuerza del cuádriceps (100). Otros autores han relacionado este descenso de la actividad física con la presencia de comorbilidades como la diabetes mellitus, con baja calidad de vida, con el empleo de dispositivos de oxigenoterapia domiciliaria (99), con la presencia de disfunción de ventrículo izquierdo, con elevados niveles de inflamación sistémica (fibrinógeno y PCR) (103) y también con la presencia de exacerbaciones frecuentes (104).

Por otra parte, se ha demostrado que una regular actividad física reduce los ingresos hospitalarios debido a las exacerbaciones (105), los re-ingresos posteriores a una hospitalización (104) la mortalidad (105) y mejora además la calidad de vida (99).

### **Diferencias entre sexos**

Existen solamente dos estudios que analicen las diferencias en la actividad física en función del sexo en pacientes con EPOC, con resultados contradictorios. Yquel y col. evaluaron la actividad física en 10 mujeres y 10 hombres con EPOC mediante el cuestionario de actividad física de Saint-Etienne, observando que las mujeres realizan una menor actividad física. Esto es probablemente debido al estilo de vida con ausencia de un ejercicio físico regular (97). Sin embargo, Verhage y col. que también evaluaron la actividad física en los pacientes con EPOC mediante cuestionario no observaron diferencias entre sexos (61). No existen hasta el momento estudios comparativos realizados mediante acelerómetros o podómetros.

## **Capacidad de esfuerzo**

La capacidad de esfuerzo o tolerancia ante un ejercicio reglado, se puede evaluar mediante la prueba de marcha de 6 minutos y la cicloergometría (también llamada prueba de esfuerzo integrada cardio-respiratoria).

### **Prueba de marcha de 6 minutos**

Consiste en la medición de la distancia caminada de forma rápida por sujeto en una superficie dura y plana durante un período de 6 min. Tiene un buen nivel de estandarización y reproducibilidad y es útil para la evaluación del estado funcional de los pacientes (106, 107).

Corresponde a un ejercicio sub-máximo sostenible de alta intensidad, sobre todo en pacientes con EPOC en estadios avanzados, que permite evaluar la función cardíaca, respiratoria, muscular y transporte de oxígeno (108). Las variables que se miden son: distancia caminada, frecuencia cardíaca, saturación de oxihemoglobina y síntomas (disnea y molestias en piernas) al inicio y fin de la marcha. Es recomendable realizar la prueba 2 veces. Los resultados cuantitativos son expresados tanto en valores absolutos como en valores de referencia según edad y sexo, aunque la validez de estos últimos es controvertida (109).

La capacidad de esfuerzo reducida es un buen predictor de mortalidad en los pacientes con EPOC (110), de hecho una distancia caminada inferior a 350 m se ha asociado con un incremento en la mortalidad (111). La reducción en la capacidad de esfuerzo se ha asociado con el grado de obstrucción bronquial y el nivel de enfisema, con la necesidad de oxigenoterapia, así como con la presencia de síntomas depresivos y mayor grado de disnea (112).

### **Cicloergometría o prueba de esfuerzo cardio-respiratoria**

La prueba de esfuerzo cardio-respiratoria permite evaluar simultáneamente la capacidad de los sistemas respiratorio y cardiovascular para llevar a cabo un adecuado intercambio de gases (113). En primer lugar, mediante la comparación del valor del consumo de oxígeno pico ( $\text{VO}_2$  pico) y del valor de la carga pico, obtenidos durante una prueba de esfuerzo de tipo incremental. Mediante los valores de referencia utilizados es posible determinar si la capacidad de esfuerzo del individuo se ajusta a la normalidad. En segundo lugar, si la capacidad de esfuerzo determinada mediante el  $\text{VO}_2$  pico y/o la carga pico es inferior a la esperada, la prueba de esfuerzo permite además el análisis del factor o factores limitantes de la misma (113).

Característicamente, los pacientes con EPOC tienen una capacidad de esfuerzo inferior a la esperada. Inicialmente se consideraba que esta limitación se debía a la disfunción respiratoria (la resistencia al flujo aéreo y la hiperinsuflación propias de la enfermedad producen un incremento notable del trabajo respiratorio), pero actualmente sabemos que una parte importante se debe al desequilibrio en la utilización de oxígeno por parte de la musculatura esquelética (114, 115). Frecuentemente los pacientes sometidos a una prueba de esfuerzo cardio-respiratoria refieren como síntoma limitante al esfuerzo el dolor en piernas o incluso la fatiga muscular. Estos síntomas se deben a una baja capacidad oxidativa, atrofia y debilidad de los músculos de las extremidades inferiores (115, 116) así como a una reducida capilarización muscular y capacidad aeróbica que llevan a mayores y precoces niveles de lactato arterial durante el ejercicio, debido al metabolismo glicolítico (117).

Por otra parte, el efecto beneficioso del tratamiento broncodilatador sobre la mecánica pulmonar no se traduce en una mejoría paralela en la capacidad de esfuerzo (118) lo que confirma la teoría de un origen multifactorial de la reducción en la tolerancia.

### **Diferencias entre sexos**

En un estudio realizado mediante pruebas de esfuerzo cardio-respiratoria en cicloergómetro se observó que las mujeres con EPOC presentaban un menor pico de potencia anaeróbica y una menor velocidad óptima que los hombres. Esto probablemente se halle relacionado con la pérdida de masa magra en los músculos de las extremidades inferiores y quizás con cambios en el fenotipo fibrilar (97).

### **2.3 Inflamación y estrés oxidativo en el compartimento sistémico**

La EPOC es una enfermedad íntimamente ligada a la inflamación, ya sea local (pulmonar), sistémica o en diferentes órganos periféricos (119). Diversos estudios han demostrado que la concentración en plasma de determinados marcadores inflamatorios está más elevada en pacientes con EPOC que en sujetos sanos. Estos marcadores son principalmente la proteína C reactiva, el fibrinógeno, la IL-6, la IL-8, el TNF $\alpha$ , la IL-1 $\beta$  y las adipocinas (120). Algunos de estos marcadores se han correlacionado tanto con variables clínicas como funcionales (120-123).

Este apartado, será tratado posteriormente con mayor detalle (Pag. 60)

### 3. Clínica

#### 3.1 Síntomas

Los síntomas típicos que presentan los pacientes con EPOC son disnea crónica y progresiva, tos y expectoración, y pueden ser variables a lo largo de los días (1, 124). La disnea es el síntoma cardinal en estos pacientes y la mayor causa de discapacidad y ansiedad asociadas a la enfermedad. Es generalmente descrita como una sensación de falta de aire, inicialmente durante la actividad física pero que en estadios avanzados de la enfermedad puede llegar a estar presente en reposo. Por otra parte, la tos es a menudo el primer síntoma de la EPOC. Sin embargo frecuentemente es infravalorada por el paciente, al considerarla como consecuencia normal de la exposición al tabaco. Generalmente es productiva e intermitente aunque también puede ser no productiva. Otro síntoma común es la expectoración, generalmente de pequeña cuantía y coincidiendo con episodios de tos. La producción de esputo de forma regular durante 3 o más meses al año durante al menos 2 años consecutivos es la definición formal de bronquitis crónica (125). A su vez, el aumento de producción de esputo y/o cambios en su coloración pueden indicar la presencia de exacerbación de la enfermedad. Algunos pacientes también pueden presentar sibilancias y opresión torácica, que aunque habitualmente se asocian al asma bronquial también pueden presentarse de forma variable a lo largo de la evolución de la EPOC. En estadios avanzados de la enfermedad pueden aparecer otros síntomas como la astenia, la pérdida de apetito y la pérdida de peso. La presencia de signos como edemas maleolares e ingurgitación yugular, indicarían la presencia de *cor pulmonale* asociado a la EPOC.

#### Diferencias entre sexos

Los síntomas de los pacientes con EPOC varían en función del sexo y así lo han descrito varios estudios (23, 30, 36, 61, 124, 126-131). Fundamentalmente, las mujeres con EPOC refieren más disnea que los hombres para un mismo grado de obstrucción bronquial (19, 36, 61, 129, 132, 133), incluso con un menor índice acumulado de tabaquismo (30) a la vez que presentan menos expectoración que los hombres (23, 131, 133).

#### 3.2 Comorbilidades y manifestaciones sistémicas

Frecuentemente la EPOC se asocia a afectaciones sistémicas y comorbilidades que pueden aumentar su impacto tanto en número de hospitalizaciones como en mortalidad y en gasto sanitario (120). Probablemente, factores etiopatogénicos como el tabaco o la contaminación, la reducción en el nivel de actividad física y menos probablemente, el persistente bajo grado de inflamación sistémica, sean las causas de las manifestaciones



extrapulmonares de la EPOC, como la disfunción muscular, la caquexia o la osteoporosis. Estos factores también podrían influir en la aparición o empeoramiento de otras enfermedades concomitantes como la afectación cardio-vascular, ansiedad/depresión, cáncer de pulmón o síndrome metabólico (120).

En un estudio realizado en más de 2400 pacientes con EPOC grave y muy grave, se observó que un 76% de estos presentaba algún tipo de comorbilidad, y un 45% presentaba más de una. La hipertensión arterial sistémica fue la más frecuente (42%) seguida de problemas cardiovasculares (20%), diabetes mellitus (14%), osteoporosis (11%), depresión (9%) síndrome metabólico (9%) y finalmente cáncer (6%). Finalmente sólo un 61% de los pacientes recibía medicación específica para el tratamiento de estas comorbilidades (124).

#### **a) Enfermedad cardiovascular**

Los pacientes con EPOC avanzado tienen el doble de posibilidades de padecer una enfermedad cardiovascular que la población general (134). Existe además una fuerte correlación entre el deterioro de la función pulmonar y la mortalidad por causa cardiovascular (120).

**Cardiopatía isquémica:** A pesar de que la EPOC y la cardiopatía isquémica comparten diferentes factores de riesgo como la exposición al tabaco, la edad y el sedentarismo se ha descrito que la primera es un factor de riesgo independiente para la segunda (135).

**Insuficiencia cardíaca:** Existe menos evidencia sobre la asociación de EPOC con insuficiencia cardíaca izquierda. Un estudio estima que alrededor de un 20% de los pacientes con la enfermedad pulmonar tiene algún grado de insuficiencia cardíaca (136); y a la inversa, un 30% de los pacientes con esta última padecen EPOC (137). Es interesante señalar que el grado de obstrucción al flujo aéreo medido por el  $FEV_1$  es un predictor independiente de mortalidad en los pacientes con insuficiencia cardíaca (138).

**Fibrilación auricular:** La fibrilación auricular es la arritmia que más se asocia con la EPOC. Además, entre los pacientes con esta última entidad que han presentado un episodio de fibrilación auricular, aquellos que tienen mayor grado de obstrucción bronquial tienen más riesgo de presentar un nuevo episodio de fibrilación (139). Tanto la enfermedad como algunos tratamientos broncodilatadores podrían explicar esta asociación.

### **Diferencias entre sexos**

La comorbilidad cardiovascular parece ser más prevalente en los hombres que en las mujeres con EPOC (30), tanto por la presencia de cardiopatía isquémica como de arritmias cardíacas (140, 141).

#### **b) Hipertensión arterial**

La hipertensión arterial es probablemente la comorbilidad más frecuente en los paciente con EPOC (124) y tiene además implicaciones pronósticas en esta última enfermedad (142). Según un estudio, los pacientes con EPOC grave y muy grave tienen un riesgo 1.6 veces superior de tener hipertensión arterial que la población general (134).

### **Diferencias entre sexos**

No existen estudios que sugieran una mayor prevalencia de hipertensión en un sexo frente al otro.

#### **c) Osteoporosis**

Los pacientes con EPOC presentan varios factores de riesgo de osteoporosis, como son la edad avanzada, el sedentarismo, el tabaquismo, las alteraciones nutricionales, el déficit de vitamina D, o el bajo índice de masa corporal, así como el tratamiento con corticoides tanto inhalados como orales (120). Por tanto no es extraño que exista una alta prevalencia de osteoporosis en estos enfermos, incluso en estadios iniciales (143). Según diversos estudios entre un 50 a un 75% de los pacientes con EPOC tienen osteopenia y/u osteoporosis (144, 145), y su presencia está fuertemente relacionada con el índice de masa magra (146).

### **Diferencias entre sexos**

La prevalencia de osteoporosis es todavía más elevada en el grupo de las mujeres con EPOC en comparación con los hombres. Sin embargo la incidencia de fracturas traumáticas y no traumáticas es similar en ambos sexos (120).

#### **d) Ansiedad/depresión**

La prevalencia de depresión entre los pacientes con EPOC moderado a grave oscila entre un 7 y un 42% (147). Determinados factores como la disnea, el deterioro en el nivel de

actividad física, el aislamiento social, las hospitalizaciones, la hipoxia y la necesidad de dispositivos de oxigenoterapia domiciliaria contribuyen a la aparición de trastornos de depresión y/o ansiedad (128, 148). Estos generalmente se asocian más a edades tempranas, al hábito tabáquico, al bajo peso, y a la enfermedad cardiovascular concomitante (149, 150) siendo claramente un factor de mal pronóstico en la enfermedad pulmonar (151, 152). Curiosamente, no existe una correlación, o ésta es muy pobre, entre los trastornos de ansiedad y/o depresión y marcadores séricos de inflamación, grado de enfisema o función pulmonar (128). Por otra parte se ha visto que los programas de rehabilitación respiratoria son eficaces en la mejoría de los síntomas depresivos (153).

### **Diferencias entre sexos**

Los trastornos de depresión y/o ansiedad son las comorbilidades mejor estudiadas en relación al sexo. Se sabe así que las mujeres con EPOC presentan mayores índices de depresión y ansiedad que los hombres (36, 120, 128, 133, 154), probablemente porque sean más susceptibles a los aspectos negativos de percepción de la enfermedad, especialmente la disnea. En el mismo sentido, entre las mujeres con EPOC existe una mayor correlación entre la percepción de disnea y los índices de depresión que entre los hombres (128, 154).

### **e) Cáncer de pulmón**

Los pacientes con EPOC tienen entre 3 y 4 veces más riesgo que la población general de padecer cáncer de pulmón (155) siendo éste una causa frecuente de muerte (144). Aunque ambas enfermedades comparten el hábito tabáquico como principal factor etiológico, se ha demostrado que el incremento del riesgo de cáncer de pulmón es independiente a este factor, como sugiere el hecho que pacientes que presentan EPOC y nunca han sido fumadores también tienen más riesgo de padecer cáncer de pulmón (156). Las estirpes celulares del cáncer de pulmón más asociadas a la EPOC son la escamosa y la de célula pequeña (155).

Se ha sugerido que la elevada prevalencia de cáncer de pulmón estaría relacionada con un aumento del estrés oxidativo derivado de la propia fisiopatología de la EPOC (157). Se han descrito además factores inflamatorios comunes a ambas enfermedades, como la activación de NF- $\kappa$ B y posterior cascada inflamatoria (158). La presencia de citoquinas proinflamatorias podría también promover la angiogénesis tumoral, acelerando el crecimiento tumoral y favoreciendo las metástasis (120).

### **Diferencias entre sexos**

Según algunos estudios, las mujeres con EPOC también podrían tener mayor riesgo de cáncer de pulmón que los varones (120), probablemente debido a que los estrógenos regulan la expresión de enzimas de citocromo P450 en el pulmón e hígado, y estas enzimas estarían implicadas en el metabolismo de varios constituyentes del humo del tabaco (159), como se ha mostrado anteriormente en el apartado de Inflamación pulmonar.

### **f) Síndrome metabólico y diabetes mellitus**

Los pacientes con EPOC, incluso en los estadios precoces de la enfermedad presentan mayor riesgo de asociar diabetes mellitus de tipo 2 (riesgo relativo entre 1,5 y 1,8 veces) (120, 134, 160). La causa de esta asociación no es bien conocida pero algunos autores han sugerido que citoquinas proinflamatorias, como TNF- $\alpha$  e IL-6, pueden inducir resistencia a la insulina, bloqueando la señal a través de su receptor (161). El tratamiento con corticoides inhalados no parece influir en el riesgo de padecer diabetes mellitus en los pacientes con EPOC, ya que la asociación con diabetes aparece incluso en estadios precoces de la enfermedad y en pacientes sin tratamiento esteroideo. Además en población asmática, con tratamiento esteroideo frecuente, no se ha constatado un incremento de riesgo de diabetes mellitus (120, 160). Por otra parte, elevadas concentraciones en plasma de sustancias pro-inflamatorias como la PCR, el TNF-  $\alpha$  y la IL-6 se han asociado a la presencia del síndrome metabólico, el cual incluye la presencia de resistencia a la insulina y se asocia a enfermedades cardiovasculares (162).

### **Diferencias entre sexos**

Respecto a la prevalencia de síndrome metabólico y diabetes mellitus en los pacientes con EPOC en función del sexo, existen datos discordantes. Unos autores observan mayor prevalencia de diabetes mellitus en mujeres (140), mientras que otros no hallan diferencias (30, 141), por lo que no es posible sacar conclusiones (30, 140, 141).

### **g) Disfunción muscular**

La disfunción muscular en pacientes con EPOC constituye una de las comorbilidades más importantes, con repercusiones negativas en la capacidad de ejercicio, la calidad de vida de los pacientes (163) y la mortalidad (72). Es muy prevalente en los pacientes con EPOC, afectando a una tercera parte de estos enfermos, y aunque es más frecuente en estadios avanzados puede estar presente en fases iniciales de la enfermedad (164). Afecta tanto a músculos respiratorios como periféricos y está causada principalmente

por tres factores: decondicionamiento por reducción de la actividad física, anomalías nutricionales y quizás, la persistencia de un bajo grado de inflamación sistémica (165, 166). Recientemente, se han involucrado otros factores como las deficiencias de vitamina D (167) o una falta de traducción del efecto de las hormonas anabólicas al factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-1) (77). Al ser éste el tema principal de esta tesis se abordará posteriormente de forma más extensa (Pag 63) .

#### **4. Calidad de vida relacionada con la salud**

Evaluar la calidad de vida relacionada con la salud en los pacientes con problemas respiratorios se ha convertido en un importante objetivo. Prueba de ello es el desarrollo de diversos cuestionarios para su determinación. Entre todos ellos destaca el de St. George, que es específico para la EPOC y que ha sido el más utilizado para evaluar a estos pacientes (168). Es indiscutible que la EPOC está asociada a un deterioro en la calidad de vida. Se han postulado diversos factores que pueden influir en esta percepción. Entre otros la edad, el hábito tabáquico, el grado de disnea y el nivel educativo (169-171). Sin embargo, los que mayor influencia parecen tener son la gravedad de la enfermedad medida por el grado de obstrucción al flujo aéreo (172) y la existencia de exacerbaciones, sobre todo en el año precedente a la evaluación (173).

##### **Diferencias entre sexos**

Diversos autores han demostrado que las mujeres con EPOC tienen peores puntuaciones en los cuestionarios de calidad de vida que los hombres (19, 126, 133). Sin embargo, para otros no existirían diferencias significativas entre ambos sexos (36, 71, 168, 172). Por otra parte, un interesante estudio muestra que los factores que más influyen en la calidad de vida difieren en hombres y mujeres. Mientras que en los primeros los más importantes son la disnea, la capacidad de ejercicio y el grado de hiperinsuflación, en las mujeres son la disnea y el grado de oxigenación arterial. Es decir, que la mecánica respiratoria jugaría un papel más importante en los varones mientras que el intercambio anormal de gases lo haría en las mujeres. Este estudio concluye además que las diferencias en la calidad de vida relacionadas con el sexo únicamente se observan en los estadios más iniciales de la enfermedad (1 y 2), desapareciendo en los más avanzados (174).

## 5. Tratamiento

Aunque recientemente el tratamiento de la EPOC se ha adaptado a las nuevas clasificaciones como GOLD y GesEPOC (1, 7), que tienen en cuenta las características clínicas-radiológicas de los pacientes, en este apartado se describirá el tratamiento de la EPOC de forma más general.

### 5.1 Deshabitación tabáquica

El tratamiento del tabaquismo es un pilar fundamental en el abordaje del paciente con EPOC. Sin embargo, hasta un 30-70% de los pacientes con esta enfermedad continúan fumando a pesar de haber recibido consejo sobre la conveniencia de abandonar dicho hábito (7). Actualmente la intervención terapéutica se basa en una terapia cognitivo-conductual y/o el tratamiento farmacológico mediante la terapia sustitutiva con nicotina o fármacos, como el bupropión o la vareniclina.

### Diferencias entre sexos

Los hombres tienen más éxito en las tentativas de cese del hábito tabáquico que las mujeres (175), quizá debido a que asocian mayor mejoría de los síntomas que éstas (176). Sin embargo, sorprendentemente las mujeres que consiguen dejar de fumar recuperan 2,5 veces más función pulmonar que los hombres (177). Por otra parte, la terapia sustitutiva con nicotina es menos eficaz en cuanto a reducir la ansiedad (*craving*) en mujeres que en hombres, quizás porque en las primeras se produzca una mayor ganancia de peso (171). Respecto a los otros dos tratamientos farmacológicos, bupropion y vareniclina, no se han demostrado diferencias significativas en función del sexo (171).

### 5.2 Fármacos

#### a) Broncodilatadores inhalados

Las guías internacionales (2) sugieren que la terapia broncodilatadora debe iniciarse cuando el paciente está sintomático. Sin embargo, no suelen hacer distinción sobre el tipo de broncodilatador de acción prolongada a elegir como primera opción.

#### Broncodilatadores de acción corta

Los broncodilatadores de acción corta ya sean anticolinérgicos (SAMA), como el bromuro de ipratropio, o  $\beta_2$  agonistas (SABA), como el salbutamol o la terbutalina, son eficaces en

el control rápido de los síntomas. Estos fármacos, añadidos al tratamiento de base, son de elección para el control a demanda de los síntomas, sea cual sea el nivel de gravedad de la enfermedad.

### **Anticolinérgicos de larga duración (LAMA)**

Los fármacos anticolinérgicos bloquean de forma competitiva el efecto de la acetilcolina sobre sus receptores, situados en el músculo liso del árbol bronquial. Producen broncodilatación, reducen la producción de moco y generan efectos anti-inflamatorios. Como consecuencia de estos efectos parece que además disminuyen el número de exacerbaciones (120). El bromuro de tiotropio, bromuro de aclidinio y bromuro de glicopirronio son LAMA desarrollados para el tratamiento de mantenimiento de la EPOC. Presentan ciertas diferencias menores entre sí, pero ninguna de éstas es suficiente para recomendar con mayor fuerza un LAMA frente a los otros (1, 7).

### **Agonistas $\beta_2$ de larga duración (LABA)**

La acción broncodilatadora de estos fármacos se lleva a cabo estimulando los receptores beta-2 adrenérgicos de la vía aérea, lo que ocasiona un incremento del adenosina-monofosfato cíclico intracelular, que al inhibir la fosforilación de la miosina y reducir el calcio iónico intracelular produce relajación del músculo liso bronquial. Además, de forma paralela se bloquea la broncoconstricción inducida por diferentes estímulos, y se puede inhibir la liberación de mediadores por parte de las células inflamatorias, reduciendo la permeabilidad vascular e incrementando el aclaramiento mucociliar (178). Los LABA se hallan representados por dos grupos en función de su vida media, salmeterol y formoterol con una actividad de 12 horas, e indacaterol, olodaterol y vilanterol con actividad por 24 horas.

### **b) Teofilina**

Las teofilinas son fármacos con efecto broncodilatador débil pero que presentan efectos aditivos a los broncodilatadores más habituales. Se ha descrito además un efecto positivo de estos fármacos sobre la fuerza del diafragma así como un aumento del rendimiento de los músculos respiratorios, reducción del atrapamiento aéreo, mejoría del aclaramiento mucociliar y reducción de las agudizaciones. Incluso se les ha atribuido efectos antiinflamatorios (120). En cualquier caso, su limitada eficacia clínica y su estrecho margen terapéutico las relega a ocupar un lugar de segunda línea, estando indicados fundamentalmente en pacientes graves (7).

### **Diferencias entre sexos**

Generalmente, los estudios realizados no están diseñados para evaluar la respuesta del fármaco en función del sexo, por lo que hay muy pocos datos al respecto (171, 175). Algunos trabajos muestran que las mujeres tienen una mayor respuesta inicial al broncodilatador, probablemente asociado al hecho de que muestran también una mayor hiperreactividad bronquial (133). Según otros estudios tanto la combinación de salmeterol/fluticasona como el tiotropio tienen la misma eficacia en cuanto a mejoría de la función pulmonar, síntomas, calidad de vida y disminución del número de exacerbaciones en ambos sexos (179, 180).

### **c) Glucocorticoides**

#### **Glucocorticoides inhalados**

La mayoría de los estudios no demuestran mejoría de la función pulmonar ni de la mortalidad a largo plazo con el uso de los corticoides inhalados, pero hay evidencia de que estos fármacos mejoran la tolerancia al ejercicio y reducen la gravedad y frecuencia de las exacerbaciones con pacientes en estadios GOLD 3 y 4 (181). Actualmente su empleo está indicado en enfermos con agudizaciones frecuentes, es decir cuando se producen 2 o más por año. Por otra parte, los corticoides inhalados en combinación con un agonista beta-2 adrenérgico de acción prolongada son más efectivos que de manera aislada, y contribuyen a un mejor control de los síntomas (1, 7, 181).

#### **Glucocorticoides sistémicos**

Están indicados únicamente en las exacerbaciones de la enfermedad puesto que han demostrado que aceleran la recuperación de los síntomas, mejoran la función pulmonar y disminuyen los fracasos terapéuticos (7). Generalmente se recomienda su uso durante 7-10 días, aunque estudios recientes sugieren que la duración del tratamiento podría ser incluso inferior en aquellas agudizaciones que no precisen de ingreso hospitalario (182).

### **Diferencias entre sexos**

Respecto a los corticoides inhalados, la budesonida, parece ser más eficaz en hombres que en mujeres en cuanto a la reducción de expectoración (129). Sin embargo, las mujeres presentan más efectos deletéreos ante la interrupción de este tratamiento (183).

En cuanto a los corticoides sistémicos, no existen hasta el momento estudios que sugieran diferencias en la respuesta a dicho tratamiento en función del sexo.



#### **d) Otros Antiinflamatorios**

El roflumilast es un antiinflamatorio de administración oral que produce inhibición de la fosfodiesterasa 4 (PDE-4), una isoenzima predominante en la mayor parte de las células estructurales e inflamatorias implicadas en la patogénesis de la EPOC. Actualmente su uso está limitado como terapia adicional en pacientes con EPOC grave asociada a bronquitis crónica y con un historial de exacerbaciones frecuentes. Los escasos estudios publicados muestran que estos fármacos producen en los pacientes con EPOC una discreta mejoría de la función pulmonar, aunque clínicamente parece poco relevante. También parecen disminuir el número de exacerbaciones. Sin embargo, tienen escaso impacto sobre la calidad de vida (SGRQ) o los síntomas. Un inconveniente importante de estos fármacos son los frecuentes efectos secundarios que presentan a nivel gastro-intestinal, como la diarrea, náuseas y vómitos, así como los trastornos del sueño y del estado de ánimo (1, 7, 181).

#### ***Diferencias entre sexos***

No existen hasta el momento estudios que sugieran diferencias entre sexos en la respuesta a roflumilast.

#### **e) Antibióticos**

Estos fármacos se utilizan en las exacerbaciones de causa infecciosa y probable origen bacteriano, así como en casos muy seleccionados de pacientes en estadios avanzados y con agudizaciones frecuentes que, a pesar de un tratamiento correcto de su EPOC, requieren múltiples tratamientos antimicrobianos o ingresos hospitalarios (1, 7, 181). Aparte de este uso coyuntural en las exacerbaciones, los antibióticos pueden usarse también de forma prolongada. Para esto último se utilizan fundamentalmente dos familias, los macrólidos (con intención de aprovechar también su acción antiinflamatoria) y las quinolonas (para lograr una máxima erradicación bacteriana a nivel de la vía aérea). Los primeros son administrados generalmente de forma prolongada y a dosis bajas por su mencionada actividad antiinflamatoria e inmunomoduladora. En pacientes estables con EPOC grave han demostrado reducir de forma significativa el número de agudizaciones (181). A su vez, la utilización de quinolonas durante los periodos de estabilidad (tratamiento de la infección bronquial crónica) ha demostrado poder erradicar las bacterias presentes en el esputo en la mayoría de pacientes con EPOC grave, con lo que se reduce la infección bronquial crónica y el número de exacerbaciones (181).

### **Diferencias entre sexos**

No se existe evidencia de diferencias relacionadas con el sexo tras el tratamiento con antibióticos de forma prolongada.

### **5.3 Rehabilitación respiratoria**

La rehabilitación respiratoria es una parte fundamental del tratamiento de los pacientes con EPOC, y así lo reconocen las principales guías de tratamiento de la enfermedad (184, 185). Está indicada en todos los pacientes sintomáticos, especialmente en aquellos con disnea a pesar de seguir un tratamiento farmacológico correcto, independientemente del grado de enfermedad (184). Los objetivos de la rehabilitación respiratoria son mejorar los síntomas y la capacidad de ejercicio y estabilizar o revertir algunas de las manifestaciones sistémicas de la enfermedad (184, 186). En este sentido, la rehabilitación respiratoria ha demostrado disminuir la disnea, mejorar la capacidad de esfuerzo y la calidad de vida así como mejorar los aspectos psicoemocionales, disminuyendo la ansiedad y la depresión (153, 186). Por otra parte, la rehabilitación respiratoria también ha demostrado reducir el número de días de hospitalización y el uso de los servicios sanitarios, por lo que se considera como una intervención coste-efectiva (186). Sin embargo, no existe suficiente evidencia para determinar si tiene efecto sobre la supervivencia de los pacientes (186). Generalmente se propone que el programa de rehabilitación respiratoria se realice en la fase estable de la enfermedad. Sin embargo, en los últimos años se ha podido demostrar que cuando un programa se inicia inmediatamente después de una agudización, además de ser seguro, muestra los mismos beneficios en términos de mejoría de los síntomas, la capacidad de esfuerzo, la calidad de vida y la reducción de las hospitalizaciones que los programas realizados en fase estable (184, 185).

### **Diferencias entre sexos**

La rehabilitación respiratoria es igual de eficaz en ambos sexos respecto a la mejoría en la calidad de vida a corto plazo. Sin embargo a largo plazo estas mejoría solo parece persistir en los hombres (187). Otros estudios señalan que en las mujeres con EPOC la rehabilitación respiratoria influye más sobre el estado psicosocial que en los hombres, aunque no se han encontrado diferencias en cuanto a mejoría de síntomas respiratorios o mejoría funcional (188).

## 5.4 Oxigenoterapia

La oxigenoterapia es la única intervención, además de la supresión del tabaquismo, que ha demostrado reducir la mortalidad en pacientes con EPOC, atenuando además la insuficiencia cardiaca derecha originada por el *cor pulmonale*, mejorando la función neuropsicológica y aumentando la tolerancia al ejercicio y la capacidad para realizar actividades de la vida cotidiana (189).

### Oxigenoterapia continua

Está indicada en pacientes con EPOC que, en reposo y respirando aire ambiente, mantienen una  $\text{PaO}_2$  inferior o igual a 55 mmHg, y también en aquellos enfermos que presentan una  $\text{PaO}_2$  entre 55 y 59 mmHg, pero además muestran evidencia clínica o electrocardiográfica de hipertensión pulmonar, un hematocrito superior al 55% o signos de insuficiencia cardiaca derecha (1, 7, 181). Para obtener un efecto sostenido de la oxigenoterapia es necesario su administración durante más de 15 horas al día.

### Oxigenoterapia intermitente

Está indicada en aquellos pacientes con EPOC que presentan una  $\text{PaO}_2$  basal superior a 60 mmHg, pero desarrollan hipoxemia en determinadas circunstancias, especialmente durante el ejercicio y el sueño.

Hipoxemia en ejercicio: La corrección de la hipoxemia durante el ejercicio mediante oxigenoterapia mejora el aporte periférico de oxígeno, reduce la demanda ventilatoria, atenúa la hiperinsuflación dinámica y mejora la función cardiaca derecha (190). A corto plazo origina un aumento de la tolerancia al ejercicio y reducción de la disnea (191). A medio plazo mejora también la calidad de vida relacionada con la salud (192), manteniéndose la mejora en la capacidad de ejercicio (193).

Hipoxemia nocturna: Actualmente se considera como hipoxemia nocturna la de aquellos pacientes con desaturación de la oxihemoglobina ( $\text{SpO}_2 < 90\%$ ) durante el sueño por al menos un 30% del tiempo total del registro nocturno, y que presentan consecuencias relacionadas con dicha hipoxia, tales como la poliglobulia o la insuficiencia cardiaca derecha. En estos pacientes estaría indicada la oxigenoterapia nocturna, aunque también se puede considerar el uso de la CPAP (presión positiva continua en la vía aérea) o la ventilación mecánica no invasiva, que pueden sustituir o complementar la propia oxigenoterapia (194).

## Diferencias entre sexos

Los estudios sobre los efectos de la oxigenoterapia respiratoria en relación al sexo de los pacientes con EPOC muestran resultados contradictorios. Mientras que un meta-análisis muestra que las mujeres con oxigenoterapia crónica presentan un mayor aumento de la supervivencia que los hombres (195), otro estudio concluye que su supervivencia es peor (21).

## 6. Inflamación sistémica

Inicialmente se pensaba que la inflamación sistémica de los pacientes con EPOC derivaba de la inflamación pulmonar, que se extendía más tarde al resto del organismo a través de la sangre (teoría de “*spillover*”) (196). Sin embargo, la ausencia de correlación entre los niveles de inflamación en el pulmón, la sangre y otros órganos, incluido el músculo esquelético, así como la existencia de afectación muscular en estadios muy iniciales de la enfermedad precediendo incluso a la afectación pulmonar, van en contra de esta teoría (77, 197).

Los pacientes con EPOC, tanto fumadores como exfumadores, tienen mayores niveles de determinados marcadores de inflamación en el plasma. Es el caso de la PCR, fibrinógeno, leucocitos, TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-8 (121, 198, 199). También muestran aumento de marcadores de estrés oxidativo como F2-isoprostanos y prostaglandinas (200, 201). Ambos fenómenos sugieren que persiste cierto grado de inflamación sistémica a pesar del abandono del hábito tabáquico. Por otra parte, algunos autores han descrito una asociación significativa entre el grado de enfisema pulmonar y los niveles séricos de determinadas citoquinas inflamatorias como IL-6 y TNF- $\alpha$  (45). En el mismo sentido, se ha visto que los niveles séricos de IL-8, IL-6 y TNF- $\alpha$  disminuyen en los pacientes con EPOC en los que se ha reducido el área de enfisema por cirugía de reducción de volumen pulmonar. Este descenso se correlaciona además con la reducción de la hiperinsuflación y la mejoría del IMC después de la cirugía (122).

Por otra parte, diversos autores han observado que los niveles séricos de diversos marcadores de inflamación como PCR, fibrinógeno e IL-6 se elevan durante las exacerbaciones de la EPOC (121, 202-204). Además, niveles elevados de PCR y de fibrinógeno presentes en situación estable se han asociado a un aumento del riesgo de hospitalizaciones por exacerbación (205-207), la gravedad expresada por el índice BODE y el grado de disnea (121).

En los pacientes con EPOC también se ha demostrado un incremento en los niveles séricos de mieloperoxidasas (MMP), fundamentalmente de la MMP-9. Sin embargo existe discrepancia respecto a la asociación entre MMP-9 y el deterioro de la función pulmonar. Mientras unos autores han observado que niveles bajos de MMP-9 se asocian tanto con la gravedad de la enfermedad como con un aumento de mortalidad (199) otros grupos no han observado ninguna correlación (208) o incluso han descrito una relación inversa con el FEV<sub>1</sub> (209), o el deterioro de función pulmonar (210). En otro estudio, se asoció la relación de MMP-9/TIMP-1 (inhibidor de la metalopeptidasa 1) con la obstrucción al flujo aéreo, sugiriendo que un exceso en el denominador podría ser la causa del remodelado bronquial (211). Al igual que sucede con otros marcadores de inflamación se ha descrito un mayor aumento de los niveles de mieloperoxidasas en sangre durante las exacerbaciones (123). Por otra parte algunos autores han observado una elevación de los niveles séricos del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) en pacientes con EPOC, lo que se ha asociado con la gravedad de la enfermedad (199).

Recientemente se ha implicado también al tejido adiposo en la inflamación sistémica. Así la leptina y la adiponectina se han asociado con la respuesta inmune en la EPOC, tanto en fase estable como durante las exacerbaciones (212). Varios estudios han demostrado que la leptina podría tener una acción proinflamatoria, actuando como una citoquina. Sin embargo también participaría en la reparación del daño tisular (213). Por su parte, la adiponectina tendría propiedades antiinflamatorias, reduciendo la producción y actividad de TNF- $\alpha$ , inhibiendo la producción de IL-6 y favoreciendo la producción de la citoquina predominantemente antiinflamatoria IL-10 (214, 215).

### **Diferencias entre sexos**

Respecto a las potenciales diferencias en estos biomarcadores séricos de inflamación en relación al sexo, no hay suficiente bibliografía publicada hasta el momento para sacar conclusiones sólidas. Un pequeño estudio que incluía 40 hombres y 40 mujeres con EPOC (132) permitió observar diferencias significativas en algunos de estos marcadores. En concreto, las mujeres mostraron niveles inferiores de IL-6 y VEGF y niveles superiores de IL-16 (quimioatrayente para diversas células inmunitarias como células T, monocitos, eosinófilos y células dendríticas) que los varones con la enfermedad. Otro estudio sin embargo, que incluía 159 mujeres y 249 hombres, no mostró diferencias en los niveles de PCR, TNF- $\alpha$ , IL1 $\beta$  e IL-6 entre ambos sexos (216).

### **Mecanismos genéticos implicados en la respuesta inflamatoria**

Hasta el momento, el único factor de riesgo genético conocido en pacientes con EPOC es el déficit plasmático de  $\alpha_1$ -antitripsina (217). Otros polimorfismos detectados en genes que codifican proteínas inflamatorias como la PCR y la IL-8 no han mostrado ninguna asociación con el riesgo de padecer EPOC. Sin embargo, estudios amplios de perfiles de expresión génica han mostrado la sobreexpresión de diversos genes que codifican citoquinas inflamatorias, y regulan la activación, proliferación y diferenciación celular (218). De este modo, se han publicado diversos estudios sobre polimorfismos en el gen de la IL-6, asociados a la susceptibilidad de presentar EPOC (219-221). Asimismo se han descritos polimorfismos en el gen que codifica el TNF- $\alpha$ , pero en este caso la relación con el riesgo de presentar EPOC no es del todo consistente, ya que los resultados publicados son contradictorios (222, 223). Recientemente se ha relacionado la presencia de polimorfismos del gen de la adiponectina, cuyo papel en la inflamación es algo controvertido, con el riesgo de presentar EPOC (224). En este sentido ha surgido recientemente la hipótesis de que la disfunción adipocítica podría favorecer el proceso inflamatorio sistémico y contribuir al desarrollo de comorbilidades.

## 7. Afectación muscular

A continuación se revisará específicamente la afectación muscular en los pacientes con EPOC, describiendo la estructura y función del músculo esquelético normal así como las alteraciones secundarias a la enfermedad.

### 7.1 Estructura y función del músculo esquelético

La unidad del músculo esquelético es la fibra muscular. En un corte transversal de ésta se observa que tiene forma poligonal, con los núcleos en la periferia. Entre los haces musculares se puede distinguir tejido conjuntivo, en el cual están incluidos los vasos sanguíneos y los nervios (Fig. 4).

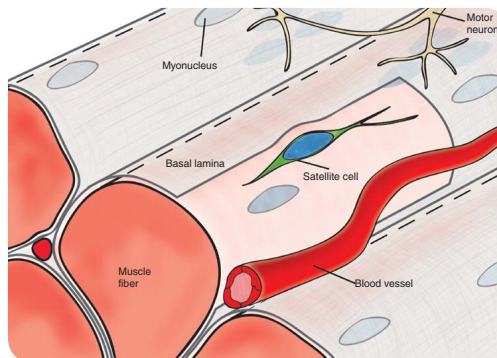
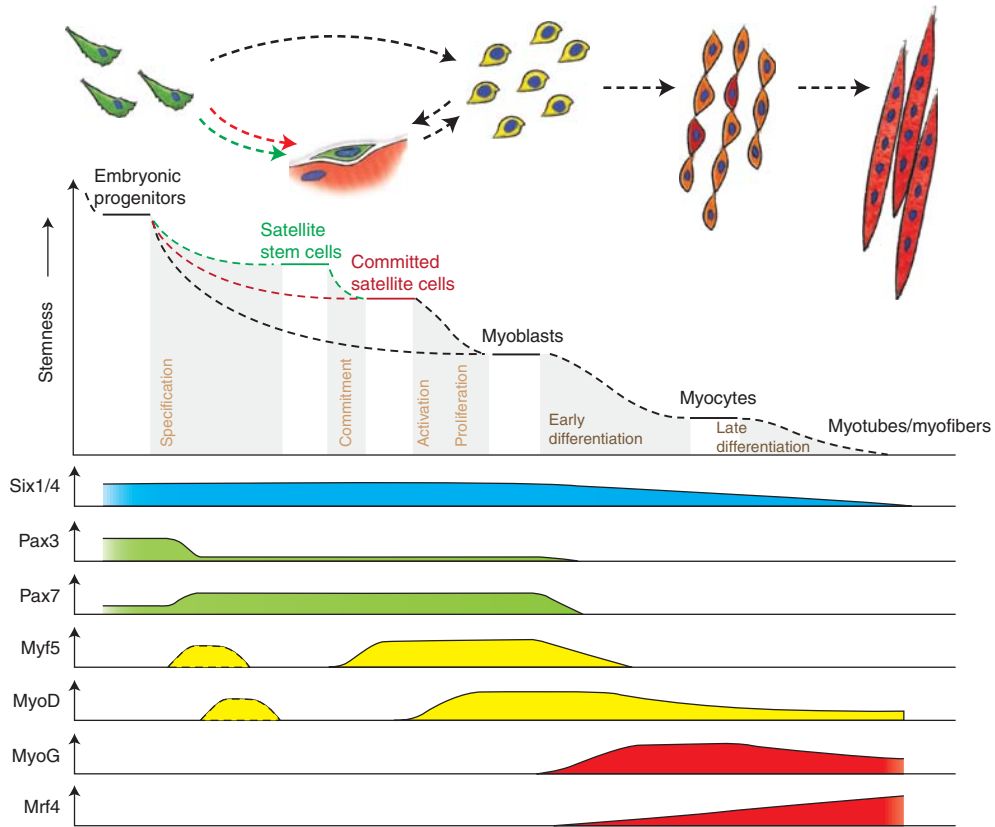


Figura 4. Representación de una fibra muscular estriada. Tomada de Bentzinger CF1, Wang YX, Rudnicki MA. *Building muscle: molecular regulation of myogenesis* Alteraciones nutricionales en la enfermedad pulmonar obstructiva crónica. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012 Feb 1;4(2).

Las fibras musculares se forman a través del proceso de miogénesis, el cual tiene 2 fases: el crecimiento y la diferenciación. Algunas células progenitoras sin embargo, se dirigen directamente a la fase de diferenciación, sin fase de célula satélite quiescente, y directamente se transforman en mioblastos. Otras células progenitoras permanecen como células satélites y forman una población heterogénea de células madre. Las células satélite quiescentes pueden activarse, e iniciar el proceso de miogénesis. Sin embargo, una vez activadas pueden retornar también de nuevo a la fase de reposo (Fig. 4). Los principales factores de regulación de la fase miogénica inicial de proliferación son el Six1/4, Pax3 (*Paired box protein*) y Pax7, mientras que Myf5 (factor 5 miogénico) y MyoD (proteína 1 de diferenciación miogénica) conducen las células hacia el proceso de diferenciación. Esta última fase conlleva también la fusión de los miocitos formando miotubos y se lleva

a cabo a través de los factores miogenina (MyoG) y el MRF4 (factor miogénico regulador 4) entre otros (225). Cuando el músculo adulto se lesiona, las células satélite se activan, transformándose en mioblastos e iniciando el proceso de miogénesis.



**Figura 5.** Regulación del proceso de miogénesis por los factores de transcripción. Tomada de *Bentzinger CF, Wang YX, Rudnicki MA. Building muscle: molecular regulation of myogenesis Alteraciones nutricionales en la enfermedad pulmonar obstructiva crónica. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2012 Feb 1;4(2).*



El músculo esquelético tiene dos propiedades funcionales fundamentales: la fuerza, o facultad de desarrollar un esfuerzo máximo, y la resistencia o capacidad de mantener un esfuerzo submáximo a lo largo del tiempo. Para llevar a cabo estas dos funciones las fibras musculares son funcionalmente heterogéneas y se diferencian en función de tres factores:

- 1 Características funcionales: contracción lenta y contracción rápida. Estas últimas a su vez se subdividen en resistentes a la fatiga, con resistencia media a la fatiga y muy fatigables.
- 2 Metabolismo: según sea predominantemente oxidativo o glicolítico.
- 3 Expresión predominante de las isoformas de las cadenas pesadas de miosina (MyHC, sigla en inglés de *Myosin Heavy Chain*): MyHC I, MyHC IIa, MyHC IIx y MyHC IIb (esta última presente en algunas especies animales pero ausente en humanos). Existen también fibras mixtas, que coexpresan dos o más isoformas de miosina.

Según estos tres criterios, las fibras musculares pueden clasificarse de la siguiente manera (226):

Características	Fibras I	Fibras IIa	Fibras IIx	Fibras IIb
Funcionales	Contracción lenta Resistente fatiga	Contracción rápida Resistente fatiga	Contracción rápida Resistencia media	Contracción muy rápida Muy fatigables
Metabolismo	Oxidativo-aeróbico	Intermedio: oxidativo-glicolítico	Glicolítico	Glicolítico
Expresión MyHC predominate	MyHC I	MyHC IIa	MyHC IIx	MyHC IIb

**Tabla 4: Fibras musculares:** Clasificación según propiedades funcionales, metabólicas y expresión de las isoformas de MyHC.

Las proporciones de cada tipo de fibra en un músculo dependen de la acción específica del mismo (227), pero pueden variar en sus diferentes zonas, y también modificarse en respuesta a diversos estímulos como el entrenamiento o el esfuerzo. Estos pueden regular el tamaño y tipo de fibra para adaptarse a los nuevos requerimientos funcionales (228).

## 7.2 Daño muscular y reparación del músculo

El daño muscular se define como cualquier lesión estructural causada por una noxa específica. Generalmente es debido a un exceso de carga, lo que motiva un aumento en la potencia necesaria para la realización de cada contracción y puede producir daño. Sin embargo, factores como la inflamación, el estrés oxidativo, la hipoxemia, la hipercapnia, el envejecimiento, la desnutrición o la inmovilización también pueden generar daño muscular. En alguna de estas últimas circunstancias el daño se asocia además con atrofia (menor tamaño) de las fibras, especialmente las de tipo I (229, 230).

El mecanismo de daño-reparación muscular se puede dividir en tres partes: lesión, fagocitosis-inflamación, y remodelado, con eventual restauración de la función muscular. Como resultado del daño puede producirse una necrosis celular debido a la rotura de la membrana y a la activación de proteasas calcio-dependientes. A nivel molecular también puede producirse rotura de las sarcómeras. Estos hechos van seguidos de una invasión de células inflamatorias dentro del tejido muscular. En primer lugar llegan los neutrófilos y posteriormente dos diferentes subclases de macrófagos: los M1 que secretan citoquinas inflamatorias y promueven la fagocitosis de material necrótico celular y proliferación de células satélites, y los M2 que producen citoquinas anti-inflamatorias que son fundamentales para la diferenciación mioblástica y la regeneración. Por tanto ambas poblaciones de macrófagos son fundamentales para la correcta actividad miogénica (231).

Los mecanismos moleculares intracelulares que acaban generando daño muscular no son todavía bien conocidos, pero parece que un aumento del calcio procedente del retículo sarcoplásmico produciría, como ya se ha comentado, una lipólisis de la membrana celular y además generaría la degradación de diversas enzimas, con activación de la calpaína, una proteasa citoplasmática responsable de la degradación de proteínas del citoesqueleto (desmina y  $\alpha$ -actina)(232).

Tras la lesión, y dependiendo de variables asociadas con el tipo del estímulo y la integridad de los mecanismos de reparación, puede producirse la restauración o no de la función muscular. El resultado final de la regeneración o reparación muscular. Se denomina remodelación si existen cambios en el fenotipo muscular final. Esto puede incluir modificaciones en la expresión de las diferentes isoformas de MyHC y también

cambios metabólicos y funcionales en el músculo. Si el fenotipo final es muy similar al inicial se considera “*restitutio ad integrum*”. El elemento principal que interviene en el proceso de la miogénesis son las células satélite, que al activarse se fusionan con las fibras musculares, integrando sus núcleos en ellas e iniciando todo el proceso que se ha explicado anteriormente.

### **Cuantificación del daño**

Básicamente existen tres formas para cuantificar el daño muscular:

- Mediante detección de proteínas en una localización aberrante por ruptura de la membrana celular. Dentro de esta tipo de técnicas se ha descrito la detección de CPK, GOT y LDH en sangre periférica. También la detección de fibronectina, una proteína de alto peso molecular y localización extracelular dentro del citoplasma de la fibra. Esto último puede ir asociado a la ausencia de desmina, proteína de bajo peso molecular y localización intracelular. Todos estos fenómenos indicarían que se han producido fragmentaciones en la membrana celular y por tanto daño muscular (233). De forma similar, la detección de colorantes, que han sido administrados por vía intravenosa y son incapaces de penetrar en las fibras en circunstancias normales, en el interior de éstas, también indicaría la existencia de fragmentaciones de la membrana celular (234).
- Mediante técnicas histológicas que permitan la determinación de porcentaje de “músculo anormal”. Entre otras, la descrita por Macgowan (235), que aproxima de una forma sencilla la presencia y magnitud de los fenómenos de daño y regeneración a nivel muscular. Es la técnica utilizada en la presente tesis, y por ello se explica con detalle en el apartado de Métodos. Básicamente se realiza contabilizando una serie de alteraciones en la estructura del músculo: fibras con núcleos internos, presencia de células de aspecto inflamatorio, presencia de depósitos de lipofucsina, células anormales y signos de inflamación. Posteriormente se obtiene el porcentaje de “músculo anormal” respecto al total de músculo evaluado. La presencia de núcleos internos indica la presencia de regeneración muscular, puesto que los núcleos adoptan esta localización para iniciar dicho proceso (236).
- Mediante el análisis de las diferentes estructuras, fundamentalmente las sarcómeros, mediante microscopía electrónica (237).

### 7.3 Disfunción muscular en la EPOC

La disfunción muscular se define como la incapacidad de un músculo para cumplir su cometido y se expresa como alteraciones en la fuerza, en la resistencia o en ambas (238). Es probablemente la manifestación sistémica más estudiada de la EPOC y tiene un origen multifactorial, tanto con factores etiológicos locales como sistémicos, afectando tanto a músculos respiratorios como periféricos (77).

#### 7.3.1 Factores implicados en la disfunción muscular en los pacientes con EPOC

**Inflamación local y sistémica:** Pueden conducir a la activación de diferentes vías celulares produciendo atrofia y/o disfunción muscular mediante apoptosis, autofagia, estrés oxidativo y activación de sistemas catabólicos como el del proteasoma-ubiquitina (77). Además ciertas citoquinas como el TNF- $\alpha$  pueden inhibir *per se* la contracción muscular (239). Sin embargo, el papel de las citoquinas a nivel local muscular no está claro. Algunos estudios sugieren que podrían participar no sólo en el daño y la disfunción muscular si no también en los mecanismo de reparación (240, 241).

**Estrés oxidativo local y sistémico:** Cuando la presencia de radicales libres supera la capacidad de los mecanismos antioxidantes, tanto a nivel sistémico como local se producen lesiones de diferentes estructuras moleculares (proteínas, lípidos, ADN), con importantes consecuencias en la estructura y función celulares (242, 243).

**Estado nutricional:** Como ya se ha mencionado anteriormente, las alteraciones nutricionales son frecuentes en los enfermos con EPOC (66). Estas alteraciones pueden ocasionar disminución de la masa muscular, cambios en las proporciones y tamaños de las fibras (88) y finalmente disfunción muscular (244).

**Decondicionamiento:** Hoy en día se cree que es la causa principal de las alteraciones musculares periféricas que presentan los sujetos con EPOC. La reducción de la actividad física ya sea secundaria a la limitación ventilatoria, al estilo de vida o a la depresión reactiva que a menudo acompaña a la enfermedades son muy frecuentes en los pacientes con EPOC (99, 100). Los resultados son similares a los que presentan pacientes con inmovilización o desuso de un grupo muscular, produciendo fibras de menor tamaño y aumento de la proporción de las de tipo II (245). Sin embargo, estos cambios pueden ser reversibles, al menos parcialmente con el entrenamiento (246, 247).

**Hipoxia-hipercapnia:** La hipoxia puede aumentar el nivel de inflamación sistémica y de estrés oxidativo, así como producir un desequilibrio proteico, apoptosis y alteraciones

en la regeneración muscular (165, 248-251). Todo ello puede conducir a una reducción en la fuerza y en la resistencia musculares. La hipercapnia por su parte puede producir también disfunción muscular (252), aunque en general, ésta última es producto de la acidosis secundaria, que induce desequilibrio en la síntesis/catabolismo proteico (253) y afecta también directamente a la contracción muscular (252).

**Hormonas anabolizantes:** La hormona del crecimiento (GH) aumenta la producción y acciones del factor de crecimiento asociado a la insulina (IGF-1), que interviene en la síntesis proteica e inhibe la degradación. Aunque los niveles de GH pueden ser normales en los pacientes con EPOC, la interacción entre GH e IGF-1 parece estar alterada (80). Por otra parte, la testosterona, hormona anabolizante que aumenta la síntesis proteica muscular, podría también estar disminuida en algunos pacientes con EPOC, contribuyendo así a reducir su masa muscular (81).

**Comorbilidades y envejecimiento:** La disfunción muscular es también frecuente en otras enfermedades muy prevalentes como la insuficiencia cardiaca, la diabetes mellitus o el cáncer. Estas enfermedades, como se ha descrito previamente son comorbilidades habituales también en los pacientes con EPOC. Por otra parte, el envejecimiento *per se* implica una pérdida de masa muscular y atrofia de las fibras musculares (sarcopenia) (88-91).

**Tabaco:** El tabaco en sí puede también dar lugar a pérdida de masa muscular aumentando la proteólisis, la apoptosis, la autofagia y a través de mecanismos epigenéticos (82, 93, 254, 255). También produce un aumento de la inflamación sistémica y del estrés oxidativo (256). Todo ello disminuye la proporción de fibras de tipo I, lesiona las fibras y reduce la actividad mitocondrial (254).

**Exacerbaciones:** Es uno de los factores que se cree contribuye de forma determinante a la disfunción muscular, tanto por su propio efecto, al aumentar la inflamación y estrés oxidativo, como por otros factores asociados a ella como son el encamamiento, y los fármacos esteroideos (77, 238, 257). Por otra parte, los pacientes con EPOC con mayor grado de disfunción muscular también tienen un riesgo superior de exacerbaciones (258).

**Vitamina D:** Varios estudios han mostrado un déficit de 25-hidroxi-vitamina-D (25(OH) VitD) en pacientes con EPOC en comparación sujetos sanos e incluso con fumadores. Se ha descrito además una correlación entre los niveles de esta vitamina y la gravedad de la enfermedad (167), así como con la progresión del deterioro de función pulmonar y el riesgo de exacerbaciones (259, 260). Otros autores, aunque no observaron diferencias significativas en cuanto a los niveles de 25 (OH) Vit D (aunque sí una fuerte tendencia:  $p=0,07$ ) entre pacientes y sanos, sí constataron un aumento en la hormona paratiroidea

(PTH) lo que indicaría una disminución en la relación 25(OH) VitD/PTH, sugiriendo algún tipo de resistencia a la vitamina D en pacientes con EPOC (261). Diversos factores pueden favorecer el déficit de vitamina D en estos enfermos con EPOC. Por un lado se ha descrito una ingesta insuficiente de la vitamina, al menos en la población española (262), y por otra parte los pacientes tienden a reducir el tiempo que pasan fuera de casa a medida que avanza su enfermedad (263), lo que como es conocido afectaría a la síntesis de la vitamina.

Respecto a la afectación muscular, la deficiencia de vitamina D se ha asociado con atrofia de fibras de tipo II (264, 265). Por otra parte, los suplementos de esta vitamina han demostrado que aumentan tanto el tamaño como la proporción de ese tipo de fibras (266, 267). Finalmente, algunos estudios han observado una asociación entre los niveles de vitamina D y la fuerza muscular tanto en población sana (261) como en población anciana (268-270). Sin embargo, hasta la fecha, no se han demostrado este tipo de asociaciones en pacientes con EPOC (261), aunque algunos autores sugieren que el tratamiento con Vitamina D durante la rehabilitación en aquellos pacientes concretos que presentan deficiencia de vitamina D podría tener efectos beneficiosos (271).

### **7.3.2 Músculos respiratorios y EPOC**

En los pacientes con enfisema pulmonar, el diafragma debe realizar un mayor trabajo bajo unas condiciones extremadamente adversas. Por una parte la hiperinsuflación pulmonar hace que las fibras pierdan su curvatura natural, aplanándose y acortándose. Esto lo aleja de su longitud óptima para generar fuerza y por otra parte, el aumento de las resistencias en la vía aérea y del propio parénquima implican un aumento adicional en el trabajo respiratorio, fundamentalmente en la fase inspiratoria. Pero no sólo están expuestos a estos factores deletéreos mecánicos locales sino también a la inflamación y el estrés oxidativo, tanto sistémicos como locales, a las alteraciones nutricionales, y a determinados tratamientos, fundamentalmente los corticoides sistémicos, que tienen todos ellos efectos negativos sobre los músculos respiratorios (77). A esto hay que sumar además el aumento en las demandas de oxígeno y nutrientes por parte de los músculos periféricos que también pueden hallarse afectados en estos pacientes, que se suma a las alteraciones en el intercambio de gases en el pulmón (242).

Sin embargo, la función del diafragma no se halla tan alterada como cabría esperar. De hecho la fuerza que es capaz de desarrollar en estos pacientes es superior incluso a la de sujetos sanos si ambas poblaciones tuviesen el mismo grado de hiperinsuflación pulmonar (272). Esto es probablemente debido a la capacidad adaptativa del músculo estriado ante las nuevas condiciones, que desencadenan cambios estructurales y metabólicos. Los cambios fenotípicos y funcionales del diafragma incluirían un mayor porcentaje de fibras

con metabolismo aeróbico, un incremento de mitocondrias y de capilares, así como un acortamiento de las sarcómeras (273, 274).

Respecto a los músculos espiratorios, su función se halla también deteriorada en los pacientes con EPOC (275). Sin embargo, su disfunción parece responder más a factores de índole sistémico. Existen pocos trabajos que hayan valorado los músculos espiratorios en los pacientes con EPOC, ni respecto de su función ni de su estructura.

### **7.3.3 Músculos periféricos en pacientes con EPOC**

Varios estudios descriptivos han demostrado de forma consistente que la EPOC se asocia a pérdida de fuerza y resistencia musculares, especialmente en las extremidades inferiores (276-278). Esta alteración es más prevalente en estadios avanzados de la enfermedad, llegando a afectar a casi un 40% de los pacientes, pero se encuentra ya presente en hasta un 28% de ellos en estadios precoces (164)(72). Este hecho tiene una importante implicación clínica ya que la disfunción muscular se ha asociado a una disminución en la capacidad de esfuerzo (279, 280), empeoramiento de los síntomas durante el ejercicio (277) y peor calidad de vida (163, 281). Así mismo se ha asociado a una mayor utilización de recursos sanitarios y mayor mortalidad (238). Aunque como se ha dicho, el decondicionamiento es un factor importante en la disfunción muscular (282), algunos autores han remarcado que ésta se asocia a la EPOC incluso en ausencia de sedentarismo, presencia de insuficiencia respiratoria o comorbilidades (276).

La mayoría de estudios estructurales y biológicos de músculos periféricos han sido realizados sobre el *vastus lateralis* del músculo cuádriceps. Estos estudios muestran:

- Fibras de menor tamaño y aumento de la proporción de las de tipo II, que es proporcional a la gravedad de la enfermedad (283-285).
- Atrofia muscular que afecta, según algunos autores, a unos tipos de fibras u otros (284). Algunos de ellos proponen que sobre todo afecta a las de tipo IIa y IIx (283).
- Reducción del número de contactos capilares por fibra muscular (284, 286, 287), aunque se conserva la relación de número de capilares por área muscular. También se ha demostrado una asociación entre el número de contactos capilar-fibra con la gravedad de la enfermedad y la capacidad de ejercicio (287).
- Aumento de células inflamatorias en el músculo (82, 288, 289). Sin embargo, hay mayores discrepancias en la literatura en cuanto a los niveles de citoquinas. Si bien

algunos autores han encontrado mayores niveles de citoquinas inflamatorias en el cuádriceps de los pacientes con EPOC (289), otros han evidenciado todo lo contrario (240, 290).

- Daño muscular, que parece estar presente desde los estadios iniciales de la enfermedad (237).
- Alteraciones en la reparación. Si bien el número de células satélites parece preservado (288, 291), parece que su capacidad regenerativa está alterada, lo que se demuestra por el elevado número de núcleos internos y la disminución de marcadores tardíos de regeneración (292).
- Autofagia, que se correlaciona tanto con la atrofia muscular como con el grado de obstrucción bronquial (88, 255).
- Disbalance entre síntesis y destrucción proteicas. Los pacientes con enfisema pulmonar y bajo peso presentan alteraciones en la síntesis proteica (293), con niveles inferiores de glutamina, glutamato, alanina y otras cadenas de aminoácidos como la leucina (293-295). Por otra parte, la proteólisis está aumentada parece que sobre todo por la vía ubiquitina-proteosoma (93, 296, 297). Sin embargo, el papel de otras vías catabólicas como las proteasas (calpaínas) en la proteólisis de los pacientes con EPOC no está todavía bien definido.
- Aumento de estrés oxidativo y nitrosativo (88, 93, 298, 299) y por otra parte, la reducción de la capacidad enzimática en las vías oxidativas (300), que contribuyen también a la disfunción muscular.
- Alteraciones epigenéticas (301, 302). Diversas modificaciones epigenéticas identificadas hasta el momento, como la metilación de ADN y la acetilación y metilación de histonas, pueden contribuir a la miogénesis, así como a la respuesta frente a la inmovilización o ejercicio en los pacientes con EPOC contribuyendo a la estructura final del músculo.



### ***Diferencias entre sexos en la estructura del cuádriceps en población sana***

Respecto al tamaño fibrilar, las fibras de tipo I parecen ser mayores en mujeres que las de tipo II, mientras que en los hombres sucede a la inversa (303, 304). Por otra parte, si se comparan hombres y mujeres, algunos estudios muestran que el tamaño de las fibras es menor en las segundas (304-306), mientras que otros grupos únicamente encuentran diferencias en el tamaño en las fibras de tipo II (307, 308).

En lo que hace referencia la proporción de tipo de fibras, aunque algún estudio muestra menor porcentaje de fibras de tipo I en mujeres (306), la mayoría de autores no encuentran diferencias en función del sexo (304, 305, 308, 309).

Con respecto a la capilarización, los hombres parecen tener más capilares por fibra que las mujeres, aunque no existen diferencias en el número de capilares por área fibrilar (284, 308).

### ***Diferencias entre sexos en la estructura del cuádriceps en pacientes con EPOC***

Muy pocos son los estudios presentes en la literatura que se han centrado en este aspecto. Probablemente el más relevante es el realizado por Torres y col.(308), en el que concluyen que no existen diferencias en cuanto al porcentaje de tipos de fibras, su tamaño, la capilaridad ni la capacidad oxidativa y glicolítica de enzimas clave en pacientes con EPOC en función del sexo. Esto sugeriría que las diferencias clínicas entre ambos sexos solo se deben a otros factores, como la exposición tabáquica diferencial o la gravedad de la enfermedad. Sin embargo estos datos deben confirmarse.

## **7.4 Pruebas de función muscular**

Este apartado se centrará únicamente en las pruebas de función de los músculos periféricos, objetivo central de esta tesis.

### **Dinamometría de prensión de mano (*handgrip*)**

Es una técnica sencilla llevada a cabo mediante un dinamómetro. La fuerza prensil puede expresarse en valores absolutos y también con respecto a los de referencia para población mediterránea (310). Se ha demostrado que sus valores tienen valor pronóstico en los pacientes con EPOC (311).

### **Contracción isométrica máxima del cuádriceps femoral**

Se realiza en postura sentada, mediante la extensión del cuádriceps con la pierna fijada por el tobillo y conectada a un dinamómetro (107). La fuerza se expresa como valores absolutos o con respecto a los de referencia (312). También es posible expresarla normalizada por la cantidad de masa magra (313), lo que da una idea de la fuerza intrínseca de las fibras.

### **Prueba de resistencia, a un porcentaje de la contracción isométrica máxima del cuádriceps femoral**

Es una prueba que se fundamenta en la demostración de una claudicación tras un ejercicio en ciclos de contracción con carga submáxima (por ejemplo un 10% de la contracción isométrica máxima en la técnica descrita por nuestro grupo) (276).

### **Twitch supramáximo del cuádriceps femoral**

En una maniobra no voluntaria basada en la estimulación eléctrica o magnética del nervio femoral mediante un estímulo único (*twitch*), con medición de la fuerza generada tras la activación del músculo (107).





## II. HIPÓTESIS

Teniendo en cuenta las bases planteadas en la Introducción, se observa que las mujeres con EPOC presentan diferentes características clínicas, funcionales y biológicas respecto de los hombres con la enfermedad. Esto podría ser debido a factores genéticos, hormonales o de estilo de vida.

En esta tesis se plantean las siguientes Hipótesis:

- 1** Existen diferencias entre sexos tanto en la estructura como en la función muscular en pacientes con EPOC.
- 2** Estas diferencias pueden explicar algunas de las desigualdades en las manifestaciones clínicas y funcionales de estos pacientes con EPOC en relación al sexo.



## III. OBJETIVOS

El objetivo principal de la presente tesis fue determinar si existen diferencias fenotípicas en función del sexo en la presentación clínica y el estado funcional de la enfermedad, con especial atención en la función y estructura muscular y mecanismos moleculares subyacentes.

### **Objetivo primario:**

Evaluar a nivel muscular (cuádriceps) los efectos de la EPOC en función del sexo respecto a la fuerza, estructura fibrilar, presencia de inflamación local, daño tisular y regeneración.

### **Objetivos secundarios:**

- 1** Estudiar las relaciones de la inflamación a nivel pulmonar (aire exhalado), sistémico (plasmático) y muscular.
- 2** Evaluar otros aspectos de la EPOC en función del sexo: síntomas y calidad de vida, composición corporal, nivel de actividad física, función pulmonar, capacidad de ejercicio.





## IV. MATERIAL Y MÉTODOS

### 1. Diseño del estudio y aspectos éticos

La presente tesis es un estudio de tipo caso-control. La inclusión de pacientes se realizó entre marzo de 2008 y septiembre de 2010, siendo posible gracias a la colaboración de un equipo multidisciplinario, médico y de otras diversas titulaciones en ciencias de la salud y de la vida, perteneciente al Servicio de Neumología, así como a los laboratorios asociados de Biología Respiratoria y de Fisiopatología Respiratoria del IMIM y el Hospital del Mar.

El protocolo fue diseñado de acuerdo tanto a los estándares éticos de nuestra institución como a la declaración de Helsinki para estudios en humanos (314). Fue aprobado por el Comité Ético para la Investigación en Humanos de nuestra institución y todos los participantes en el estudio firmaron el correspondiente consentimiento informado.

### 2. Población del estudio

El tamaño de la muestra fue calculado a partir de datos de estudios previos sobre disfunción muscular, usando el software GRANMO. A partir de dicho cálculo se incluyeron 21 mujeres y 21 hombres, todos ellos caucásicos, con EPOC estable y características de edad, estado nutricional y gravedad de la enfermedad similares. Fueron reclutados consecutivamente desde la consulta ambulatoria de enfermedades respiratorias de nuestra institución. Además se reclutaron inicialmente 8 mujeres sanas y 8 hombres sanos (controles), de la población general. Todos ellos sin antecedente de adicción tabáquica y con características similares en cuanto a edad y composición corporal a los grupos de pacientes.

Los criterios de exclusión para los pacientes EPOC incluyeron la presencia de otras enfermedades respiratorias, hiperreactividad bronquial, enfermedades cardiovasculares, exacerbaciones de la EPOC en los 3 meses anteriores al estudio, colonización por gérmenes no habituales en la vía aérea, enfermedades osteoarticulares, enfermedades crónicas metabólicas, sospecha de miopatía, antecedentes de cáncer, tratamientos crónicos con fármacos que puedan alterar la estructura y/o función muscular (corticoides sistémicos, antagonistas del calcio, beta-bloqueantes, anabolizantes, insulina, diuréticos, digoxina, hormonas tiroideas, etc.) y tratamiento hormonal sustitutivo.

### **3. Evaluación clínica, nutricional, funcional y de calidad de vida**

#### **3.1 Evaluación clínica**

Se realizó una historia clínica completa y exploración física de todos los sujetos, tanto pacientes como voluntarios sanos, según cuestionario estandarizado.

#### **3.2 Evaluación nutricional**

La valoración nutricional se realizó en todos los sujetos estudiados mediante una evaluación antropométrica que incluía el peso e índice de masa corporal (IMC), así como el estudio de la composición corporal, calculando el índice de masa libre de grasa (FFMI), obtenido mediante impedancia bioeléctrica (BODYSTAT 1500, Bodystat LTD. Isle of Man, UK)(70). También se determinaron parámetros nutricionales analíticos (colesterol, proteínas totales, albúmina, tiempo de protrombina, hemoglobina).

#### **3.3 Función pulmonar convencional**

La función pulmonar incluyó la realización de una espirometría forzada con prueba broncodilatadora (315)(Datospir 92, SIBEL, Barcelona, Spain), la determinación de los volúmenes pulmonares estáticos y resistencia de la vía aérea mediante pletismografía corporal (Body plethysmograph, Masterlab, Jaeger, Würzburg, Alemania) y la medición de la transferencia de monóxido de carbono ( $DL_{CO}$ ) (analizador de gas incluido en Masterlab), así como gasometría arterial (GEM Premier 3000 Instrumentation Laboratory Worldwide Headquarters, Bedford, MA. USA). Se utilizaron valores de referencia para población mediterránea en todas las variables funcionales excepto en los gases sanguíneos (316-318).

#### **3.4 Actividad física**

La actividad física fue calculada usando acelerómetros (SenseWear Pro2 Armband, SWA; Body Media, Pittsburgh, PA, USA) y siguiendo la metodología de estudios publicados por miembros de nuestro grupo (319). Básicamente, el paciente o sujeto sano llevaban el acelerómetro en su brazo derecho durante 7 días consecutivos. Al finalizar se obtenían los resultados con información tanto sobre el número de pasos como de METs (equivalente metabólico).

### **3.5 Función de los músculos periféricos**

#### **a) Dinamometría de prensión de mano (*handgrip*)**

Se examinó la fuerza de prensión de la mano no dominante en todos los sujetos, siempre en posición sentada y con el codo en ángulo de 90°, realizando una presión constante y mantenida sobre el dinamómetro (JAMAR 030J1, Chicago, IL, USA). Se realizaron tres medidas, y se obtuvo como valor absoluto el más alto de tres intentos consecutivos. Se expresa tanto en valores absolutos como en valores de referencia (310), obtenidos en población española.

#### **b) Medición de la contracción isométrica máxima del cuádriceps femoral (QMVC)**

Se realizó en todos los sujetos en ambas piernas con un dinamómetro conectado a un polígrafo digital (BIOPAC dynamometer, BIOPAC Systems, Schooner, CA, USA,). La QMVC estuvo representada por el valor máximo de tensión registrado durante tres maniobras consecutivas y voluntarias de contracción isométrica del cuádriceps, efectuadas con el muslo y la pierna formando un ángulo de 90°, en posición sedente contra la resistencia (238). Se expresan los resultados en valores absolutos y ya normalizados en función de la masa libre de grasa de la pierna no dominante (FFM)(313).

### **3.6 Capacidad de ejercicio**

La capacidad de ejercicio fue evaluada en todos los sujetos estudiados a través de la prueba de marcha de 6 minutos según las normativas (106). Brevemente, en condiciones basales (de reposo) se tomaron los signos vitales, frecuencia cardíaca y saturación de oxígeno, así como el grado de disnea y fatiga de las extremidades (según la escala de Borg modificada). Se registró la frecuencia cardíaca y la saturación de oxígeno de forma continua durante la prueba. Una vez que el sujeto terminó la prueba se registró el grado de disnea y el de cansancio de extremidades inferiores (escala ya mencionada). Finalmente, la distancia caminada se relacionó con los valores de referencia (109).

### **3.7. Calidad de vida**

La calidad de vida relacionada con la salud fue evaluada a través del cuestionario de St. George que es específico para la EPOC (St. George's Respiratory Questionnaire; SGRQ-C) (320), usando como referencia los valores publicados por Ferrer y col. para población española (168).

## 4. Procesado de las muestras de sangre

Las muestras de sangre se obtuvieron a primera hora de la mañana y siempre en ayunas. A los 30 minutos de obtención de la muestra ésta fue dividida y una parte fue centrifugada a 2000–3000 rpm. durante 10 min. El suero obtenido fue separado y almacenado en criotubos a una temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis. Para las citoquinas se utilizó un sistema de cuantificación simultánea mediante multiplex. El proceso se realizó siguiendo las instrucciones recomendadas por el fabricante (Bio-Plex Precision Pro Assays Human Cytokine 10-Plex, ref. 171-A1001P. Bio-Rad Laboratories, Hercules CA, USA). De esta forma se determinaron los niveles de TNF  $-\alpha$ , interferón (IFN)  $-\gamma$ , IL  $-1\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, folistatina, leptina, factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), VEGF, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y molécula de adhesión celular plaquetaria endotelial (PECAM). Todos los análisis se realizaron al menos por duplicado.

Además en el laboratorio clínico de nuestro hospital se realizó el hemograma completo, análisis bioquímico estándar (perfil hepático, función renal, electrolitos), cuantificación de la proteína C-reactiva de alta sensibilidad (hsCRP), 25(OH) Vit D, hormona paratiroidea (PTH), calcio (Ca), fósforo (P) y magnesio (Mg), y niveles de estriol y progesterona (en las mujeres) siguiendo los procedimientos habituales.

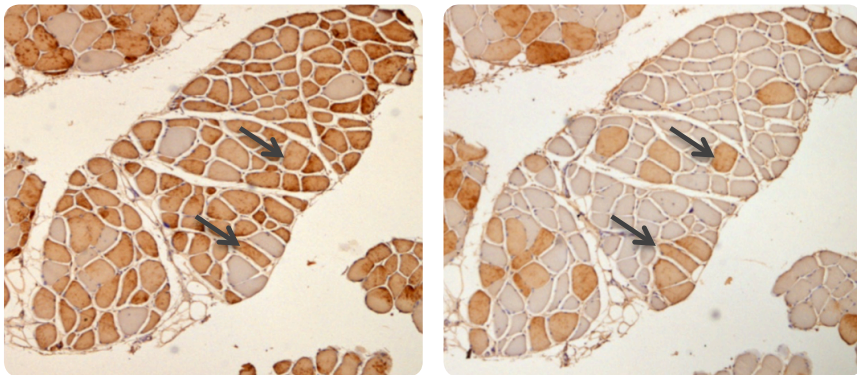
## 5. Procesado de las muestras musculares

La biopsia del músculo cuádriceps, concretamente de la porción denominada *vastus lateralis* se realizó en el tercio medio del músculo, cara antero-lateral, siguiendo los procedimientos publicados ya por nuestro grupo (321). Las muestras se procesaron de la siguiente forma: un fragmento muscular (de aproximadamente  $3\text{ mm}^3$ ) se fijaba en formaldehído tamponado al 4% y se trasladaba a temperatura ambiente para ser posteriormente incluido en parafina. Con este fragmento se realizaron los estudios de microscopía óptica convencional (cuantificación de daño muscular e inmunohistoquímica para tipificación de fibras). Otros dos fragmentos fueron congelados y almacenados a una temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta la realización de los análisis de biología molecular. Todos los procesamientos realizados en el laboratorio se hicieron de manera ciega por parte de un técnico y de la autora de esta tesis.

### 5.1 Fenotipo fibrilar

La tipificación de las fibras se realizó utilizando una técnica de marcaje inmunohistoquímico en las muestras de tejido muscular incluido en parafina de  $3\text{-}\mu\text{m}$  de grosor (microtomo).

Dos cortes consecutivos de tejido se colocaron en sendos portaobjeto, uno se incubó con un anticuerpo monoclonal frente a la isoforma de MyHC I (clone MHC, Biogenesis Inc., Poole, England, UK) y el otro con anticuerpo monoclonal frente a la isoforma de MyHC II (clone MY-32, Sigma, Saint Louis, MO). Utilizando un microscopio óptico (Olympus, Series BX50F3, Olympus Optical Co., Hamburg, Germany) acoplado a una cámara de digitalización de imágenes (Pixera Studio, version 1.0.4, Pixera Corporation, Los Gatos, CA, USA) y a un programa de morfometría digital (NIH Image, versión 1.60, Scion Corporation, Frederick, MD, USA). Las imágenes digitalizadas permitieron determinar los valores de los porcentajes de cada tipo fibrilar y el tamaño de las fibras. Se contabilizaron y midieron un mínimo de 100 fibras por cada muestra de tejido muscular. En primer lugar se contabilizó el porcentaje de cada tipo fibrilar básico (fibras de tipo I y de tipo II). Posteriormente se analizó para cada tipo fibrilar, la medida de su diámetro mínimo para determinar el tamaño de la sección (CSA: *cross sectional area*). Cabe mencionar que el diámetro mínimo es el que menos se afecta por el ángulo de orientación de la fibra y permite por tanto la mejor aproximación a su área de sección transversal.

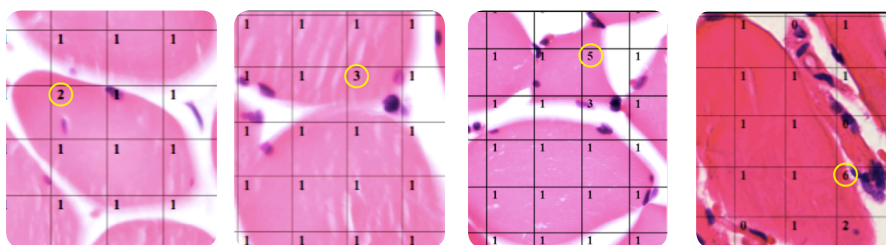


**Figura 1.** Tipos de fibras. Marcaje inmunohistoquímico en muestras de músculo incubadas con anticuerpos monoclonales frente a las isoformas de MyHC I y MyHCII. Se observa también la presencia de algunas fibras mixtas, con expresión simultánea de MyHC I y MyHCII (flechas). Imagen propia.

## 5.2 Fracción de músculo anormal (daño y regeneración)

Las fracciones de músculo normal y anormal (considerado como un indicador histológico del proceso de daño-regeneración) fueron evaluadas siguiendo la metodología anteriormente publicada (235). Básicamente, y sobre muestras previamente teñidas con hematoxilina-eosina y ampliadas a  $\times 400$ , se superponía una cuadrícula rectangular de 63 cuadrados ( $7 \times 9$ ) utilizando el *software* Imaging Cell-B (Olympus Corporation) y, mediante el microscopio óptico (Olympus BX 61, Olympus Corporation) y una cámara digital (Olympus DP 71, Olympus Corporation), se realizaba el conteo de los hallazgos.

Existen 8 diferentes categorías para éstos: 1) músculo normal, 2) núcleos internos, 3) células inflamatorias, 4) depósitos de lipofucsina, 5) célula anormal, 6) célula inflamada o necrótica, 7) vasos sanguíneos y 0) ausencia de tejido. La fracción de cada categoría se definió como el porcentaje de puntos de dicha categoría dividida por el sumatorio de las otras, exceptuando las categorías 7 y 0. La porción de músculo normal equivale a la fracción de la categoría 1, mientras que la fracción anormal se calculó como el sumatorio de las categorías 2,3,4,5 y 6 (Figura 2). En el análisis también se agruparon las categorías 5 y 6 que se consideran las más expresivas de lesión muscular, mientras que la 2 es más representativa de regeneración.



**Figura 2. Estructura muscular anormal.** Ejemplos de muestras teñidas con hematoxilina-eosina (x 400) del *vastus lateralis* en los sujetos del estudio. Se muestra la metodología seguida pudiéndose observar diferentes categorías. 1) músculo normal, 2) núcleos internos, 3) células inflamatorias, 5) células anormales, 6) células inflamadas o necróticas. Imagen propia.

### 5.3 Niveles de transripsomas

Se utilizó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa *en tiempo real* por sus características de precisión cuantitativa. Se evaluaron los siguientes genes mediante la determinación de sus transcriptomas (ARN mensajero) en el músculo:

**Genes ligados a la miogénesis:** Pax7, MyF5, Mio-D, Miogenina, M-caderina

**Marcadores de lesion o estrés celular:** miosinas del desarrollo (MyHC-emb y MyHC-peri), caveolina (CAV)3

**Proteínas de adhesión:** molécula de adhesión celular neural (NCAM) e integrina (ITG)  $\beta$

**Citoquinas:** TNF- $\alpha$  y sus dos receptores (TNFR1 y TNFR2), IL-1 $\beta$  y su receptor, IL-6 y su receptor (IL-6R)

**Factores de crecimiento:** IGF -1 y su receptor

Brevemente, el ARN fue extraído mediante el método del *TRizol* (Life Technologies, Foster City, CA, USA) para a continuación sintetizar el ADN complementario siguiendo el protocolo del fabricante (usando oligo (dT) como cebador y SuperScript III como transcriptasa inversa)(Life technologies). Tras la transcripción inversa se efectuaron las reacciones de PCR mediante el sistema de detección de secuencias ABI Prism 7900HT y el análisis TaqMan (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Las muestras se procesaron siempre por triplicado. Como gen control endógeno se utilizó gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) por ser el más estable en todas las muestras. Se utilizó una muestra para normalizar los resultados. Los datos se analizaron con el programa *Sequence Detection System* (version2.2.2, Applied Biosystems) basado en el método  $\Delta\Delta Ct$  (322).

#### **5.4 Niveles de citoquinas en el músculo**

Los niveles proteicos de TNF- $\alpha$  y sus receptores I y II (TNF- $\alpha$  RI y TNF- $\alpha$  RII, respectivamente), IFN- $\gamma$ , factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ 1), IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-12 y VEGF fueron cuantificados usando kits específicos de ELISA (RayBiotech, Norcross, GA, USA) siguiendo la metodología previamente publicadas (235, 323). Brevemente, las muestras de músculo, después de ser descongeladas y a temperatura ambiente, fueron homogeneizadas y se calculó la concentración de proteínas de una de ellas. En cada pocillo se colocó la misma cantidad de proteínas de músculo homogeneizado (15 mg in 200mL), realizándose siempre por triplicado. Todas las muestras fueron incubadas juntas con el anticuerpo primario. Los controles fueron realizados según las instrucciones del fabricante y se realizó una curva patrón en cada ensayo. El protocolo se realizó también siguiendo estrictamente las normas del fabricante para cada citoquina. Posteriormente se calculó la absorbancia de cada muestra utilizando un espectofotómetro (Microplate Reader Model 680 Bio-Rad *laboratories*, Reino Unido). Las absorbancias fueron determinadas a 450 nm.

## **6. Condensado exhalado**

### **6.1 Obtención de la muestra**

El condensado exhalado se obtuvo mediante equipos EcoScreen II (Jäeger, Würzburg, Alemania), con control del patrón respiratorio mediante sistema EcoVent (Jäeger). El sistema EcoScreen II incorpora una doble cámara de enfriamiento por donde trascurre el aire exhalado. Esto permite la separación del condensado exhalado proveniente de las vías aéreas superiores del de las vías inferiores. Los sujetos respiraron de forma tranquila a través del equipo condensador hasta alcanzar un volumen exhalado

acumulado mínimo de 150 L, empleando en todo momento pinzas nasales. Antes de comenzar con el procedimiento, los pacientes y sujetos sanos bebieron agua y expulsaron esputos y mucosidades nasales para minimizar la posible contaminación. El condensado exhalado obtenido se almacenó a  $-80^{\circ}\text{C}$  en 2 alícuotas.

## 6.2 Análisis de biomarcadores

Se cuantificó la expresión de las citoquinas TNF  $\alpha$ , TNF  $\beta$ , IFN  $\gamma$ , IL-1b, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 y VEGF en condensado exhalado usando kits específicos de ELISA (RayBiotech, Norcross, GA, USA) según las metodologías publicadas (235, 240, 324). Todas las muestras se analizaron conjuntamente y en duplicado. Antes de comenzar el análisis, las muestras fueron descongeladas a temperatura ambiente. Posteriormente se realizó una curva patrón para cada citoquina y se utilizó 200  $\mu\text{L}$  de cada muestra para su análisis. Se siguió el protocolo según las instrucciones del fabricante para cada citoquina. La absorbancias fueron determinadas a 450 nm.

## 7. Análisis estadístico

La normalidad en la distribución de cada variable se valoró mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Los datos se expresan como media  $\pm$  desviación estándar. Las comparaciones de las variables fisiológicas y biológicas entre los grupos sanos o pacientes con EPOC (mismo sexo) y entre los dos grupos de EPOC se realizó usando la prueba Student's test. Las correlaciones entre variables fisiológicas y biológicas fueron exploradas usando el coeficiente de correlación Pearson's. El análisis de los datos se llevó a cabo mediante el software SPSS Statistics® (Version 20.0. Armonk, NY: IBM Corp) y GraphPadPrism® (Version 6.0, GraphPad Software, San Diego, California, USA). En todos los casos la significancia estadística fue definida por el error alfa ( $p$ )  $<0,05$ .







## V. RESULTADOS

### 1. Descripción de la población estudiada

#### 1.1 Consideraciones generales

Se han estudiado finalmente un total de 40 pacientes con EPOC, 21 mujeres y 19 hombres, todos ellos caucásicos. Inicialmente se reclutaron 21 hombres pero lamentablemente 2 de los varones se negaron a completar el estudio. Además se estudiaron 16 sujetos sanos, 8 mujeres y 8 hombres, pero uno de estos últimos no finalizó el estudio por lo que finalmente fueron sólo 7 varones.

#### 1.2 Características clínicas, nutricionales y funcionales

Se han analizado las variables antropométricas, nutricionales y funcionales según la presencia de enfermedad y el sexo como se muestra en la Tabla 1.

Los cuatro grupos fueron similares en cuanto a variables antropométricas, no existieron diferencias en edad, IMC y FFMI, aunque los pacientes con EPOC (mujeres y hombres) mostraban una tendencia a presentar un menor FFMI ( $p=0,10$  y  $p=0,06$  respectivamente) que sus respectivos controles. Por otra parte, el índice de bajo peso fue similar en ambos grupos de pacientes (19% en mujeres frente a 21% en hombres). Tampoco se observaron diferencias en los parámetros nutricionales analíticos estudiados, (albúmina, proteínas, colesterol, tiempo de protrombina y hemoglobina), entre los cuatro grupos estudiados (resultados no mostrados). Por otra parte, todas las mujeres presentaron un perfil hormonal postmenopáusico con un nivel de estríol total inferior a 2 ng/ml en todas ellas.

Un 33% de las mujeres con EPOC y un 26% de los hombres eran fumadores activos, aunque ninguno de ellos tenía exposición a tóxicos o a humo de madera o carbón. Las variables de función respiratoria convencional fueron obviamente diferentes entre pacientes y sujetos sanos, y no se observaron diferencias entre mujeres y hombres con EPOC. La distribución por grupos de gravedad, tanto según la clasificación GOLD como BODE fue homogénea en hombres y mujeres con EPOC, a pesar de que los hombres tenían mayor consumo acumulado de tabaco que las mujeres.

Se observó una correlación directa entre el IMC y la DLCO tanto en mujeres como en hombres con DLCO reducida (Fig. 1).

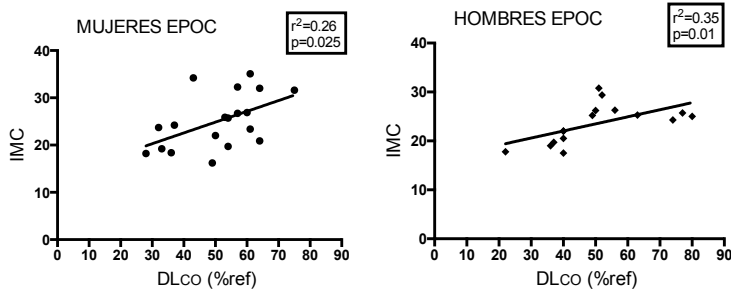
**Tabla 1.** Características antropométricas y funcionales de los pacientes con EPOC y sujetos sanos

	Mujeres sanas	Hombres sanos	Mujeres EPOC	Hombres EPOC
Sujetos, n	8	7	21	19
Edad, años	62 ± 8	64 ± 5	63 ± 8	64 ± 9
IMC, kg/m <sup>2</sup>	25,9 ± 2,4	26,2 ± 1,7	24,8 ± 5,5	24,1 ± 4,3
FFMI, kg/m <sup>2</sup>	18 ± 1,4	19,5 ± 2,2	16,4 ± 2,2 <sup>(Cp=0,10)</sup>	17,5 ± 2,1 <sup>(Cp=0,06)</sup>
<b>Historia tabáquica</b>				
Fumadores activos, n (%)	0	0	7 (33)	5 (26)
Paquetes-año	0	0	39 ± 15	54 ± 16 <sup>**</sup>
<b>Gravedad de la EPOC n (%)</b>				
Moderada			5 (24)	6 (31)
Grave			5 (24)	5 (26)
Muy grave			11 (52)	8 (42%)
<b>Función pulmonar</b>				
FEV <sub>1</sub> , %ref,	102 ± 14	98 ± 7	39 ± 15 <sup>**</sup>	40 ± 14 <sup>**</sup>
FEV <sub>1</sub> /FVC, %	79 ± 5	79 ± 8	47 ± 13 <sup>**</sup>	45 ± 9 <sup>**</sup>
RV, % ref,	107 ± 22	108 ± 13	207 ± 59 <sup>**</sup>	196 ± 56 <sup>**</sup>
TLC, % ref,	104 ± 7	97 ± 6	121 ± 23	121 ± 20
RV/TLC, %	40 ± 5	39 ± 7	69 ± 11 <sup>**</sup>	65 ± 9 <sup>**</sup>
DLCO, % ref,	104 ± 14	104 ± 7	55 ± 19 <sup>***</sup>	56 ± 21 <sup>**</sup>
KCO, % ref,	90 ± 13	100 ± 10	68 ± 21 <sup>**</sup>	63 ± 19 <sup>**</sup>
PaO <sub>2</sub> , mm Hg	-	-	70 ± 8	71 ± 12
PaCO <sub>2</sub> , mm Hg	-	-	42,8 ± 2,8	40,7 ± 3,6
SpO <sub>2</sub> en reposo, %	98 ± 1	98 ± 1	93 ± 3 <sup>**</sup>	94 ± 3 <sup>*</sup>

Datos presentados como media ± SD,

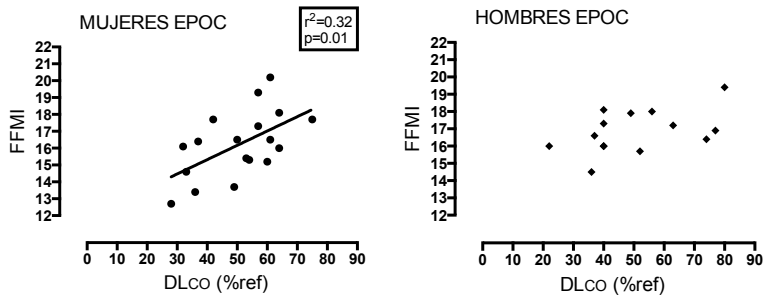
Abreviaturas: IMC, índice de masa corporal; FFMI, índice de masa libre de grasa; FEV<sub>1</sub>, volumen espirado en el primer segundo; % ref., % referencia; FVC, capacidad vital forzada; RV, volumen residual; TLC, capacidad pulmonar total; DLCO, capacidad de transferencia de monóxido de carbono; KCO, (Krogh) coeficiente de transferencia de monóxido de carbono; PaO<sub>2</sub>, presión parcial de oxígeno en sangre arterial; PaCO<sub>2</sub>, presión parcial de dióxido de carbono en sangre arterial; SpO<sub>2</sub>, saturación de oxígeno (oximetría),

Significancias: \*, p ≤ 0,05, \*\*, p ≤ 0,01 y \*\*\*, p ≤ 0,001 diferencias entre sanas y mujeres con EPOC o entre sanos y hombres con EPOC. \*\*, p ≤ 0,01 diferencias entre hombres y mujeres.



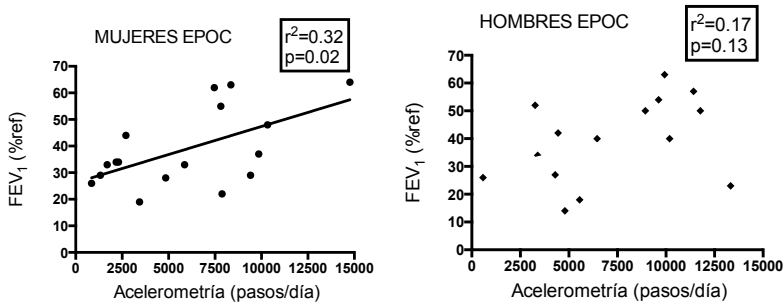
**Fig. 1.** Relación entre IMC y DLco en mujeres y hombres con EPOC

Sin embargo, únicamente en el grupo de las mujeres con DLco reducida existe correlación directa entre el FFMI y la capacidad de transferencia del monóxido de carbono (% ref.) (Fig. 2).



**Fig. 2.** Relación entre FFMI y DLco en mujeres y hombres con EPOC.

Los valores de la actividad física se muestran en la Tabla 2, los pacientes de ambos sexos caminaron menos que sus controles pero no se observaron diferencias entre ellos. Sin embargo, en el grupo de mujeres con EPOC existía una correlación entre el grado de obstrucción bronquial y la actividad física medida (Fig. 3), asociación que no se observaba en el grupo de hombres.



**Fig. 3.** Relación entre el FEV<sub>1</sub> y la actividad física (media de pasos realizados al día medido mediante acelerómetro) en mujeres y hombres con EPOC.

**Tabla 2.** Valoración de la capacidad de esfuerzo, actividad física y fuerza muscular,

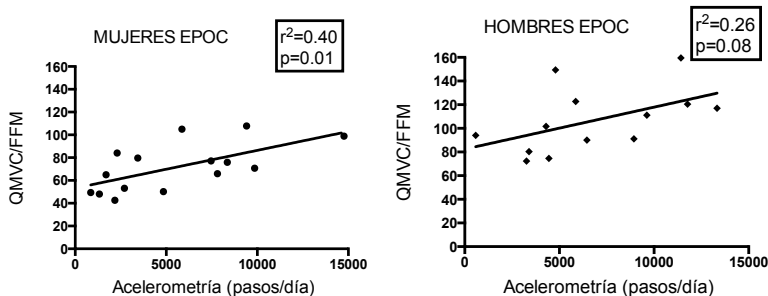
	Mujeres sanas	Hombres sanos	Mujeres EPOC	Hombres EPOC
<b>Actividad física (Acelerometría)</b>				
Pasos/día	12441 ± 4525	13490 ± 4217	5946 ± 3955 **	7327 ± 4158*
METs	1,9 ± 0,4	2,0 ± 0,3	1,5 ± 0,3 **	1,4 ± 0,3 **
<b>Fuerza muscular (Dinamometría)</b>				
HG, Kg	26 ± 9	34 ± 6	21 ± 4	32 ± 5***
HG, % ref.	115 ± 34	120 ± 22	104 ± 22	100 ± 26
QMVC, Kg	45 ± 17	54 ± 12	29 ± 8**	43 ± 11 <sup>(p=0,09)</sup> **
QMVC/FFM (%)	119 ± 50	134 ± 26	68 ± 22*	99 ± 35* **
<b>Capacidad de esfuerzo (Prueba de marcha)</b>				
Δ SpO <sub>2</sub>	- 0,14 ± 1,6	0,2 ± 1,1	-5,1 ± 3,9 **	-6,9 ± 3,8 **
Distancia, m	551 ± 67	566 ± 102	363 ± 107 ***	429 ± 103 ** *
Distancia, %ref.	109 ± 19	106 ± 8	73 ± 20 ***	86 ± 19 **

Datos presentados como media ± DE,

Abreviaturas: MET, equivalente metabólico; HG, *handgrip*; QMVC, contracción voluntaria máxima isométrica del cuádriceps; FFM, masa libre de grasa, SpO<sub>2</sub>, saturación de oxígeno (oximetría), D SpO<sub>2</sub>, porcentaje de cambio de la SpO<sub>2</sub>

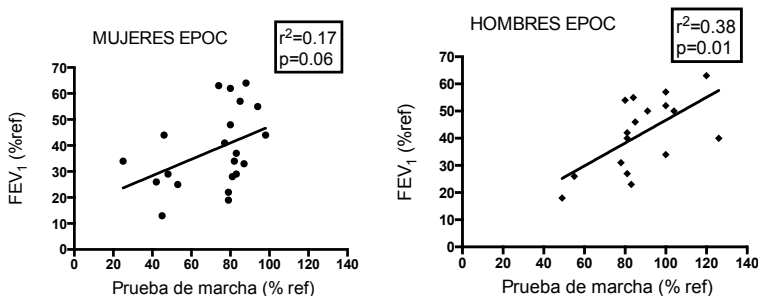
Significancias: \*, p ≤ 0,05, \*\*, p ≤ 0,01 y \*\*\*, p ≤ 0,001 diferencias entre mujeres sanas y mujeres con EPOC o entre hombres sanos y hombres con EPOC \*, p ≤ 0,05 \*\*, p ≤ 0,01 y \*\*\*, p ≤ 0,001 diferencias entre hombres y mujeres.

Respecto de la fuerza muscular (Tabla 2), no se encontraron diferencias en cuanto a la fuerza de presión de la mano entre los cuatro grupos estudiados. Sin embargo, la fuerza del cuádriceps tanto absoluta como normalizada por la masa libre de grasa fue significativamente más baja en ambos grupos con EPOC en comparación con los sanos, y además las mujeres mostraban menos fuerza normalizada que los varones. De hecho, los hombres con EPOC mostraban una diferencia de sólo un 27% de los sanos, en contraste con el grupo de las mujeres con la enfermedad que exhibían una caída mucho más marcada, un 43% respecto al grupo de sanas. Por otra parte, se observó una correlación directa entre la fuerza del cuádriceps normalizada por FFMI y la actividad física (acelerómetro) en el grupo de mujeres con EPOC. Esta correlación quedó ligeramente por debajo de la significación en los hombres (Fig. 4).



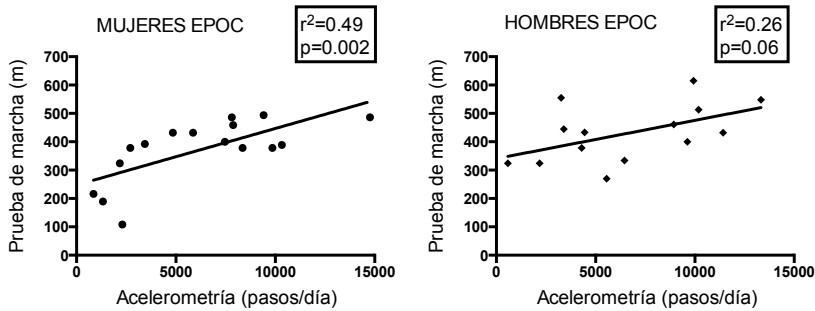
**Fig. 4.** Relación entre la fuerza del cuádriceps normalizada y la actividad física (media de pasos realizados al día medido mediante acelerómetro) en mujeres y hombres con EPOC.

La capacidad de esfuerzo, medida por la distancia recorrida en la prueba de marcha de 6 minutos se encontraba más deteriorada en el grupo de mujeres con EPOC (pérdida de un 34,1% frente a un 24,2% de los hombres,  $p<0,01$ ), como se muestra en la Tabla 2. Se observó una correlación directa entre el grado de obstrucción y la distancia caminada en el grupo de hombres con EPOC, dicha asociación se quedó al límite de la significación en el grupo de mujeres con la enfermedad (Fig. 5).



**Fig. 5.** Relación entre FEV<sub>1</sub> y la distancia caminada (% ref.) en la prueba de marcha en mujeres y hombres con EPOC.

Sin embargo, se observó una mejor correlación entre actividad física (pasos/día) y la capacidad de esfuerzo (distancia caminada) en el grupo de mujeres con EPOC que en el de hombres con la enfermedad (Fig. 6).



**Fig. 6.** Relación entre la capacidad de esfuerzo (metros caminados en la prueba de marcha) y la actividad física (media de pasos realizados al día medido mediante acelerómetro) en mujeres y hombres con EPOC.

En cuanto a la semiología, no se observaron diferencias respecto al grado de desaturación de oxígeno, nivel de disnea o de fatiga en extremidades inferiores al finalizar la prueba entre los dos grupos de pacientes con EPOC.

La calidad de vida (Tabla 3) evaluada mediante el cuestionario de Saint George, específico para EPOC, estaba moderadamente deteriorada en ambos grupos de pacientes, y sin diferencias entre ellos. Sin embargo el cuestionario objetivó una tendencia respecto a una mayor percepción de disnea en las mujeres. De cualquier forma, este hallazgo no fue confirmado con la escala de Borg empleada al inicio de la prueba de marcha.

En el grupo de mujeres con EPOC, se observó una correlación inversa entre la puntuación en la prueba de Saint George y la capacidad de esfuerzo (distancia caminada) ( $p=0,006$ ) y la saturación de oxihemoglobina en reposo ( $p=0,03$ ). Estas asociaciones no se observaron en el grupo de hombres con EPOC. Sin embargo, en este último grupo sí existía una correlación entre calidad de vida y actividad física, que no se observaba en las mujeres con EPOC (Fig. 7).



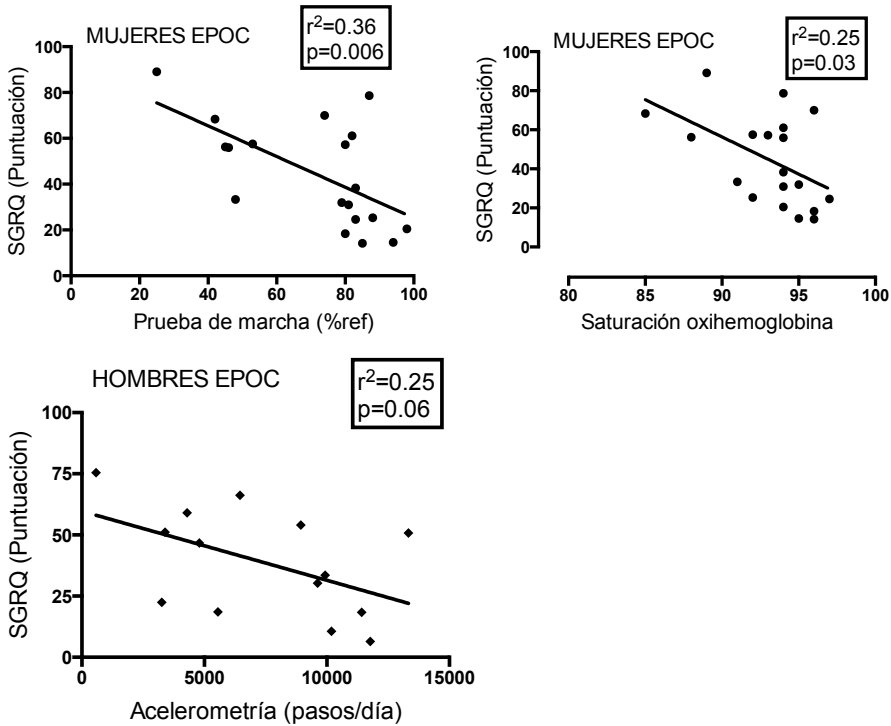
**Tabla 3.** Síntomas de pacientes con EPOC y sujetos sanos obtenidos en cuestionario de calidad de vida de Saint George y la prueba de marcha.

	Mujeres sanas	Hombres sanos	Mujeres EPOC	Hombres EPOC
<b>SGRQ (puntuación)</b>				
Total	-	-	46 ± 24	47 ± 18
Tos	-	-	51,5 ± 27,9	43,5 ± 27,1
Espujo	-	-	36,6 ± 27,0	42,2 ± 24,2
Disnea	-	-	48,0 ± 28,8	34,2 ± 23,1 <sup>(*p=0,06)</sup>
Sibilancias	-	-	38,4 ± 35,7	35,0 ± 32,2
<b>Síntomas en la prueba de marcha (escala modificada Borg)</b>				
Disnea en reposo	0 ± 0	0 ± 0	1,45 ± 2,02 **	1,41 ± 1,91 *
Disnea máximo ejercicio	0,67 ± 1,21	0,52 ± 1,38	5,05 ± 2,57 ***	4,24 ± 2,44 ***
Molestia en piernas en reposo	0 ± 0	0 ± 0	0,56 ± 1,46	0,31 ± 1,25
Molestia en piernas en máximo ejercicio	0,33 ± 0,52	0,13 ± 0,12	2,33 ± 2,43 **	2,13 ± 2,55*

Datos presentados como media ± DE,

Abreviaturas: SGRQ, Cuestionario respiratorio de Saint George; 6MWT,

Significancias: \*, p≤0,05, \*\*, p≤0,01 y \*\*\*, p≤0,001 diferencias entre sanas y mujeres con EPOC o entre sanos y hombres con EPOC; †, p≤ 0,05 diferencias entre hombres y mujeres.



**Fig. 7.** Relación entre la calidad de vida y la capacidad de esfuerzo (distancia caminada en prueba de marcha) y la saturación de oxihemoglobina al finalizar la prueba de marcha en mujeres con EPOC y relación entre calidad de vida y actividad física en hombres con EPOC.

## 2. Inflamación

### 2.1 Inflamación sistémica

El análisis de las muestras de suero reveló un mayor nivel de diversos marcadores de inflamación, como la PCR de alta sensibilidad, TNF- $\alpha$ , IFN-g, IL-2, IL-5, IL-6, IL-12 e IL-13, como en el caso de la interleuquina anti-inflamatoria IL-10 en los dos grupos de pacientes con EPOC comparados con sus respectivos controles (Tabla 4). No se evidenciaron diferencias relacionadas con el sexo de los pacientes en el nivel de citoquinas. Sin embargo, en el grupo de mujeres con EPOC se observó una correlación entre el nivel de IL-6 y el grado de obstrucción ( $p=0,02$ ), que no existía en los varones (Fig. 8).

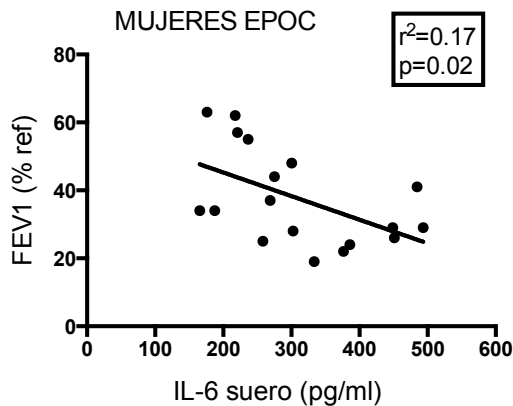
**Tabla 4.** Expresión de diferentes citoquinas y marcadores de actividad inflamatoria en el suero de pacientes con EPOC y de sujetos sanos

	Mujeres sanas	Hombres sanos	Mujeres EPOC	Hombres EPOC
PCR (mg/dl)	0,47 ± 0,70	0,20 ± 0,51	0,83 ± 1,16	0,62 ± 1,08
HsPCR (mg/dL)	0,16 ± 0,11	0,19 ± 0,12	0,68 ± 0,60**	0,54 ± 0,41*
Fibrinogen (mg/dl)	356 ± 39	341 ± 26	403 ± 91	434 ± 107*
Ceruloplasmin (mg/dl)	26,0 ± 5,1	22,0 ± 4,2	25,5 ± 5,7	28,0 ± 12,6
TNF- $\alpha$ (pg/ml)	17,0 ± 4,1	13,8 ± 5,1	24,8 ± 9,7 **	23,8 ± 9,6 **
IFN- $\gamma$ (pg/ml)	153 ± 38	129 ± 30	207 ± 64 **	193 ± 48 ***
VEGF (pg/ml)	92 ± 51	90 ± 58	89 ± 60	92 ± 62
PDGF (pg/ml)	94 ± 64	97 ± 71	133 ± 162	133 ± 143
G-CSF (pg/ml)	327 ± 136	317 ± 172	298 ± 195	320 ± 249
PECAM (ng/ml)	49 ± 18	51 ± 17	49 ± 29	48 ± 32
IL-1b (pg/ml)	18,6 ± 5,3	15,9 ± 3,8	24,0 ± 7,7 *	23,0 ± 6,4 **
IL-2 (pg/ml)	112 ± 22	110 ± 24	142 ± 49 *	140 ± 38 *
IL-4 (pg/ml)	37,2 ± 9,1	36,3 ± 10,5	45,0 ± 12,6 *	42,9 ± 7,8
IL-5 (pg/ml)	301 ± 62	283 ± 66	395 ± 104 **	368 ± 67 **
IL-6 (pg/ml)	209 ± 76	182 ± 39	310±107**	269±81 **
IL-8 (pg/ml)	67 ± 42	71 ± 38	74 ± 65	78 ± 68
IL-10 (pg/ml)	214 ± 57	191 ± 32	287 ± 88 *	266 ± 59 ***
IL-12 (pg/ml)	62 ± 16	61 ± 15	81 ± 29 *	75 ± 19 *
IL-13 (pg/ml)	80 ± 16	72 ± 14	106 ± 33 *	100 ± 20 ***

Datos presentados como media  $\pm$  DE,

Abreviaturas: PCR, proteína C reactiva; hsPCR: proteína C reactiva alta sensibilidad; TNF- $\alpha$ , factor de necrosis tumoral; IFN- $\gamma$ , interferón- $\gamma$ ; IL, interleuquina; G-CSF, factor estimulador de colonias de granulocitos; HGF, factor de crecimiento de hepatocito; VEGF, factor de crecimiento de endotelio vascular; PDGF, factor de crecimiento derivado de plaquetas; PECAM, molécula de adhesión endotelial plaquetario, pg, picogramo; ng, nanogramo,

Significancias: \*,  $p \leq 0,05$ , \*\*,  $p \leq 0,01$  y \*\*\*,  $p \leq 0,001$  diferencias entre sanas y mujeres con EPOC o entre sanos y hombres con EPOC.



**Fig. 8.** Relación entre el FEV<sub>1</sub> y los niveles de IL-6 en suero en mujeres con EPOC.

## 2.2. Inflamación pulmonar

Se obtuvo un condensado exhalado que tuviera condiciones óptimas para la medición de moléculas en suspensión únicamente en 7 mujeres sanas, 14 mujeres con EPOC y 16 hombres con EPOC. Lamentablemente sólo se obtuvieron 3 muestras de controles sanos por lo que este grupo se ha excluido en el análisis.

Tal y como se muestra en la Tabla 5, las pacientes con EPOC mostraron niveles más altos de ciertas citoquinas inflamatorias respecto a sus controles sanas, como TNF- $\alpha$ , IL-4, e IL-10. La IL-8 mostró una tendencia a ser más elevada en mujeres con EPOC que en sanas y fue significativamente más elevada en mujeres con EPOC que en hombres con EPOC.

## 3. Vitamina D y metabolismo osteocálcico

Los niveles de calcio, fosfato y PTH fueron similares entre los dos grupos de pacientes con EPOC y sus respectivos controles. Por el contrario, el nivel de 25(OH) Vit D mostró una tendencia a ser menor en ambos grupos con EPOC, aunque esta diferencia fue sólo significativa para las mujeres (Tabla 6). Se observó además un descenso importante de 25(OH) Vit D ya en el grupo de mujeres con EPOC en estadios iniciales a diferencia del grupo de hombres con la enfermedad en los cuales únicamente se observó este descenso en estadios avanzados (Fig. 9).

**Tabla 5.** Niveles de citoquinas en el condensado exhalado

	Mujeres Sanas (n=7)	Mujeres EPOC (n=14)	Hombres EPOC (n=16)
TNF- $\alpha$ (pg/ml)	156 $\pm$ 8	175 $\pm$ 13*	172 $\pm$ 15
TNF- $\beta$ (pg/ml)	108 $\pm$ 16	117 $\pm$ 8	119 $\pm$ 12
IFN-g (pg/ml)	618 $\pm$ 93	681 $\pm$ 164	712 $\pm$ 177
IL-1b (pg/ml)	26 $\pm$ 18)	29 $\pm$ 13	36 $\pm$ 10
IL-2 (pg/ml)	488 $\pm$ 44	493 $\pm$ 77	475 $\pm$ 57
IL-4 (pg/ml)	189 $\pm$ 10	206 $\pm$ 16*	205 $\pm$ 26
IL-5 (pg/ml)	115 $\pm$ 21	113 $\pm$ 28	122 $\pm$ 26
IL-6 (pg/ml)	23 $\pm$ 12	30 $\pm$ 3	31 $\pm$ 4
IL-8 (pg/ml)	79 $\pm$ 5	86 $\pm$ 8*	79 $\pm$ 5*
IL-10 (pg/ml)	101 $\pm$ 15	128 $\pm$ 19*	114 $\pm$ 18 <sup>(*p=.07)</sup>
IL-12 (pg/ml)	79 $\pm$ 24	65 $\pm$ 31	57 $\pm$ 26
VEGF (pg/ml)	447 $\pm$ 45	440 $\pm$ 79	431 $\pm$ 76

Datos presentados como media  $\pm$  DE,

Abreviaturas: TNF- $\alpha$ , factor de necrosis tumoral; IFN- $\gamma$ , interferón- $\gamma$ ; IL, interleuquina; VEGF, factor de crecimiento de endotelio vascular; pg, picogramo.

Significancias: \*,  $p \leq 0,05$ , diferencias entre sanas y mujeres con EPOC o entre sanos y hombres con EPOC. †,  $p \leq 0,05$  diferencias entre hombres y mujeres.

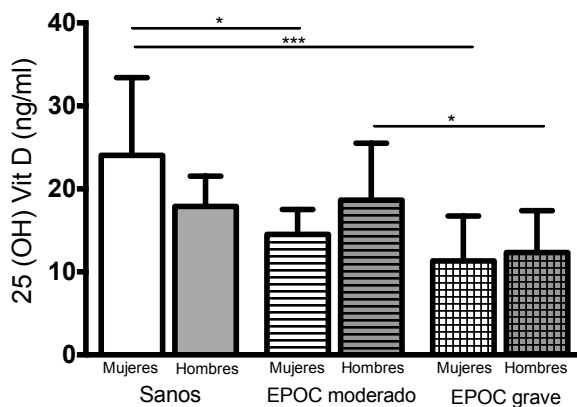
**Tabla 6.** Parámetros de metabolismo osteocálcico

	Mujeres sanas	Hombres sanos	Mujeres EPOC	Hombres EPOC
Calcio ajustado (mg/dL)	8,8 ± 0,5	8,9 ± 0,5	9,1 ± 0,4	8,6 ± 2,1
Fosfato (mg/dL)	3,1 ± 0,3	3,2 ± 0,4	3,3 ± 0,4	2,8 ± 0,4 <sup>+</sup>
Magnesio (mg/dL)	1,9 ± 0,1	1,9 ± 0,2	1,8 ± 0,2	1,9 ± 0,1
25(=H) Vit D (ng/dL)	24,1 ± 9,3	17,9 ± 3,6	12,1 ± 5,0 *	14,3 ± 6,2
Δ (%)	-	-	50 ± 15	28 ± 12 <sup>+</sup>
PTH (pg/dL)	42 ± 18	48 ± 14	44 ± 23	47 ± 19

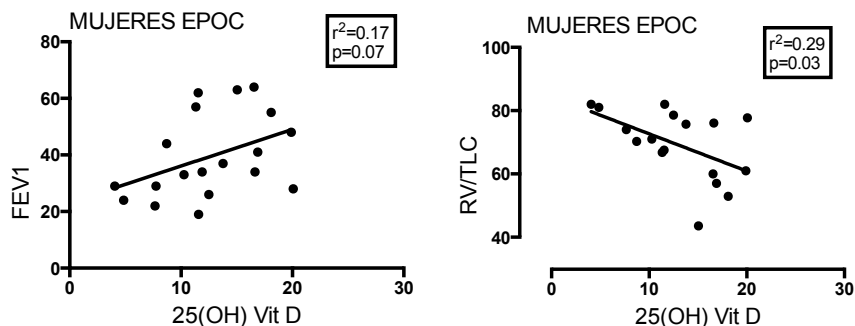
Datos presentados como media ± DE,

Abreviaturas: 25(OH) Vit D: 25-hidroxivitamina D; PTH: hormona paratiroidea.

Significancias: \*, p≤0,05, diferencias entre sanas y mujeres con EPOC o entre sanos y hombres con EPOC <sup>+</sup>, p≤ 0,05 diferencias entre hombres y mujeres.

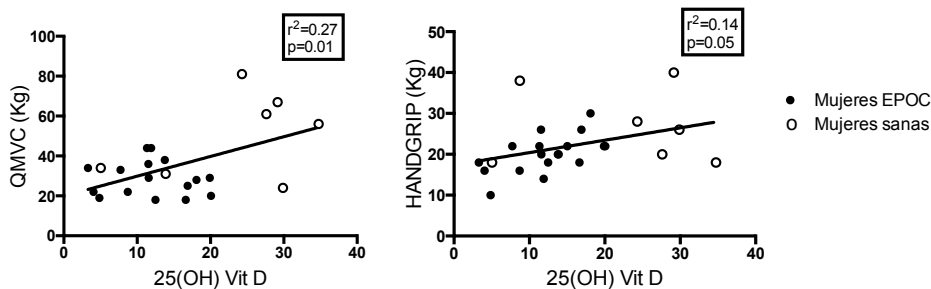
**Fig. 9.** Niveles de 25 (OH) vitamina D según la gravedad de la EPOC y sexo.

No hubo otras diferencias en los parámetros del metabolismo osteocálcico entre hombres y mujeres con EPOC, excepto para el fosfato que fue más bajo en el grupo de hombres. Por otra parte, en el grupo de las mujeres con la enfermedad se observó una tendencia de correlación directa entre los niveles de 25(OH) Vit D y el FEV<sub>1</sub> y una correlación inversa con el índice atrapamiento aéreo ( $p=0.03$ ) (Fig. 10).



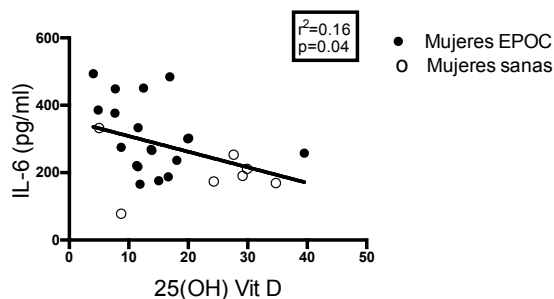
**Fig. 10.** Relación entre los niveles de 25 (OH) vitamina D y parámetros de función pulmonar (FEV<sub>1</sub> y RV/TLC) en mujeres con EPOC.

En cuanto a la fuerza muscular, en el grupo global de mujeres analizadas se observó una correlación tanto entre los niveles de 25(OH) Vit D y la fuerza del cuádriceps ( $p=0,01$ ) como con la fuerza de presión de la mano ( $p=0,05$ ) (Fig. 11). Dicha relación no se evidenció si sólo se consideraban las mujeres con EPOC.



**Fig. 11.** Relación entre los niveles de 25 (OH) vitamina D y parámetros de fuerza muscular (fuerza del cuádriceps y fuerza de prensión de la mano) en mujeres con EPOC.

Por otra parte, también se observó una correlación inversa entre los niveles de 25(OH) Vit D y los de IL-6 en sangre al considerar el grupo global de mujeres (pacientes y sanas) (Fig. 12), relación cuya significación se perdía al analizar sólo a las mujeres con la enfermedad.



**Fig. 12.** Relación entre los niveles de 25 (OH) vitamina D y parámetros de inflamación en suero (IL-6).

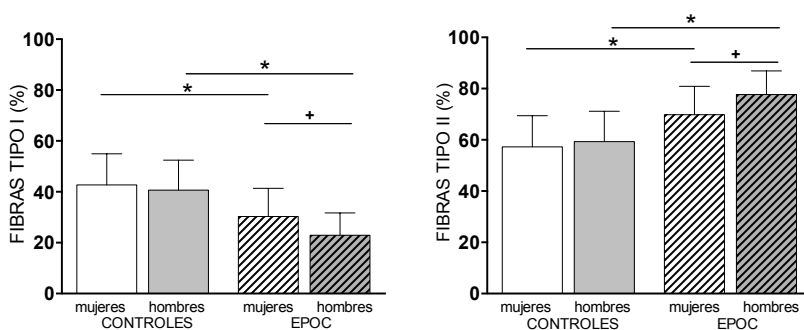
## 4. Músculo esquelético

### 4.1. Estructura

Los hallazgos más importantes se muestran en la Tabla 7.

#### a) Tipos de fibras

La proporción de fibras tipo I fue significativamente inferior en el cuádriceps de ambos grupos de pacientes con EPOC en comparación con sus respectivos controles, aunque el porcentaje de este tipo fue aún más reducido en los hombres con EPOC en comparación con las mujeres (Tabla 7- Fig. 13).



**Fig. 13.** Distribución del porcentaje de tipo de fibras musculares según enfermedad y sexo.



**Tabla 7.** Características estructurales del músculo *vastus lateralis*

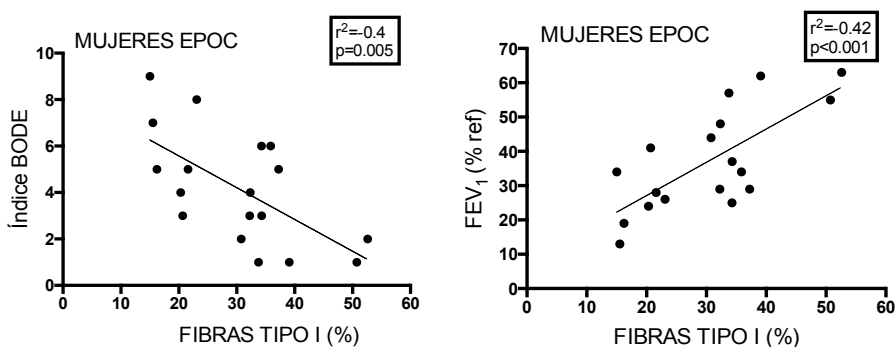
	Mujeres sanas	Hombres sanos	Mujeres EPOC	Hombres EPOC
<b>Fenotipo fibrilar</b>				
Fibras tipo I (%)	42,8 ± 12	40,6 ± 11	30,3 ± 11*	22,9 (9) **
Fibras tipo II (%)	57,2 ± 12	59,3 ± 11	69,7 ± 11*	77,7 ± 9**
CSA fibras tipo I (µm <sup>2</sup> )	2678 ± 619	3055 ± 625	2457 ± 885	2743 ± 820
CSA fibras tipo II (µm <sup>2</sup> )	1932 ± 621	2784 ± 758*	1777 ± 504	2384 ± 748*
<b>Signos de daño/reparación</b>				
Músculo anormal (%)	2,14 ± 0,8	1,71 ± 1,1	3,31 ± 1,4*	3,32 ± 1,6*
Núcleos internos (%)	0,87 ± 0,4	1,20 ± 0,9	1,22 ± 0,5	1,8 ± 0,5**
Células inflamatorias (%)	1,14 ± 0,6	0,86 ± 0,8	1,21 ± 0,7	1,67 ± 0,8
Depósitos lipofucsina (%)	0,04 ± 0,1	0,06 ± 0,1	0,06 ± 0,1	0,1 ± 0,1
Fibras anormales (%)	0,07 ± 0,2	0,06 ± 0,16	0,43 ± 0,3*	0,24 ± 0,2
Fibras necróticas (%)	0,04 ± 0,06	0,06 ± 0,15	0,45 ± 0,4*	0,23 ± 0,2
Fibras anormales + necróticas (%)	0,12 ± 0,2	0,16 ± 0,3	0,85 ± 0,6*	0,4 ± 0,3**

Datos presentados como media ± DE,

Abreviaturas: CSA: área por corte trasversal

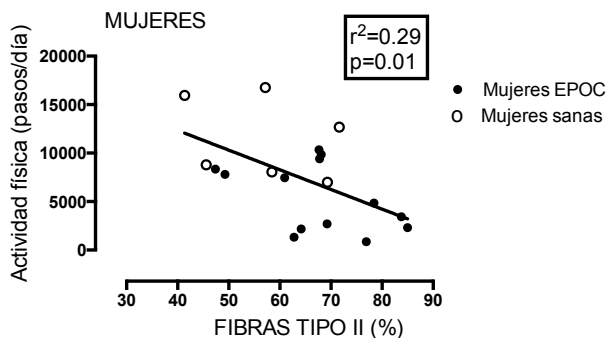
Significancias: \*, p<0,05, diferencias entre sanas y mujeres con EPOC o entre sanos y hombres con EPOC ; p<0,05 diferencias entre hombres y mujeres.

Se observó además una correlación inversa entre el porcentaje de fibras de tipo I y el índice BODE (p=0,05) y una directa con el FEV<sub>1</sub>(p<0,001) en el grupo de mujeres con EPOC (Fig. 14).



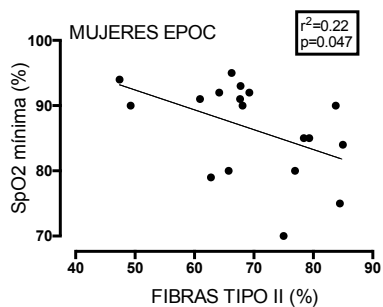
**Fig. 14.** Relación entre el porcentaje de fibras de tipo I y la gravedad de la enfermedad (índice BODE y FEV<sub>1</sub>) en mujeres con EPOC.

Si analizamos el grupo de mujeres en su conjunto (sanas y pacientes con EPOC) observamos también una asociación entre la actividad física con porcentaje de fibras de tipo II (Fig. 15).



**Fig. 15.** Relación entre el porcentaje de fibras de tipo II y la actividad física (media de pasos realizados al día) en las mujeres.

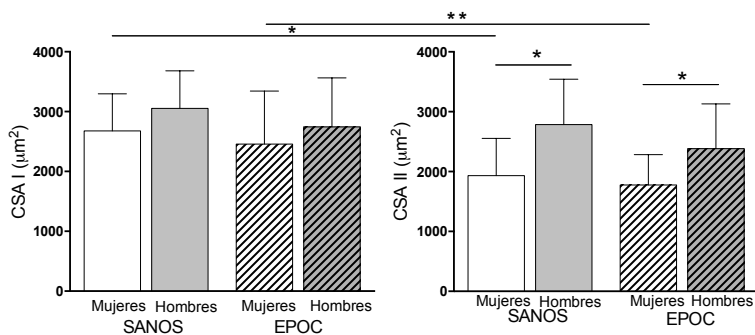
Se evidenció además una correlación inversa entre la proporción de fibras de tipo II y la máxima hipoxemia desarrollada durante el ejercicio (expresado por la saturación de oxígeno al final de la prueba de marcha de 6 minutos) en el grupo de mujeres con EPOC (Fig.16).



**Fig. 16.** Relación entre el porcentaje de fibras de tipo II y saturación de oxígeno al final de la prueba de marcha de 6 minutos en las mujeres con EPOC.

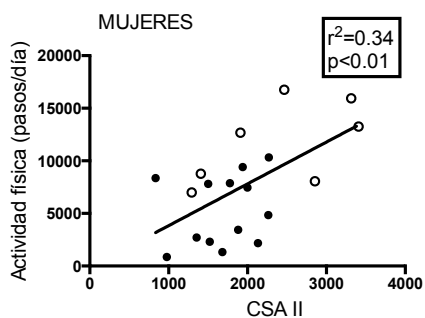
## b) Tamaños de fibras

No se encontraron diferencias en el tamaño de las fibras musculares entre los pacientes y sus respectivos controles (Tabla 6). Sin embargo, las fibras de tipo II fueron más pequeñas en el grupo de mujeres con EPOC que en los hombres con dicha enfermedad, un fenómeno que ya era observable en la población control. Además, en los pacientes varones las fibras I y II eran de similar tamaño, mientras que en las mujeres con EPOC las más pequeñas eran las de tipo II (Fig. 17).



**Fig. 17.** Distribución del tamaño de fibras musculares según enfermedad y sexo.

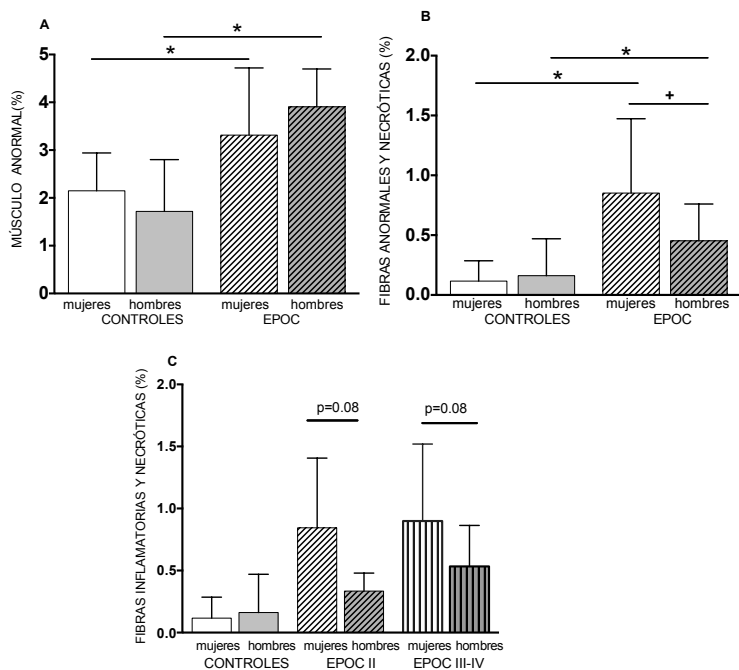
En el grupo de mujeres en su conjunto (pacientes y sanas) se observó una correlación directa entre el tamaño de las fibras de tipo II y el nivel de actividad física (Fig. 18).



**Fig. 18.** Relación entre el área de las fibras de tipo II y la actividad física en las mujeres.

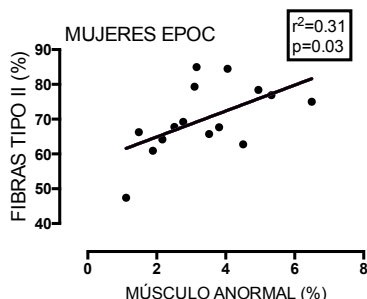
### c) Músculo anormal

La proporción de músculo anormal (235) fue mayor en los dos grupos con EPOC comparados con sus respectivos controles sanos (Tabla 6). No se evidenciaron diferencias entre hombres y mujeres con la enfermedad (Fig. 19A). Sin embargo, cuando esta variable se analizó para sus diferentes componentes, las mujeres con EPOC mostraron una tendencia a presentar una mayor proporción de fibras tanto anormales como necróticas comparadas con los hombres con EPOC. La suma de estas dos categorías, células anormales más células necróticas (que sería un indicador secundario de lesión muscular), fue significativamente más alto en mujeres con EPOC que en los hombres con la enfermedad (Fig. 19B). Un análisis post-hoc permitió observar que este fenómeno era igual de evidente en mujeres con grados moderados de la enfermedad que en aquellas en estadios avanzados, aunque el nivel de significancia se hallaba ligeramente por encima del límite en ambos subgrupos debido a la reducción de la muestra (Fig. 19C). Por otra parte, las mujeres y varones mostraban mayor número de núcleos internalizados (marcador indirecto de estadios precoces de regeneración), que sus controles sanos, aunque el aumento era inferior en las mujeres con EPOC.



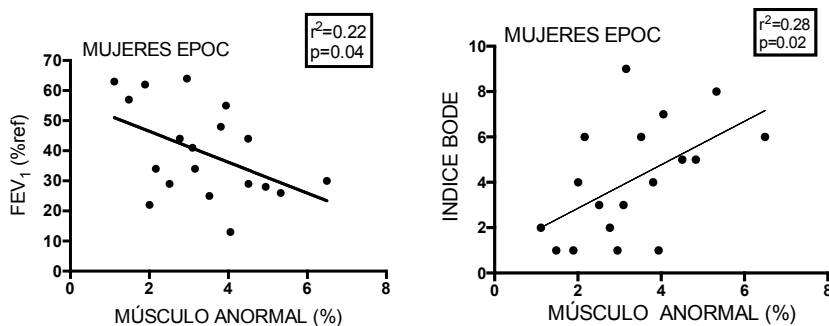
**Fig. 19.** A: Porcentaje de músculo anormal según enfermedad y sexo. B: Porcentaje del sumatorio de fibras anormales y necróticas (lesión muscular) según enfermedad y sexo. C: Porcentaje del sumatorio de fibras anormales y necróticas según el grado de enfermedad y sexo.

Es interesante reseñar que se observaba una correlación directa entre el porcentaje de músculo anormal y el de fibras de tipo II en el grupo de mujeres con EPOC ( $p=0,02$ ) (Fig. 20).



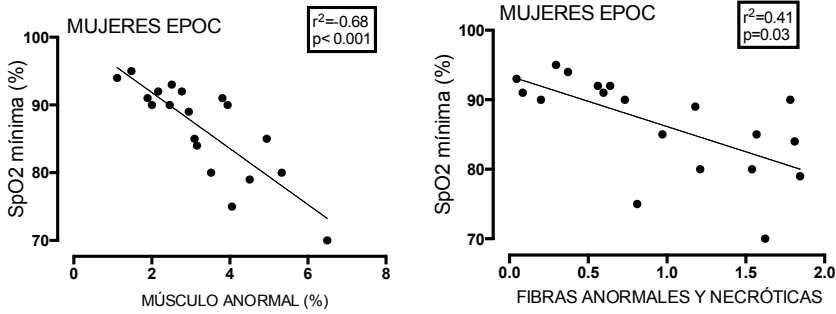
**Fig. 20** Relación entre el porcentaje de fibras de tipo II y el porcentaje de músculo anormal en las mujeres con EPOC.

También se observó una correlación inversa entre la proporción de músculo anormal y el  $FEV_1$  y una relación directa con el índice BODE en el grupo de las mujeres con EPOC ( $p=0,02$ ). Es decir, a mayor gravedad, superior importancia del proceso de daño y reparación (Fig. 21).



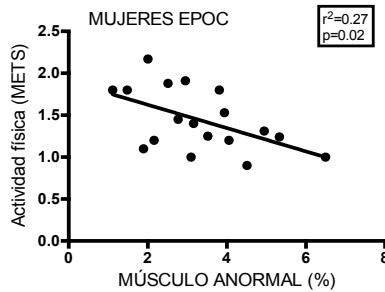
**Fig. 21.** Relación entre el porcentaje de músculo anormal y la gravedad de la EPOC ( $FEV_1$  e índice BODE).

También en este grupo de pacientes existía una correlación inversa entre tanto la proporción de músculo anormal como el sumatorio de fibras anormales y necróticas con el nivel mínimo de saturación de la oxihemoglobina en la prueba de marcha de 6 minutos ( $p \leq 0,001$  ambas) (Fig. 22).



**Fig. 22.** Relación entre el daño muscular (porcentaje músculo anormal y sumatorio de fibras anormales y necróticas) y saturación de oxígeno al final de la prueba de marcha de 6 minutos en las mujeres con EPOC.

Respecto de la actividad física, existía también una correlación inversa entre el porcentaje de músculo anormal y el equivalente metabólico (variable que expresa el nivel de actividad física) para las mujeres con EPOC ( $p=0,02$ ). Es decir, a menor nivel de actividad, más signos biológicos de presencia del proceso de daño y reparación (Fig.23).



**Fig. 23.** Relación entre el músculo anormal y la actividad física medida como equivalente metabólico en las mujeres con EPOC.

#### 4.2. Niveles de transcripción genética en músculo

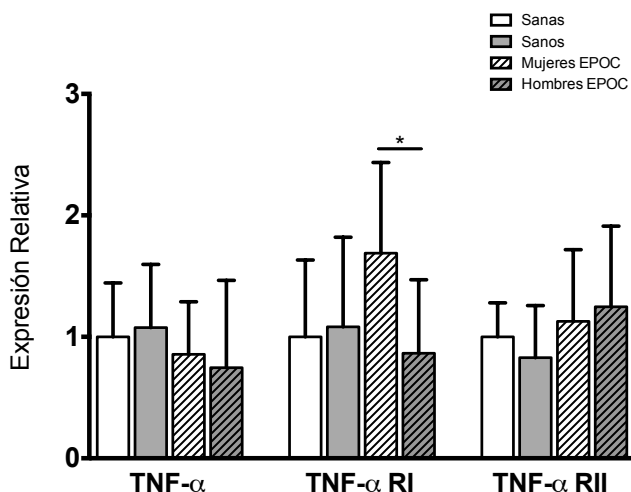
Los resultados de los diferentes genes analizados en el *vastus lateralis* de los cuatro grupos de sujetos estudiados se muestran en la tabla 8.

**Genes ligados a la miogénesis:** Los pacientes estables de ambos sexos no mostraron diferencias con sus respectivos controles. No obstante, las mujeres con EPOC mostraron niveles superiores de expresión para PAX7, Myf5 y M-Caderina que los hombres con la enfermedad. No hubo sin embargo, diferencias en los niveles de miogenina y de Myo-D.

**Marcadores de lesión o estrés celular:** No se observaron diferencias en la expresión de los genes codificados de las miosinas de desarrollo y la caveolina entre los diferentes grupos estudiados.

**Moléculas de adhesión:** las pacientes con EPOC mostraron niveles más altos de expresión del gen codificante de ITGB que los hombres con la enfermedad. No se observaron diferencias en los niveles de expresión de NCAM.

**Citoquinas:** Los niveles de mRNA de las diferentes citoquinas inflamatorias (TNF- $\alpha$  y sus receptores, IL-1 $\beta$  y su receptor, IL-6 y su receptor), no mostraron diferencias significativas entre cada uno de los grupos EPOC y sus respectivos controles. Lo mismo ocurrió al comparar entre sí los dos grupos con EPOC, excepto para el receptor I de TNF- $\alpha$  cuyos niveles fueron más altos en las mujeres que en los hombres (Fig. 24).



**Fig. 24.** Niveles de expresión génica de TNF- $\alpha$  y sus receptores en músculo cuádriceps según enfermedad y sexo.

**Tabla 8.** Expresión de transcripsomas (Unidades arbitrarias) de los diferentes factores de miogénesis y citoquinas en el músculo vastus lateralis de pacientes con EPOC y sujetos sanos.

	Mujeres Sanas	Hombres Sanos	Mujeres EPOC	Hombres EPOC
Pax7	1 ± 0,5	0,7 ± 0,5	1,2 ± 0,6	0,6 ± 0,6 <sup>+</sup>
MyF5	1 ± 0,5	0,7 ± 0,5	1 ± 0,6	0,6 ± 0,3 <sup>+</sup>
Myo-D	1 ± 0,3	0,8 ± 0,2	0,7 ± 0,2	0,6 ± 0,2
Miogenina	1 ± 0,4	1,2 ± 0,3	1,5 ± 0,6	1,3 ± 0,9
MyHC3-emb	1 ± 0,7	1,2 ± 1,2	1,4 ± 1,4	1,5 ± 1,3
MyHC8-peri	1 ± 0,7	1,4 ± 0,9	1,3 ± 1,1	1,1 ± 0,8
M-cadherin	1 ± 0,4	1,1 ± 0,5	1,3 ± 0,4	0,8 ± 0,4 <sup>+</sup>
NCAM	1 ± 0,4	1,3 ± 0,3	1,2 ± 0,9	1,2 ± 0,7
CAV3	1 ± 0,4	0,9 ± 0,5	0,9 ± 0,4	0,8 ± 0,4
ITG	1 ± 0,5	1 ± 0,2	1,1 ± 0,4	0,6 ± 0,2 <sup>+</sup>
TNF-	1 ± 0,4	1,1 ± 0,4	0,8 ± 0,4	0,7 ± 0,7
TNF- RI	1 ± 0,6	1,1 ± 0,7	1,7 ± 0,7	0,9 ± 0,6 <sup>+</sup>
TNF- RII	1 ± 0,3	0,8 ± 0,4	1,1 ± 0,6	1,2 ± 0,6
IL-1	1 ± 0,5	0,8 ± 0,4	0,7 ± 0,5	0,7 ± 0,8
IL-1 Receptor	1 ± 0,4	1,3 ± 0,7	1,3 ± 0,6	1 ± 0,6
IL-6	1 ± 0,7	0,6 ± 0,8	1,3 ± 1,2	1,7 ± 1,6
IL-6 Receptor	1 ± 0,2	1,1 ± 0,3	1,1 ± 0,6	0,8 ± 0,2
IGF-1	1 ± 0,4	0,8 ± 0,4	0,9 ± 0,4	0,6 ± 0,3 <sup>+</sup>
IGF-1 Receptor	1 ± 0,3	1,1 ± 0,5	1,5 ± 0,8	0,7 ± 0,4 <sup>+</sup>

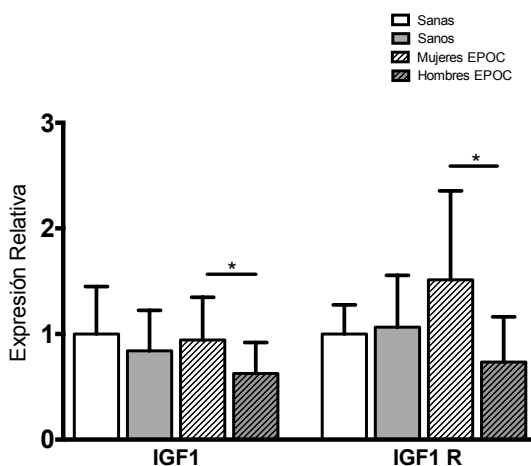
Los datos se presentan como media ± DE,

Abreviaciones: Pax7, *paired box protein Pax7*; MyF5, factor miogénico 5; Myo-D, proteína 1 de diferenciación miogénica; MyF6, factor 6 miogénico; MyHC-emb, isoforma de la cadena pesada de miosina embrionaria; MyHC-peri, isoforma de la cadena pesada de miosina perinatal; NCAM, molécula de adhesión de la célula neural; CAV3, *Caveolin 3*; ITG  $\beta$ , integrina  $\beta$ ; TNF- $\alpha$ , factor de necrosis tumoral  $\alpha$ ; TNF- $\alpha$  RI: receptor I de TNF  $\alpha$ ; TNF- $\alpha$  RII: receptor II de TNF- $\alpha$ ; IL interleuquina y IGF-1, factor de crecimiento insulínico tipo 1.

Significancias: <sup>+</sup>, p < 0,05 diferencias entre hombres y mujeres.



**Factores de crecimiento:** Aunque no se observaron diferencias entre los pacientes de cada sexo y sus respectivos controles sanos, tanto el IGF-1 como su receptor mostraron niveles superiores en el grupo de las mujeres con EPOC que en los hombres con la enfermedad (Fig. 25).



**Fig. 25.** Niveles de expresión génica de IGF1 y su receptor en músculo cuádriceps según enfermedad y sexo.

La expresión de  $\text{TNF-}\alpha$  y sus receptores correlacionaba directamente con determinadas moléculas de miogénesis (PAX7, Myf5, MYH3 y MYH8) en hombres y mujeres con EPOC.

#### 4.3. Citoquinas inflamatorias (nivel proteico) en músculo

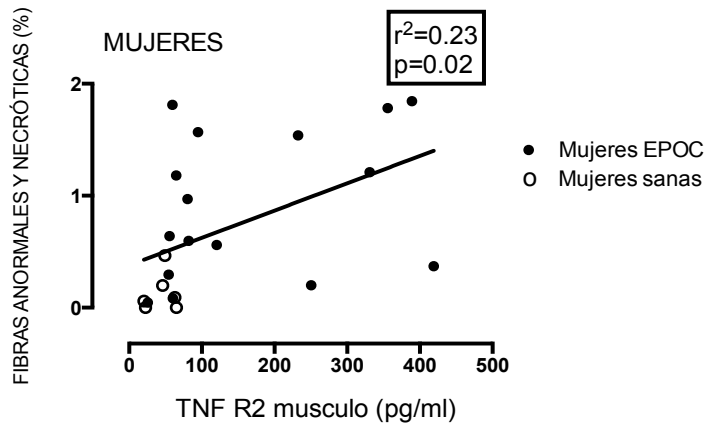
No se hallaron diferencias en los niveles proteicos de  $\text{TNF-}\alpha$ ,  $\text{IFN-}\gamma$ , IL-1b, IL-6, IL-10, y VEGF medidos en el homogeneizado muscular entre los diferentes grupos de pacientes y sujetos sanos (Tabla 9). La única excepción fue que las mujeres con EPOC mostraron niveles más altos del receptor I de  $\text{TNF-}\alpha$  que sus controles sanas ( $p=0,02$ ), y esta diferencia fue todavía más evidente para el receptor II de  $\text{TNF-}\alpha$ , que fue más elevado, tanto en comparación con las controles sanas ( $p<0.01$ ) como con los hombres con EPOC ( $p=0.01$ ). Se observó además una correlación directa entre los niveles de dicho receptor y el porcentaje del sumatorio de fibras inflamatorias y necróticas en el grupo de las mujeres (sanas y pacientes con EPOC) (Fig. 26).

**Tabla 9.** Citoquinas homogeneizado de músculo.

	Mujeres sanas	Hombres sanos	Mujeres EPOC	Hombres EPOC
TNF- $\alpha$ (pg/ml)	16,4 $\pm$ 14	19,4 $\pm$ 14	18,1 $\pm$ 11,1	16,9 $\pm$ 16
IFN $\gamma$ (pg/ml)	71,3 $\pm$ 27	58 $\pm$ 33	97,2 $\pm$ 68	94,1 $\pm$ 83
IL-1b (pg/ml)	1,7 $\pm$ 0,7	1,7 $\pm$ 0,6	2,1 $\pm$ 1,1	2,4 $\pm$ 0,9
IL-6 (pg/ml)	9,2 $\pm$ 3,4	19,5 $\pm$ 2,1	18,2 $\pm$ 21	18,5 $\pm$ 24
IL-10 (pg/ml)	4,4 $\pm$ 3,0	-	5,0 $\pm$ 5	6,4 $\pm$ 10
VEGF (pg/ml)	59,9 $\pm$ 39	62,32 $\pm$ 26	34,8 $\pm$ 45	48,3 $\pm$ 37,4
TNF- $\alpha$ RI (pg/ml)	18,3 $\pm$ 4,8	-	35,1 $\pm$ 22*	42,4 $\pm$ 9,3
TNF- $\alpha$ RII (pg/ml)	44,3 $\pm$ 19,2	-	174,8 $\pm$ 139**	90,6 $\pm$ 38,2*

Datos presentados como media  $\pm$  DE,

Abreviaturas; TNF- $\alpha$ , factor de necrosis tumoral; IFN- $\gamma$ , interferón- $\gamma$ ; IL, interleuquina; VEGF, factor de crecimiento de endotelio vascular; pg, picogramo; TNF- $\alpha$  RI: receptor I de TNF  $\alpha$ ; TNF- $\alpha$  RII: receptor II de TNF- $\alpha$ . Significancias: \*,  $p \leq 0,05$  y \*\*,  $p \leq 0,01$  diferencias entre sanas y mujeres con EPOC o entre sanos y hombres con EPOC; \*,  $p \leq 0,05$  diferencias entre hombres y mujeres.



**Fig. 26.** Relación entre el índice de lesión muscular (sumatorio de fibras anormales y necróticas) y los niveles proteicos del receptor II de TNF- $\alpha$  en las mujeres.

## 5. Relaciones entre inflamación sistémica, muscular y pulmonar

No se observó ninguna correlación entre las diferentes moléculas obtenidas del compartimento pulmonar (aire exhalado), el compartimento sistémico (suero) y el muscular.



## VI. DISCUSIÓN

El hallazgo más novedoso de la presente tesis se refiere a la importante presencia de signos histológicos de daño en el músculo cuádriceps de las pacientes con EPOC. Estos signos fueron superiores a los que mostraban los varones con la enfermedad, a pesar de que los niveles de afectación funcional, estado nutricional, inflamación sistémica y actividad física eran similares en ambos grupos. Este fenómeno fue evidente incluso en estadios moderados de la enfermedad. Lo contrario sucedía con los signos precoces de regeneración muscular, que fueron inferiores en las mujeres con EPOC respecto de los varones. Por otra parte, el *shift* hacia un aumento en la proporción de fibras de tipo II fue inferior en las mujeres con EPOC comparado con el de los varones. Asimismo, las mujeres presentan una mayor disminución de fuerza muscular, de la capacidad de esfuerzo y de los niveles de vitamina D, así como una tendencia a una superior percepción de la disnea en las mujeres con EPOC. También confirma la ausencia de relaciones en los niveles de inflamación entre los compartimentos sistémico, pulmonar y muscular.

### 1. Características generales

La edad media de los dos grupos de pacientes con EPOC estudiados coincide con la de los pacientes con dicha entidad en España (325). Respecto a las variables antropométricas, los pacientes con EPOC mostraron tendencia a tener valores inferiores de IMC y FFMI que los sujetos sanos. Es importante señalar además que los pacientes del presente trabajo mostraron también unos índices algo inferiores a los descritos en población española con EPOC (325) siendo más parecidos a los de la población europea descritos por Vestbo y col. (326). De forma similar, el porcentaje de pacientes con bajo peso fue mayor (cerca de 20% en ambos grupos) que el reportado para población española con EPOC, donde está descrito que sólo un 3-5% presentan IMC menor de 21(69, 75). Probablemente ambas discrepancias con los presentes resultados son debido en primer lugar a la mayor gravedad de la enfermedad en los pacientes aquí estudiados y en segundo lugar, a que posiblemente en ellos predominaba el fenotipo enfisematoso, como sugieren los valores de DLCO. A pesar de todo ello, los parámetros nutricionales (proteínas, albúmina, colesterol, hemoglobina) fueron similares en los 4 grupos, confirmando que las alteraciones nutricionales, aunque relativamente frecuentes, no eran marcadas.

### 2. Función pulmonar

Ambos grupos de pacientes con EPOC mostraron características similares en cuanto a la función pulmonar ya fuera en el grado de obstrucción, atrapamiento aéreo o en la capacidad de transferencia del monóxido de carbono, a pesar de que las mujeres tenían una menor exposición tabáquica. Estos datos van en concordancia con algunos estudios

ya publicados (27, 28, 30), que sugieren que las mujeres podrían ser más susceptibles al humo del tabaco. Se pueden además excluir razonablemente otros factores ambientales o laborales añadidos que pudieran haber influido en el desarrollo de la EPOC, puesto que ninguno de los pacientes tenía antecedentes de exposición a tóxicos o al humo de madera o carbón.

En relación a la capacidad de transferencia del monóxido de carbono, algunos estudios publicados (59, 61), muestran que las mujeres tienen mayor afectación que los hombres. Esto probablemente debido a que a pesar de que presentan menor grado de enfisema, éste es de localización más central. Sin embargo, en el presente estudio no se han encontrado diferencias entre sexos para la DLCO. No obstante, no puede asegurarse si esta similitud corresponde a que los pacientes presentaban un grado de enfisema comparable, o bien si existía algún otro factor añadido ya que, a pesar de que se realizó un TAC torácico a todos los pacientes con EPOC, la técnica asistencial empleada no permitió cuantificar de forma apropiada el grado enfisema. Por otra parte, la capacidad de transferencia del monóxido de carbono se correlacionó directamente con el índice de masa corporal en ambos grupos de pacientes, y con el FFMI en las mujeres con EPOC. Es conocido que esta última variable nutricional es más precisa en la evaluación del sexo femenino (68). Los presentes resultados concuerdan además con los datos publicados por Verhage (61) que sugieren que la asociación entre la DLCO y distintas variables nutricionales es más acentuada en las mujeres.

La hiperreactividad bronquial es un aspecto que no puede valorarse en este estudio, ya que fue considerado como criterio de exclusión para tener la seguridad de no incluir pacientes asmáticos o con fenotipo mixto, ya que éstos presentan respuestas inflamatorias diferentes, que podrían haber confundido los resultados.

### **3. Actividad física y capacidad de esfuerzo**

Respecto de la actividad física, como se ha mencionado en el apartado de Introducción, existen estudios contradictorios sobre las diferencias entre sexos (61, 97). En el presente trabajo se observó que las mujeres con EPOC caminaban algo menos que los hombres, aunque no se hallaron diferencias significativas entre ambos. Sin embargo, en el grupo de las mujeres observamos una correlación entre el grado de enfermedad y la actividad física. Por otra parte, aunque en ambos grupos existía una correlación entre actividad física y capacidad de esfuerzo ésta fue mucho más acusada en las mujeres. Por tanto, en este grupo concreto de pacientes, mejorar el nivel de actividad física y/o iniciar entrenamiento físico regular podría contribuir a mejorar la capacidad de esfuerzo y por tanto, repercutir en el pronóstico de la enfermedad.

En cuanto a la capacidad de esfuerzo, ésta se encontró más deteriorada en el grupo de mujeres con EPOC respecto de los hombres. Este hallazgo apoya los previamente descritos por Yquel y col.(97) quienes observaron mediante cicloergometría que las mujeres con EPOC presentaban un menor pico de potencia anaeróbico así como una menor velocidad óptima que los hombres. Es importante señalar que en el presente estudio la diferencia no fue debida a una mayor hipoxia, puesto que el nivel mínimo de saturación de la oxihemoglobina alcanzado fue similar en ambos grupos.

#### **4. Calidad de vida y síntomas clínicos**

El presente estudio reproduce en gran parte los resultados publicados por Martínez y col. (36). Si bien no hubo diferencias en cuanto a la calidad de vida en relación al sexo, sí existían diferencias en factores que influyen directamente sobre dicha dimensión. Martínez observa que, aparte de la disnea que influye en ambos sexos de forma similar, la oxigenación arterial es el principal factor que influye sobre la calidad de vida en las mujeres, mientras que en los hombres son la capacidad de ejercicio y la hiperinsuflación. En nuestro estudio observamos que en las mujeres existía una correlación entre calidad de vida y tanto la capacidad de esfuerzo (a diferencia del estudio mencionado) como el nivel de oxigenación basal, mientras que en el grupo de los hombres se observó únicamente una asociación con la actividad física. A diferencia del artículo anteriormente mencionado, en el presente estudio no se ha observado asociación entre calidad de vida y el grado de hiperinsuflación, probablemente debido a que sus autores estudiaron pacientes en estadios más iniciales de la enfermedad. Tampoco se ha observado asociación con la disnea, probablemente debido a los métodos que se han empleado en este estudio para su valoración.

Respecto de los síntomas, al igual que en la mayoría de artículos publicados (19, 36, 61, 129, 308), las pacientes con EPOC mostraron una tendencia a presentar más disnea que los controles hombres para un mismo grado de obstrucción. Sin embargo debe reconocerse que no se alcanzó la significación ( $p=0,06$ ), probablemente debido al tamaño muestral. Es importante señalar de nuevo que, al igual que en el estudio ECLIPSE (30) las mujeres con EPOC con dicha tendencia, tenían un menor índice acumulado de tabaquismo. No se encontraron diferencias respecto de otros síntomas o signos, como la tos, expectoración o sibilancias entre ambos sexos.

En relación a las comorbilidades, no se pueden analizar las diferencias globales entre ambos sexos ya que no era objetivo de la tesis y además, los pacientes que presentaban insuficiencia cardiaca, diabetes mellitus y cáncer de pulmón fueron excluidos para evitar interferencias en el estudio muscular. Por otra parte, no se realizaron densitometrías para valorar la osteoporosis ni se realizaron escalas de depresión-ansiedad al no ser tampoco objetivos específicos de esta tesis.

## 5. Inflamación sistémica

Al igual que la mayoría de artículos ya publicados (121, 123, 198, 327), en el presente estudio se ha observado que los pacientes con EPOC presentan niveles más elevados de citoquinas inflamatorias séricas que los sujetos sanos, aunque sin diferencias relacionadas con el sexo.

Algunos autores además han observado que el aumento en la inflamación sistémica, en concreto de IL-6 y PCR, se asocia a un peor pronóstico de la enfermedad (328), mayor limitación al flujo aéreo, peor estado de salud (199) y peor tolerancia al ejercicio (327). En el presente estudio se ha observado una asociación entre el nivel de IL-6 y el FEV<sub>1</sub> pero sólo en el grupo de las mujeres con EPOC y sin relación con la capacidad de ejercicio. Aunque puramente especulativo, pudiera pensarse que la gravedad de la enfermedad se halla más vinculada a la actividad inflamatoria en las mujeres.

Respecto del TNF- $\alpha$ , ésta es una citoquina proinflamatoria que a su vez estimula la síntesis de otras, como la IL-1 y la IL-6. Se ha descrito su aumento sobre todo en pacientes con EPOC que asocian caquexia (83, 329) o mayor pérdida de peso. Aunque en el presente estudio los pacientes con bajo peso muestra valores más elevados de TNF- $\alpha$  que el resto, al ser una muestra reducida (únicamente 4 pacientes en cada grupo) no permite formular conclusiones. Además, no se observó ninguna correlación entre TNF- $\alpha$  (ni otras citoquinas) y variables relacionadas con la masa o fuerza musculares.

## 6. Inflamación pulmonar

En el presente estudio se ha observado que los pacientes con EPOC muestran niveles superiores de TNF- $\alpha$  e IL-8, citoquinas implicadas en la inflamación local secundaria a la EPOC (330), en el condensado exhalado. Ambas pueden ser secretadas por macrófagos alveolares y células epiteliales activados por el humo de tabaco, aunque la fuente principal de IL-8 son los neutrófilos (50). De esta forma se ha correlacionado los niveles de IL-8 tanto con la inflamación neutrofílica presente en la EPOC como con la gravedad de la enfermedad (330). También se ha constatado en el presente estudio que las mujeres con EPOC muestran niveles de IL-8 superiores a los de los hombres. Una posible explicación podría ser que, como se ha descrito en la literatura (40, 41), las mujeres con EPOC tienen mayor afectación de la vía aérea que los varones. No obstante, para llegar a esta conclusión sería necesario corroborarlo con otro tipo de muestras (lavado broncoalveolar, esputo inducido, biopsia endobronquial...).



Respecto de los niveles superiores tanto de IL-4 como de IL-10 en pacientes con EPOC, hay muy pocos artículos que hayan estudiado estas citoquinas en el condensado exhalado. No obstante, hay estudios que no muestran diferencias en la IL-10 en lavado broncoalveolar (331), o bien que sus niveles son inferiores en pacientes con EPOC tratados con corticoides inhalados (332). En nuestra opinión dado el escaso número de pacientes y las características de la técnica hemos de tomar los presentes resultados con cautela.

## 7. Vitamina D

La vitamina D está implicada en el metabolismo osteocálico (333); sin embargo diversos estudios han sugerido que también existe una asociación entre esta vitamina y tanto el desarrollo muscular (334) como la patogénesis de algunas enfermedades autoinmunes (335), el asma (336) y las infecciones, incluidas las respiratorias (337) y la tuberculosis (338). También ha sido involucrada en la patogénesis y gravedad de la EPOC (339). Aunque hay dos estudios que no han mostrado relación entre la vitamina D y esta enfermedad (261, 340), sus conclusiones han sido cuestionadas por otros autores (167, 341). Una reciente revisión (339) concluye que, aunque los niveles de vitamina D no están asociado a un mayor riesgo de presentar EPOC, su deficiencia sí estaría asociada con la gravedad de la enfermedad (339). De todos modos, esta asociación podría ser una consecuencia más que la causa (ver Introducción). Por otra parte, también se ha observado que proporcionar aportes de vitamina D en aquellos pacientes con deficiencia puede disminuir las exacerbaciones y mejorar su fuerza muscular inspiratoria (271, 339, 342).

Por otra lado, la deficiencia de vitamina D es muy frecuente en población general de 40 a 80 años, y lo es todavía más en el sexo femenino (un 51% en mujeres frente a un 36% en hombres) (343).

Los datos del presente estudio muestran que los pacientes con EPOC presentan niveles inferiores de vitamina D que sus controles sanos, aunque esta diferencia fue sólo significativa en el grupo de las mujeres, y además, en este grupo la deficiencia está ya presente en estadios moderados y se asocia con la gravedad de la enfermedad (medida como FEV<sub>1</sub> y RV/TLC). Por otra parte, como se ha dicho en el apartado de Introducción, la deficiencia de vitamina D produce atrofia de las fibras de tipo II (264), que como es sabido, predomina en el músculo de los pacientes con EPOC. En el presente estudio se observa que las mujeres con EPOC tienen menor fuerza que los hombres y menor proporción de fibras de tipo II, y además existe una relación entre los niveles de Vitamina D y la fuerza (tanto de mano como de miembros inferiores) y sin embargo no se halló asociación entre los niveles de vitamina D y el porcentaje de fibras de tipo II, su tamaño o la masa muscular. Además en un análisis multivariante de regresión múltiple, donde

el porcentaje de fibras era la variable dependiente, se alcanzó un nivel de significación ( $p < 0,01$ ) para el  $FEV_1$  y no para los niveles de Vitamina D, por lo que es poco probable que su deficiencia juegue un papel determinante en el fenotipo muscular de las pacientes.

Relacionado también con el metabolismo osteocálcico se ha observado en el presente estudio que los hombres con EPOC tienen niveles inferiores de fósforo que sus controles sanos y que las mujeres con EPOC. Se ha descrito que los enfermos con EPOC pueden presentar más hipofosfatemia que la población general, lo que probablemente es secundario a la ingesta de fármacos como las xantinas, los diuréticos de asa o los beta-2 adrenérgicos (344). En el presente estudio ningún paciente estaba tratado con teofilina pero no puede asegurarse que los beta-2 adrenérgicos no puedan haber influido en los resultados. De cualquier forma, se considera hipofosfatemia niveles por debajo de 2,5 mg/dL, y sólo 3 pacientes presentaban niveles de 2,4 mg/dL y uno 2,2 mg/dL. Por tanto, la implicación clínica parece mínima.

## **8. Estructura y función muscular**

Tanto la fuerza de prensión de la mano como la fuerza del cuádriceps fue inferior en los pacientes con EPOC respecto a los controles sanos, aunque estas diferencias sólo fueron significativas para el cuádriceps (tanto en valores absolutos como normalizados por la masa libre de grasa). Por otra parte, es importante señalar que se observaron diferencias relacionadas con el sexo. Así, las mujeres con EPOC tenían menos fuerza que los varones. Además, como se ha dicho en el apartado de Resultados, los hombres con EPOC tenían una fuerza del cuádriceps normalizada por la masa que era un 27% inferior a la de los sanos, diferencia que ascendía hasta el 43% para las mujeres. Esto indica que la fuerza intrínseca del músculo, una vez normalizada por la masa, se halla mucho más reducida en las mujeres con EPOC, probablemente debido a factores metabólicos. Se observó además, especialmente en el grupo de las mujeres, una asociación entre la fuerza muscular y el nivel de actividad física lo que refleja la idea de que el decondicionamiento es un factor clave en la aparición de la disfunción muscular.

### **8.1 Estructura muscular**

#### **a) Tipos de fibras**

Los sujetos sanos, independientemente del sexo, muestran en sus cuádriceps alrededor de un 60% de las fibras de tipo II (304), datos muy similares a los hallados en el presente estudio. Por otra parte, es bien sabido que en los pacientes con EPOC se produce una disminución del porcentaje de las fibras de tipo I a favor de las de tipo II, y esto

es proporcional a la gravedad de la enfermedad (283-285) hallazgo confirmado en el presente estudio. Lo mismo sucede con el porcentaje de fibras de tipo II, que correlaciona tanto con el FEV<sub>1</sub> como con el índice BODE. Un dato importante a señalar respecto de los presentes resultados es que se ha constatado que las pacientes con EPOC muestran un *shift* menos marcado que los hombres hacia las fibras de tipo II, a pesar de que su nivel de actividad física era similar. Esto podría sugerir una mayor resistencia del sexo femenino al incremento de las fibras de tipo II. Este factor que recientemente se ha correlacionado con la mortalidad para la población global de pacientes con la enfermedad (345).

### **b) Tamaño de fibras**

En cuanto al tamaño de las fibras, el presente estudio reproduce las conclusiones publicadas por trabajos previos (307, 308), ya que el área transversa es menor en las mujeres únicamente para las fibras de tipo II. Por otra parte, hay trabajos que muestran que las fibras tipo IIA son más grandes que las I en los varones, mientras que en mujeres son las de tipo I (304). En el presente estudio los varones, ya fueran sanos o pacientes con EPOC, mostraron un tamaño similar en cuanto al área de sus fibras de tipo I y de tipo II. Sin embargo, en el caso de las mujeres y en concordancia con la literatura arriba mencionada, el tamaño de las de tipo I fue superior al de las de tipo II tanto en las sanas como en las pacientes con EPOC. Respecto al efecto de la enfermedad sobre el tamaño de las fibras, éstas suelen ser más pequeñas en pacientes con EPOC debido a la atrofia muscular (283, 284). Aunque algunos autores sugieren que esta atrofia afecta globalmente a todos los tipos de fibras (284), otros sugieren que sobre todo se observa en las de tipo II (283). En nuestro estudio se observó que tanto las fibras de tipo I como las de tipo II son más pequeñas en los pacientes (tanto hombres como mujeres) que en los sujetos sanos, aunque no existen diferencias significativas entre ambos sexos. Sí es importante reseñar que, analizando el grupo de mujeres en su conjunto, se observa una fuerte asociación entre el área de las fibras de tipo II y el nivel de actividad física. Este fenómeno podría ser resultado del decondicionamiento, ya que como se ha visto en la Introducción el sedentarismo o el bajo nivel de actividad física es la principal causa de atrofia y por tanto de disfunción muscular.

### **c) Músculo anormal**

Al igual que otros artículos previos del grupo (237), se observó que los pacientes con EPOC presentan mayor porcentaje de músculo anormal (indicador indirecto de la presencia de fenómenos de daño y reparación) que los controles sanos. Esto era especialmente evidente respecto del indicador de lesión, que además era más elevado en las mujeres que en los hombres con la enfermedad y estaba ya presente en estadios

moderados. Además, en el grupo de las mujeres, se observó una fuerte asociación con la gravedad de la enfermedad (con el FEV<sub>1</sub> y con el índice BODE). Por otra parte, existía una asociación entre el daño muscular y el nivel de actividad física. Es interesante resaltar que las mujeres con EPOC, con signos histológicos mayores de daño que las sanas y que los propios enfermos con EPOC, no mostraban signos de reparación precoz aumentados. Al contrario, sus signos de regeneración parecían similares a las de las mujeres sanas y eran inferiores a la de los varones.

Otro hallazgo importante a reseñar es la fuerte asociación encontrada entre el grado de hipoxemia durante el ejercicio y los indicadores histológicos de daño muscular en las mujeres con EPOC. Es sabido, que la hipoxia produce pérdida de masa muscular en la población general (346). Por otra parte, en pacientes con EPOC crónicamente expuestos a hipoxia se ha observado que presentan mayores niveles de estrés oxidativo en sus músculos periféricos (347-349). Asimismo, se ha evidenciado que la hipoxemia puede potenciar la respuesta inflamatoria, lo que contribuiría todavía más a la atrofia muscular (238) y además puede afectar a la capacidad oxidativa del músculo (capilarización y actividad enzimática)(350). Todos estos factores contribuyen obviamente a la disfunción muscular, por lo tanto no es de extrañar que las pacientes de este trabajo que presentaron mayores niveles de hipoxia durante el ejercicio muestren también mayor nivel de daño muscular, aunque es cierto que este aspecto debería analizarse con más profundidad. Llama la atención sin embargo, que a pesar de las razones fisiológicas que apoyarían los efectos deletéreos de la hipoxia crónica sobre el músculo, se conoce todavía muy poco sobre el efecto de la oxigenoterapia sobre la disfunción muscular en pacientes con EPOC.

Se ha observado también en el presente estudio una asociación entre el porcentaje de músculo anormal y el nivel de actividad física. Si bien el decondicionamiento produce en un primer momento atrofia fibrilar y aumento del porcentaje de fibras de tipo II (245), durante la evolución de la enfermedad aparecen también fenómenos de daño (237). Probablemente el nivel de actividad física es inicialmente una causa de disfunción muscular y posteriormente también una consecuencia de esta disfunción muscular.

Desde el punto de vista estructural, el daño muscular se asoció también al porcentaje de fibras de tipo II, ambos fenómenos por otra parte se relacionaron con la gravedad de la enfermedad.

En la presente tesis doctoral y como ya se menciona en el apartado de Resultados se ha realizado un análisis más exhaustivo del porcentaje de músculo anormal, analizando por separado algunos de los componentes descritos por Macgowan (235). Tal y como se explicó en la Introducción, el proceso de daño-reparación muscular se divide en

tres fases: lesión, fagocitosis-inflamación, y remodelado (con o sin restauración de la función muscular). La presencia de células anormales y células inflamadas o necróticas puede considerarse como indicativo de la primera fase. Los depósitos de pigmentos de lipofucsina (cuerpos residuales que resultan de la autólisis de lípidos y reflejan un aumento mantenido de la actividad lisosomal) pertenecerían a la fase de fagocitosis, (si bien su presencia en el músculo humano es muy escasa). Finalmente la presencia de núcleos internalizados corresponderían a los estadios más precoces de la última fase o de regeneración, ya que los nuevos núcleos procedentes de las células satélites asumen inicialmente una localización interna para desplazarse más tarde a la periferia y dirigir la regeneración muscular (236, 351). De los presentes resultados puede concluirse que las mujeres con EPOC presentan más fenómenos de daño propiamente dicho que los hombres, aunque éstos muestran mayores signos del inicio de la reparación.

## **8.2 Niveles de transcripción genética**

Los hombres con EPOC presentan menor expresión de determinados genes ligados a la miogénesis, a pesar de que presentan mas signos precoces de regeneración muscular. Aunque estos datos sean discondantes no es posible descartar el papel que pueden jugar factores locales o sistémicos en la regulación post-trascripcional de la expresión de dichos genes.

Respecto a la expresión de citoquinas, las mujeres con EPOC expresaban niveles más altos del receptor I de TNF- $\alpha$  y del receptor de IGF-1 en el músculo que los varones. Esto reforzaría el hallazgo de que las mujeres con EPOC presentan mayor daño muscular que los hombres. De hecho se sabe que las células musculares son capaces de sintetizar citoquinas inflamatorias (entre ellas TNF- $\alpha$  y sus receptores) en respuesta a la inducción de daño (352, 353). Actualmente está demostrado que el TNF- $\alpha$  en el tejido muscular produce tanto efectos deletéreos como beneficiosos. Entre los primeros estaría la inhibición la diferenciación miogénica y por tanto de la regeneración del músculo (354, 355), así como la inducción de apoptosis, produciendo una reducción de masa muscular (356). Entre los segundos, podría mencionarse la inducción de angiogénesis y la contribución a la proliferación y migración de las células satélite (357, 358). En el presente estudio se ha observado además una asociación entre los niveles de expresión de TNF- $\alpha$  y diversos genes ligados a la miogénesis, lo que apoyaría el papel de esta citoquina sobre la regeneración muscular en los pacientes con EPOC.

### 8.3 Niveles proteicos de citoquinas en músculo

Al igual que en la expresión de trascripsomas, mediante inmunoanálisis se detectaron también niveles proteicos más elevados de receptores de TNF- $\alpha$  en los pacientes con EPOC respecto de los sanos, y niveles incluso superiores del receptor II en las mujeres con EPOC respecto de los hombres con la enfermedad. Más aún, se encontró una asociación entre estos últimos y el marcador histológico de lesión muscular, lo que nuevamente apoyaría el hecho de que las mujeres presentan mas inflamación local y daño muscular que los hombres.

### 8.4 Teoría estrogénica

Ante estos hallazgos, se plantea la pregunta de cuál es el hecho diferencial que hace que las mujeres tengan menor capacidad de esfuerzo, menor fuerza y sobre todo, más daño muscular y menor nivel de reparación que los hombres. Si bien hay factores según la literatura que pueden estar implicados, como son el déficit de vitamina D, el bajo nivel de actividad física o la hipoxia, éstos no parece ser determinantes en cuanto a la diferenciación por sexos. Sin embargo, obviamente lo que distingue a unos de otras son las hormonas sexuales, las cuales podrían jugar un papel importante tanto en el daño muscular y la consecuente respuesta inflamatoria como en la reparación del mismo. Es sabido que las hormonas sexuales están implicadas en la regeneración de músculo esquelético, pero mientras que los efectos anabolizantes de los andrógenos son bien conocidos, los efectos de los estrógenos sobre el músculo se han descubierto más recientemente. Por una parte los estrógenos parecen jugar un papel importante en la protección del músculo frente al daño inducido por el ejercicio (359). En este sentido diversos estudios *in vitro* han mostrado que tanto la concentración de creatina quinasa basal como la liberada tras contracciones musculares es mayor en ratas tratadas con ovariectomía y ratas machos que en ratas hembras y en ratas machos tratadas con terapia hormonal estrogénica (360, 361). Esto apoya la teoría de que los estrógenos actúan como antioxidante y estabilizador de membrana, protegiendo la integridad del sarcolema (359, 362). Por otra parte, los estrógenos pueden actuar sobre la respuesta inflamatoria tras el daño. De esta forma, se ha observado que la invasión neutrofílica inicial tras el daño es mayor en las ratas tratadas con ovariectomía y esta respuesta inflamatoria se atenúa si son tratadas con estrógenos (359). Por último, estudios realizados también en ratas ovariectomizadas han mostrado que en éstas se produce una menor activación de células satélites tras el daño, mientras que el tratamiento hormonal estrogénico restablece también dicha respuesta celular (359, 363). Aunque más escasos, también hay estudios realizados en humanos en relación a estos hallazgos. Así, un estudio realizado sobre hermanas gemelas sometidas sólo una de ellas a terapia hormonal sustitutiva mostró que las mujeres tratadas tenían

mayor masa y fuerza muscular que las no tratadas (364). Otro estudio más reciente mostró que el tratamiento estrogénico atenuaba la respuesta neutrofílica tras el daño, no sólo en mujeres postmenopáusicas si no también en hombres jóvenes (365).

En la mujer, la secreción de estradiol al plasma es variable a lo largo del ciclo menstrual, con unas concentraciones de alrededor de 30 pg/mL en fase folicular temprana, 300 pg/mL en fase periovulatoria y 200 pg/mL en fase lutea. La menopausia o cese permanente de la menstruación se produce alrededor de los 51 años, con un intervalo que oscila entre los 45 y los 58. Esto conlleva un descenso muy importante de las concentraciones de estradiol inferior a 20 pg/mL. Sin embargo, a diferencia del climaterio femenino, el declive de la función sexual y gonadal en el hombre es mucho más progresivo. Se observa una tendencia al descenso de la concentración de la testosterona a partir de los 55 a 65 años, aunque suele permanecer dentro del intervalo de la normalidad hasta edades más avanzadas (366). Ya en el terreno de las hipótesis, este descenso brusco de estrógenos (presente en las pacientes de este trabajo como muestran sus bajos niveles de estrógenos) podría hacer que la mujer, además de ser más susceptible a la EPOC (18, 27, 28, 30), pudiera ser también más vulnerable a la lesión y disfunción muscular que acompaña frecuentemente a esta entidad.

## **9. Relaciones entre inflamación sistémica, muscular y pulmonar**

Inicialmente se pensaba que la inflamación sistémica que presentan los pacientes con EPOC derivaba de la inflamación pulmonar, que de alguna manera se extendía al resto del organismo a través de la sangre. Esta es la teoría conocida como *spillover* (197). Sin embargo, la ausencia de correlaciones entre los niveles de inflamación local y sistémica o en otros órganos, incluido el músculo, así como la presencia de alteraciones musculares que preceden en muchos casos a la afectación pulmonar contradicen en gran parte esta teoría (77, 197, 256, 367). Por lo tanto parece más probable que las manifestaciones extrapulmonares surjan en paralelo a la enfermedad pulmonar, originadas ambas por un mismo estímulo nocivo (77).

En concordancia con lo reportado por otros autores, en el presente estudio, a pesar de que los pacientes mostraban mayor grado de inflamación tanto a nivel sistémico como muscular o pulmonar que los sujetos sanos, no se observó ninguna correlación entre los diversos compartimentos para ninguno de los dos sexos. Esto apoyaría la teoría de existe poca relación entre ellos y que responden de forma autónoma frente a una noxa común.

## 10. Implicaciones clínicas

En el presente estudio existen varios puntos de interés clínico. En primer lugar, la confirmación de que las mujeres con EPOC tienen mayores signos histológicos de daño muscular que los hombres. Segundo, la asociación de este fenómeno con diversos factores sobre los que se podría incidir directamente:

1. Actividad física: se ha relacionado con la función pulmonar, la capacidad de esfuerzo, la calidad de vida, la fuerza muscular así como con alteraciones en la estructura y biología musculares. Los programas de rehabilitación que ya han demostrado disminuir los síntomas, mejorar la capacidad de esfuerzo y la calidad de vida así como los aspectos psicoemocionales podrían tener también un efecto directo sobre la afectación estructural y funcional del músculo, especialmente en las mujeres.

2. Hipoxia durante el ejercicio. Si se debe prescribir oxigenoterapia a un paciente con EPOC que únicamente desatura en el ejercicio es un tema todavía controvertido. Sin embargo cada vez son más los expertos que lo aconsejan. En base a la fisiología muscular y a los hallazgos aquí encontrados, parece más que razonable incentivar la actividad física en las mejores condiciones de oxigenación, al menos en las pacientes con EPOC, lo que probablemente también podría disminuir el daño muscular.

3. Vitamina D: Se ha visto que incluso en población general, y todavía más en pacientes con EPOC existe un déficit de esta vitamina. En el presente trabajo, dicho déficit era más marcado en las mujeres con la enfermedad y se relacionaba con la gravedad de la EPOC y la fuerza muscular. El aspecto nutricional en la EPOC es muy importante porque no debe olvidarse que tiene por sí mismo implicaciones pronósticas. Por tanto, una variada y correcta alimentación, y si fuera necesario suplementos de vitamina D, deberían ser aconsejables sobre todo en las enfermas. Por otra parte, sería beneficioso igualmente para disminuir el riesgo de osteoporosis, enfermedad muy prevalente en estas pacientes.

4. Estrógenos: si bien se ha defendido que la presencia o ausencia de estas hormonas puede jugar un papel crucial en la afectación muscular, concretamente en la deficiente reparación del daño, el aconsejar terapia hormonal sustitutiva es un tema controvertido por sus efectos secundarios. Por tanto, a pesar de sus posibles efectos beneficiosos sobre el músculo, es arriesgada su recomendación en las pacientes con EPOC.



## 11. Limitaciones del estudio

Una de las principales limitaciones del presente estudio es el tamaño muestral, que aunque ha permitido llegar a conclusiones en cuanto a la afectación muscular en la EPOC y sus diferencias entre sexos, objetivo principal de la presente tesis, no ha permitido alcanzar significación en algunos aspectos clínicos, como los síntomas o la calidad de vida, así como en ciertas asociaciones de carácter clínico-funcionales. No obstante, tales objetivos son muy secundarios en el presente estudio, caracterizado sobre todo por la adquisición y análisis de muestras biológicas (algunas de ellas a través de un grado de invasividad relativamente elevado). Esto obviamente ha limitado por razones éticas la consecución de poblaciones más amplias, características de estudios de índole más clínica.

Por otra parte, y como ya se ha mencionado, los estrictos criterios de inclusión empleados para los pacientes con EPOC han hecho que éstos hayan sido cuidadosamente seleccionados para evitar factores de confusión. Así, no se han incluido pacientes con fenotipo mixto (o con hiperreactividad bronquial) ni con comorbilidades relevantes que pudieran haber afectado *per se* la estructura y función musculares.

Otra limitación, como ya se ha explicado previamente, es la falta de una TAC torácica de características adecuadas, para permitir comparar de forma precisa el grado de enfisema entre ambos grupos de enfermos, así como analizar posibles asociaciones entre el grado de enfisema y aspectos funcionales (tanto a nivel pulmonar como muscular) y nutricionales o incluso estructurales del músculo.

Finalmente, es importante señalar que la metodología empleada en la valoración de la estructura muscular, especialmente el porcentaje de músculo anormal, es una técnica con ciertos componentes subjetivos. Sin embargo, se ha intentado minimizar este aspecto realizando las mediciones siempre de forma ciega y por 2 observadores independientes, uno de ellos la autora de esta tesis.

## 12. Principales fortalezas

La principal fortaleza de este estudio es que todos los pacientes han sido reclutados siguiendo los mismos criterios y han realizado las pruebas de función pulmonar y muscular en el mismo laboratorio, evitando así sesgos en las mediciones.

Por otra parte, todas las biopsias musculares han sido realizadas por la misma persona (la autora de esta tesis), siguiendo la misma metodología descrita por el grupo, lo que ha permitido tener muestras comparables ya que sabido que la morfología muscular, fundamentalmente el fenotipo fibrilar, puede variar según la localización precisa de la biopsia muscular en el *vastus lateralis* del cuádriceps.

Todas las fases del estudio han sido realizadas además por el mismo equipo, lo que permite disponer de los conocimientos y técnicas adecuadas a lo largo del proceso, así como un debate multidisciplinar sobre los resultados.





## VII. CONCLUSIONES

Las mujeres con EPOC presentan una afectación muscular diferenciada de los varones, en primer lugar presentan más de signos histológicos de daño en el músculo cuádriceps que los varones incluso en estadios moderados de la enfermedad y a pesar de que los niveles de afectación funcional, estado nutricional, inflamación sistémica y de actividad física eran similares en ambos grupos. Sin embargo, presentan menos signos precoces de regeneración muscular que los hombres. Por otra parte, el *shift* hacia un aumento en la proporción de fibras de tipo II es inferior en las mujeres con EPOC comparado con el de los varones. Así mismo, las mujeres con EPOC presentan una mayor disminución de fuerza muscular y de la capacidad de esfuerzo. Existen diferentes factores que se asocian a esta afectación muscular en las mujeres con EPOC, como los niveles de vitamina D, la hipoxia o el nivel de actividad física, sin embargo existen otros factores inherentes al sexo (estrógenos) que podrían explicar estas diferencias.

Con el presente estudio se confirma la ausencia de relaciones en los niveles de inflamación entre los componentes sistémico, pulmonar y muscular.

Las mujeres con EPOC muestran una tendencia a una superior percepción de la disnea que los hombres, presentan menor capacidad de ejercicio y aunque nivel de calidad de vida es similar en ambos sexos, ésta se asocia a diferentes factores en función del sexo.



## BIBLIOGRAFÍA

- 1** Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of COPD, Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) 2015. Available from: <http://www.goldcopd.org/>. 2015.
- 2** Celli BR, MacNee W. Standards for the diagnosis and treatment of patients with COPD: a summary of the ATS/ERS position paper. *Eur Respir J*. 2004;23(6):932-46.
- 3** 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. *The New England journal of medicine*. 2004;350(10):1005-12.
- 4** Marin JM. [Old and new criteria for classifying COPD]. *Archivos de bronconeumologia*. 2004;40 Suppl 6:9-15.
- 5** Jones PW. COPD assessment test --rationale, development, validation and performance. *Copd*. 2013;10(2):269-71.
- 6** Van der Molen T, Willemse BW, Schokker S, ten Hacken NH, Postma DS, Juniper EF. Development, validity and responsiveness of the Clinical COPD Questionnaire. Health and quality of life outcomes. 2003;1:13.
- 7** Miravittles M, Soler-Cataluna JJ, Calle M, Molina J, Almagro P, Quintano JA, et al. Spanish guideline for COPD (GesEPOC). Update 2014. *Archivos de bronconeumologia*. 2014;50 Suppl 1:1-16.
- 8** Buist AS, McBurnie MA, Vollmer WM, Gillespie S, Burney P, Mannino DM, et al. International variation in the prevalence of COPD (the BOLD Study): a population-based prevalence study. *Lancet*. 2007;370(9589):741-50.
- 9** Ancochea J, Badiola C, Duran-Tauleria E, Garcia Rio F, Miravittles M, Munoz L, et al. [The EPI-SCAN survey to assess the prevalence of chronic obstructive pulmonary disease in Spanish 40-to-80-year-olds: protocol summary]. *Archivos de bronconeumologia*. 2009;45(1):41-7.
- 10** Mathers CD, Loncar D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS medicine*. 2006;3(11):e442.

- 11 Pauwels RA, Buist AS, Ma P, Jenkins CR, Hurd SS, Committee GS. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: National Heart, Lung, and Blood Institute and World Health Organization Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD): executive summary. *Respiratory care*. 2001;46(8):798-825.
- 12 Murray CJ, Lopez AD. Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: Global Burden of Disease Study. *Lancet*. 1997;349(9064):1498-504.
- 13 Lozano R, Naghavi M, Foreman K, Lim S, Shibuya K, Aboyans V, et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*. 2012;380(9859):2095-128.
- 14 Van Durme YM, Verhamme KM, Stijnen T, van Rooij FJ, Van Pottelberge GR, Hofman A, et al. Prevalence, incidence, and lifetime risk for the development of COPD in the elderly: the Rotterdam study. *Chest*. 2009;135(2):368-77.
- 15 Varkey AB. Chronic obstructive pulmonary disease in women: exploring gender differences. *Current opinion in pulmonary medicine*. 2004;10(2):98-103.
- 16 Thun MJ, Carter BD, Feskanich D, Freedman ND, Prentice R, Lopez AD, et al. 50-year trends in smoking-related mortality in the United States. *The New England journal of medicine*. 2013;368(4):351-64.
- 17 Ford ES. Trends in Mortality From COPD Among Adults in the United States. *Chest*. 2015;148(4):962-70.
- 18 Prescott E, Bjerg AM, Andersen PK, Lange P, Vestbo J. Gender difference in smoking effects on lung function and risk of hospitalization for COPD: results from a Danish longitudinal population study. *Eur Respir J*. 1997;10(4):822-7.
- 19 Celli B, Vestbo J, Jenkins CR, Jones PW, Ferguson GT, Calverley PM, et al. Sex differences in mortality and clinical expressions of patients with chronic obstructive pulmonary disease. The TORCH experience. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2011;183(3):317-22.
- 20 Lange P, Nyboe J, Appleyard M, Jensen G, Schnohr P. Relation of ventilatory impairment and of chronic mucus hypersecretion to mortality from obstructive lung disease and from all causes. *Thorax*. 1990;45(8):579-85.



- 21** Machado MC, Krishnan JA, Buist SA, Bilderback AL, Fazolo GP, Santarosa MG, et al. Sex differences in survival of oxygen-dependent patients with chronic obstructive pulmonary disease. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2006;174(5):524-9.
- 22** Cao Z, Ong KC, Eng P, Tan WC, Ng TP. Frequent hospital readmissions for acute exacerbation of COPD and their associated factors. *Respirology*. 2006;11(2):188-95.
- 23** Cydulka RK, Rowe BH, Clark S, Emerman CL, Rimm AR, Camargo CA, Jr. Gender differences in emergency department patients with chronic obstructive pulmonary disease exacerbation. *Academic emergency medicine : official journal of the Society for Academic Emergency Medicine*. 2005;12(12):1173-9.
- 24** Gonzalez AV, Suissa S, Ernst P. Gender differences in survival following hospitalisation for COPD. *Thorax*. 2011;66(1):38-42.
- 25** Patil SP, Krishnan JA, Lechtzin N, Diette GB. In-hospital mortality following acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Archives of internal medicine*. 2003;163(10):1180-6.
- 26** Gold DR, Wang X, Wypij D, Speizer FE, Ware JH, Dockery DW. Effects of cigarette smoking on lung function in adolescent boys and girls. *The New England journal of medicine*. 1996;335(13):931-7.
- 27** Gan WQ, Man SF, Postma DS, Camp P, Sin DD. Female smokers beyond the perimenopausal period are at increased risk of chronic obstructive pulmonary disease: a systematic review and meta-analysis. *Respir Res*. 2006;7:52.
- 28** Vestbo J, Prescott E, Lange P. Association of chronic mucus hypersecretion with FEV1 decline and chronic obstructive pulmonary disease morbidity. Copenhagen City Heart Study Group. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1996;153(5):1530-5.
- 29** Connett JE, Murray RP, Buist AS, Wise RA, Bailey WC, Lindgren PG, et al. Changes in smoking status affect women more than men: results of the Lung Health Study. *Am J Epidemiol*. 2003;157(11):973-9.
- 30** Agusti A, Calverley PM, Celli B, Coxson HO, Edwards LD, Lomas DA, et al. Characterisation of COPD heterogeneity in the ECLIPSE cohort. *Respir Res*. 2010;11:122.

- 31** Foreman MG, Zhang L, Murphy J, Hansel NN, Make B, Hokanson JE, et al. Early-onset chronic obstructive pulmonary disease is associated with female sex, maternal factors, and African American race in the COPD Gene Study. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2011;184(4):414-20.
- 32** Orozco-Levi M, Garcia-Aymerich J, Villar J, Ramirez-Sarmiento A, Anto JM, Gea J. Wood smoke exposure and risk of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J*. 2006;27(3):542-6.
- 33** Sin DD, Cohen SB, Day A, Coxson H, Pare PD. Understanding the biological differences in susceptibility to chronic obstructive pulmonary disease between men and women. *Proc Am Thorac Soc*. 2007;4(8):671-4.
- 34** Gibson JGG, D.M.; Costabel, U.; Sterk, P.J.; Corrin, B. *Respiratory Medicine*. Third ed 2003.
- 35** Han MK, Bartholmai B, Liu LX, Murray S, Curtis JL, Scirba FC, et al. Clinical significance of radiologic characterizations in COPD. *Copd*. 2009;6(6):459-67.
- 36** Martinez FJ, Curtis JL, Scirba F, Mumford J, Giardino ND, Weinmann G, et al. Sex differences in severe pulmonary emphysema. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007;176(3):243-52.
- 37** Kim WJ, Silverman EK, Hoffman E, Criner GJ, Mosenifar Z, Scirba FC, et al. CT metrics of airway disease and emphysema in severe COPD. *Chest*. 2009;136(2):396-404.
- 38** Camp PG, Coxson HO, Levy RD, Pillai SG, Anderson W, Vestbo J, et al. Sex differences in emphysema and airway disease in smokers. *Chest*. 2009;136(6):1480-8.
- 39** Grydeland TB, Dirksen A, Coxson HO, Pillai SG, Sharma S, Eide GE, et al. Quantitative computed tomography: emphysema and airway wall thickness by sex, age and smoking. *Eur Respir J*. 2009;34(4):858-65.
- 40** Kim YI, Schroeder J, Lynch D, Newell J, Make B, Friedlander A, et al. Gender differences of airway dimensions in anatomically matched sites on CT in smokers. *Copd*. 2011;8(4):285-92.
- 41** Gu S, Deng X, Li Q, Sun X, Xu J, Li H. Gender differences of chronic obstructive pulmonary disease associated with manifestations on HRCT. *The clinical respiratory journal*. 2015.

- 42** American Thoracic Society. Statement on definitions and classifications of chronic bronchitis, asthma, and pulmonary emphysema. *Am Rev Respir Dis.* 1962;85:762.
- 43** Robbins CQ. *Patología Estructural y Funcional.* 4ª ed: Interamericana-McGraw-Hill; 1998.
- 44** Hogg JC. Pathophysiology of airflow limitation in chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet.* 2004;364(9435):709-21.
- 45** Bon JM, Leader JK, Weissfeld JL, Coxson HO, Zheng B, Branch RA, et al. The influence of radiographic phenotype and smoking status on peripheral blood biomarker patterns in chronic obstructive pulmonary disease. *PloS one.* 2009;4(8):e6865.
- 46** Coxson HO, Dirksen A, Edwards LD, Yates JC, Agusti A, Bakke P, et al. The presence and progression of emphysema in COPD as determined by CT scanning and biomarker expression: a prospective analysis from the ECLIPSE study. *The Lancet Respiratory medicine.* 2013;1(2):129-36.
- 47** Dransfield MT, Washko GR, Foreman MG, Estepar RS, Reilly J, Bailey WC. Gender differences in the severity of CT emphysema in COPD. *Chest.* 2007;132(2):464-70.
- 48** Wouters EF. Local and systemic inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc.* 2005;2(1):26-33.
- 49** O'Shaughnessy TC, Ansari TW, Barnes NC, Jeffery PK. Inflammation in bronchial biopsies of subjects with chronic bronchitis: inverse relationship of CD8+ T lymphocytes with FEV1. *American journal of respiratory and critical care medicine.* 1997;155(3):852-7.
- 50** Barnes PJ, Shapiro SD, Pauwels RA. Chronic obstructive pulmonary disease: molecular and cellular mechanisms. *Eur Respir J.* 2003;22(4):672-88.
- 51** Macario CC, de Torres Tajés JP, Cordoba Lanus E. [COPD: bronchial and systemic inflammation]. *Archivos de bronconeumologia.* 2010;46 Suppl 4:9-15.
- 52** Bresser P, Out TA, van Alphen L, Jansen HM, Lutter R. Airway inflammation in nonobstructive and obstructive chronic bronchitis with chronic haemophilus influenzae airway infection. Comparison with noninfected patients with chronic obstructive pulmonary disease. *American journal of respiratory and critical care medicine.* 2000;162(3 Pt 1):947-52.

- 53** MacNee W. Pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc.* 2005;2(4):258-66; discussion 90-1.
- 54** Russell RE, Culpitt SV, DeMatos C, Donnelly L, Smith M, Wiggins J, et al. Release and activity of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 by alveolar macrophages from patients with chronic obstructive pulmonary disease. *American journal of respiratory cell and molecular biology.* 2002;26(5):602-9.
- 55** Cantin AM, Fells GA, Hubbard RC, Crystal RG. Antioxidant macromolecules in the epithelial lining fluid of the normal human lower respiratory tract. *The Journal of clinical investigation.* 1990;86(3):962-71.
- 56** Linden M, Hakansson L, Ohlsson K, Sjodin K, Tegner H, Tunek A, et al. Glutathione in bronchoalveolar lavage fluid from smokers is related to humoral markers of inflammatory cell activity. *Inflammation.* 1989;13(6):651-8.
- 57** Mollerup S, Ryberg D, Hewer A, Phillips DH, Haugen A. Sex differences in lung CYP1A1 expression and DNA adduct levels among lung cancer patients. *Cancer research.* 1999;59(14):3317-20.
- 58** Hogg JC, Chu F, Utokaparch S, Woods R, Elliott WM, Buzatu L, et al. The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *The New England journal of medicine.* 2004;350(26):2645-53.
- 59** Martinez FJ, Curtis JL, Sciruba F, Mumford J, Giardino ND, Weinmann G, et al. Sex differences in severe pulmonary emphysema. *American journal of respiratory and critical care medicine.* 2007;176(3):243-52.
- 60** Nakano Y, Sakai H, Muro S, Hirai T, Oku Y, Nishimura K, et al. Comparison of low attenuation areas on computed tomographic scans between inner and outer segments of the lung in patients with chronic obstructive pulmonary disease: incidence and contribution to lung function. *Thorax.* 1999;54(5):384-9.
- 61** Verhage TL, Heijdra Y, Molema J, Vercoulen J, Dekhuijzen R. Associations of muscle depletion with health status. Another gender difference in COPD? *Clinical nutrition.* 2011;30(3):332-8.

- 62** Kanner RE, Connett JE, Altose MD, Buist AS, Lee WW, Tashkin DP, et al. Gender difference in airway hyperresponsiveness in smokers with mild COPD. The Lung Health Study. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1994;150(4):956-61.
- 63** Manfreda J, Sears MR, Becklake MR, Chan-Yeung M, Dimich-Ward H, Siersted HC, et al. Geographic and gender variability in the prevalence of bronchial responsiveness in Canada. *Chest*. 2004;125(5):1657-64.
- 64** Kelly RW, Illingworth P, Baldie G, Leask R, Brouwer S, Calder AA. Progesterone control of interleukin-8 production in endometrium and chorio-decidual cells underlines the role of the neutrophil in menstruation and parturition. *Human reproduction*. 1994;9(2):253-8.
- 65** Piccinni MP, Giudizi MG, Biagiotti R, Beloni L, Giannarini L, Sampognaro S, et al. Progesterone favors the development of human T helper cells producing Th2-type cytokines and promotes both IL-4 production and membrane CD30 expression in established Th1 cell clones. *Journal of immunology*. 1995;155(1):128-33.
- 66** Schols AM, Wouters EF. Nutritional abnormalities and supplementation in chronic obstructive pulmonary disease. *Clinics in chest medicine*. 2000;21(4):753-62.
- 67** Creutzberg EC, Schols AM, Bothmer-Quaedvlieg FC, Wouters EF. Prevalence of an elevated resting energy expenditure in patients with chronic obstructive pulmonary disease in relation to body composition and lung function. *European journal of clinical nutrition*. 1998;52(6):396-401.
- 68** Vermeeren MA, Creutzberg EC, Schols AM, Postma DS, Pieters WR, Roldaan AC, et al. Prevalence of nutritional depletion in a large out-patient population of patients with COPD. *Respiratory medicine*. 2006;100(8):1349-55.
- 69** Coronel C, Orozco-Levi M, Ramirez-Sarmiento A, Martinez-Llorens J, Broquetas J, Gea J. [Low-weight syndrome associated with COPD in our setting]. *Archivos de bronconeumologia*. 2002;38(12):580-4.
- 70** Gea J, Martinez-Llorens J, Barreiro E. [Nutritional abnormalities in chronic obstructive pulmonary disease]. *Medicina clinica*. 2014;143(2):78-84.

- 71** Agusti AG. Systemic effects of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc.* 2005;2(4):367-70; discussion 71-2.
- 72** Swallow EB, Reyes D, Hopkinson NS, Man WD, Porcher R, Cetti EJ, et al. Quadriceps strength predicts mortality in patients with moderate to severe chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax.* 2007;62(2):115-20.
- 73** Schols AM, Slangen J, Volovics L, Wouters EF. Weight loss is a reversible factor in the prognosis of chronic obstructive pulmonary disease. *American journal of respiratory and critical care medicine.* 1998;157(6 Pt 1):1791-7.
- 74** Engelen MP, Schols AM, Lamers RJ, Wouters EF. Different patterns of chronic tissue wasting among patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Clinical nutrition.* 1999;18(5):275-80.
- 75** Casanova Macario C, de Torres Tajés JP, Palmero MA. [COPD disease and malnutrition]. *Archivos de bronconeumología.* 2009;45 Suppl 4:31-5.
- 76** King DA, Cordova F, Scharf SM. Nutritional aspects of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc.* 2008;5(4):519-23.
- 77** Gea J, Agusti A, Roca J. Pathophysiology of muscle dysfunction in COPD. *Journal of applied physiology.* 2013;114(9):1222-34.
- 78** Laveneziana P, Palange P, Faculty ERSRS. Physical activity, nutritional status and systemic inflammation in COPD. *Eur Respir J.* 2012;40(3):522-9.
- 79** Ferreira IM, Brooks D, Lacasse Y, Goldstein RS, White J. Nutritional supplementation for stable chronic obstructive pulmonary disease. *The Cochrane database of systematic reviews.* 2005(2):CD000998.
- 80** Creutzberg EC, Casaburi R. Endocrinological disturbances in chronic obstructive pulmonary disease. *The European respiratory journal Supplement.* 2003;46:76s-80s.
- 81** Laghi F, Langbein WE, Antonescu-Turcu A, Jubran A, Bammert C, Tobin MJ. Respiratory and skeletal muscles in hypogonadal men with chronic obstructive pulmonary disease. *American journal of respiratory and critical care medicine.* 2005;171(6):598-605.

- 82** Barreiro E, Ferrer D, Sanchez F, Minguella J, Marin-Corral J, Martinez-Llorens J, et al. Inflammatory cells and apoptosis in respiratory and limb muscles of patients with COPD. *Journal of applied physiology*. 2011;111(3):808-17.
- 83** Di Francia M, Barbier D, Mege JL, Orehek J. Tumor necrosis factor-alpha levels and weight loss in chronic obstructive pulmonary disease. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1994;150(5 Pt 1):1453-5.
- 84** Schols AM, Buurman WA, Staal van den Brekel AJ, Dentener MA, Wouters EF. Evidence for a relation between metabolic derangements and increased levels of inflammatory mediators in a subgroup of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax*. 1996;51(8):819-24.
- 85** De Godoy I, Donahoe M, Calhoun WJ, Mancino J, Rogers RM. Elevated TNF-alpha production by peripheral blood monocytes of weight-losing COPD patients. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1996;153(2):633-7.
- 86** Raguso CA, Luthy C. Nutritional status in chronic obstructive pulmonary disease: role of hypoxia. *Nutrition*. 2011;27(2):138-43.
- 87** Fermoselle C, Sanchez F, Barreiro E. [Reduction of muscle mass mediated by myostatin in an experimental model of pulmonary emphysema]. *Archivos de bronconeumologia*. 2011;47(12):590-8.
- 88** Puig-Vilanova E, Rodriguez DA, Lloreta J, Ausin P, Pascual-Guardia S, Broquetas J, et al. Oxidative stress, redox signaling pathways, and autophagy in cachectic muscles of male patients with advanced COPD and lung cancer. *Free radical biology & medicine*. 2015;79:91-108.
- 89** Rehn TA, Munkvik M, Lunde PK, Sjaastad I, Sejersted OM. Intrinsic skeletal muscle alterations in chronic heart failure patients: a disease-specific myopathy or a result of deconditioning? *Heart failure reviews*. 2012;17(3):421-36.
- 90** Sun Z, Liu L, Liu N, Liu Y. Muscular response and adaptation to diabetes mellitus. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*. 2008;13:4765-94.
- 91** Morley JE. Sarcopenia in the elderly. *Family practice*. 2012;29 Suppl 1:i44-i8.

- 92** Amoroso P, Wilson SR, Moxham J, Ponte J. Acute effects of inhaled salbutamol on the metabolic rate of normal subjects. *Thorax*. 1993;48(9):882-5.
- 93** Fermoselle C, Rabinovich R, Ausin P, Puig-Vilanova E, Coronell C, Sanchez F, et al. Does oxidative stress modulate limb muscle atrophy in severe COPD patients? *Eur Respir J*. 2012;40(4):851-62.
- 94** Hussain SN, Sandri M. Role of autophagy in COPD skeletal muscle dysfunction. *Journal of applied physiology*. 2013;114(9):1273-81.
- 95** Engelen MP, Schols AM, Baken WC, Wesseling GJ, Wouters EF. Nutritional depletion in relation to respiratory and peripheral skeletal muscle function in out-patients with COPD. *Eur Respir J*. 1994;7(10):1793-7.
- 96** Schols AM, Soeters PB, Dingemans AM, Mostert R, Frantzen PJ, Wouters EF. Prevalence and characteristics of nutritional depletion in patients with stable COPD eligible for pulmonary rehabilitation. *Am Rev Respir Dis*. 1993;147(5):1151-6.
- 97** Yquel RJ, Tessonneau F, Poirier M, Moinard J, Pillet O, Manier G. Peak anaerobic power in patients with COPD: gender related differences. *European journal of applied physiology*. 2006;97(3):307-15.
- 98** Esteban C. [Role of physical activity in chronic obstructive pulmonary disease]. *Archivos de bronconeumologia*. 2009;45 Suppl 5:7-13.
- 99** Garcia-Aymerich J, Felez MA, Escarrabill J, Marrades RM, Morera J, Elosua R, et al. Physical activity and its determinants in severe chronic obstructive pulmonary disease. *Medicine and science in sports and exercise*. 2004;36(10):1667-73.
- 100** Pitta F, Troosters T, Spruit MA, Probst VS, Decramer M, Gosselink R. Characteristics of physical activities in daily life in chronic obstructive pulmonary disease. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2005;171(9):972-7.
- 101** Schonhofer B, Ardes P, Geibel M, Kohler D, Jones PW. Evaluation of a movement detector to measure daily activity in patients with chronic lung disease. *Eur Respir J*. 1997;10(12):2814-9.
- 102** Watz H, Waschki B, Meyer T, Magnussen H. Physical activity in patients with COPD. *Eur Respir J*. 2009;33(2):262-72.



- 103** Watz H, Waschki B, Boehme C, Claussen M, Meyer T, Magnussen H. Extrapulmonary effects of chronic obstructive pulmonary disease on physical activity: a cross-sectional study. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2008;177(7):743-51.
- 104** Pitta F, Troosters T, Probst VS, Spruit MA, Decramer M, Gosselink R. Physical activity and hospitalization for exacerbation of COPD. *Chest*. 2006;129(3):536-44.
- 105** Garcia-Aymerich J, Lange P, Benet M, Schnohr P, Anto JM. Regular physical activity reduces hospital admission and mortality in chronic obstructive pulmonary disease: a population based cohort study. *Thorax*. 2006;61(9):772-8.
- 106** Laboratories ATSCoPSfCPF. ATS statement: guidelines for the six-minute walk test. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2002;166(1):111-7.
- 107** Barreiro E, Bustamante V, Cejudo P, Galdiz JB, Gea J, de Lucas P, et al. Guidelines for the Evaluation and Treatment of Muscle Dysfunction in Patients With Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Archivos de bronconeumologia*. 2015;51(8):384-95.
- 108** Casas A, Vilaro J, Rabinovich R, Mayer A, Barbera JA, Rodriguez-Roisin R, et al. Encouraged 6-min walking test indicates maximum sustainable exercise in COPD patients. *Chest*. 2005;128(1):55-61.
- 109** Enright PL, Sherrill DL. Reference equations for the six-minute walk in healthy adults. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1998;158(5 Pt 1):1384-7.
- 110** Pinto-Plata VM, Cote C, Cabral H, Taylor J, Celli BR. The 6-min walk distance: change over time and value as a predictor of survival in severe COPD. *Eur Respir J*. 2004;23(1):28-33.
- 111** Cote CG, Casanova C, Marin JM, Lopez MV, Pinto-Plata V, de Oca MM, et al. Validation and comparison of reference equations for the 6-min walk distance test. *Eur Respir J*. 2008;31(3):571-8.
- 112** Spruit MA, Watkins ML, Edwards LD, Vestbo J, Calverley PM, Pinto-Plata V, et al. Determinants of poor 6-min walking distance in patients with COPD: the ECLIPSE cohort. *Respiratory medicine*. 2010;104(6):849-57.

- 113** Ribas J. [The applicability of stress tests in pneumology]. *Archivos de bronconeumología*. 2000;36(1):44-51.
- 114** Killian KJ, Leblanc P, Martin DH, Summers E, Jones NL, Campbell EJ. Exercise capacity and ventilatory, circulatory, and symptom limitation in patients with chronic airflow limitation. *Am Rev Respir Dis*. 1992;146(4):935-40.
- 115** Bernard S, LeBlanc P, Whittom F, Carrier G, Jobin J, Belleau R, et al. Peripheral muscle weakness in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1998;158(2):629-34.
- 116** Couillard A, Maltais F, Saey D, Debigare R, Michaud A, Koechlin C, et al. Exercise-induced quadriceps oxidative stress and peripheral muscle dysfunction in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2003;167(12):1664-9.
- 117** Saey D, Michaud A, Couillard A, Cote CH, Mador MJ, LeBlanc P, et al. Contractile fatigue, muscle morphometry, and blood lactate in chronic obstructive pulmonary disease. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2005;171(10):1109-15.
- 118** Saey D, Debigare R, LeBlanc P, Mador MJ, Cote CH, Jobin J, et al. Contractile leg fatigue after cycle exercise: a factor limiting exercise in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2003;168(4):425-30.
- 119** Barnes PJ, Chowdhury B, Kharitonov SA, Magnussen H, Page CP, Postma D, et al. Pulmonary biomarkers in chronic obstructive pulmonary disease. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2006;174(1):6-14.
- 120** Barnes PJ, Celli BR. Systemic manifestations and comorbidities of COPD. *Eur Respir J*. 2009;33(5):1165-85.
- 121** Dickens JA, Miller BE, Edwards LD, Silverman EK, Lomas DA, Tal-Singer R, et al. COPD association and repeatability of blood biomarkers in the ECLIPSE cohort. *Respir Res*. 2011;12:146.
- 122** Mineo D, Ambrogi V, Cufari ME, Gambardella S, Pignotti L, Pompeo E, et al. Variations of inflammatory mediators and alpha1-antitrypsin levels after lung volume reduction surgery for emphysema. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2010;181(8):806-14.

- 123** Pinto-Plata V, Toso J, Lee K, Park D, Bilello J, Mullerova H, et al. Profiling serum biomarkers in patients with COPD: associations with clinical parameters. *Thorax*. 2007;62(7):595-601.
- 124** Kessler R, Partridge MR, Miravittles M, Cazzola M, Vogelmeier C, Leynaud D, et al. Symptom variability in patients with severe COPD: a pan-European cross-sectional study. *Eur Respir J*. 2011;37(2):264-72.
- 125** Definition and classification of chronic bronchitis for clinical and epidemiological purposes. A report to the Medical Research Council by their Committee on the Aetiology of Chronic Bronchitis. *Lancet*. 1965;1(7389):775-9.
- 126** De Torres JP, Casanova C, Hernandez C, Abreu J, Aguirre-Jaime A, Celli BR. Gender and COPD in patients attending a pulmonary clinic. *Chest*. 2005;128(4):2012-6.
- 127** De Torres JP, Casanova C, Montejo de Garcini A, Aguirre-Jaime A, Celli BR. Gender and respiratory factors associated with dyspnea in chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Res*. 2007;8:18.
- 128** Hanania NA, Mullerova H, Locantore NW, Vestbo J, Watkins ML, Wouters EF, et al. Determinants of depression in the ECLIPSE chronic obstructive pulmonary disease cohort. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2011;183(5):604-11.
- 129** Watson L, Vestbo J, Postma DS, Decramer M, Rennard S, Kiri VA, et al. Gender differences in the management and experience of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Respiratory medicine*. 2004;98(12):1207-13.
- 130** Watson L, Vonk JM, Lofdahl CG, Pride NB, Pauwels RA, Laitinen LA, et al. Predictors of lung function and its decline in mild to moderate COPD in association with gender: results from the Euroscop study. *Respiratory medicine*. 2006;100(4):746-53.
- 131** Ancochea J, Miravittles M, Garcia-Rio F, Munoz L, Sanchez G, Sobradillo V, et al. Underdiagnosis of chronic obstructive pulmonary disease in women: quantification of the problem, determinants and proposed actions. *Archivos de bronconeumologia*. 2013;49(6):223-9.
- 132** De Torres JP, Casanova C, Pinto-Plata V, Varo N, Restituto P, Cordoba-Lanus E, et al. Gender differences in plasma biomarker levels in a cohort of COPD patients: a pilot study. *PloS one*. 2011;6(1):e16021.

- 133** Lopez Varela MV, Montes de Oca M, Halbert RJ, Muino A, Perez-Padilla R, Talamo C, et al. Sex-related differences in COPD in five Latin American cities: the PLATINO study. *Eur Respir J*. 2010;36(5):1034-41.
- 134** Mannino DM, Thorn D, Swensen A, Holguin F. Prevalence and outcomes of diabetes, hypertension and cardiovascular disease in COPD. *Eur Respir J*. 2008;32(4):962-9.
- 135** Sin DD, Wu L, Man SF. The relationship between reduced lung function and cardiovascular mortality: a population-based study and a systematic review of the literature. *Chest*. 2005;127(6):1952-9.
- 136** Rutten FH, Cramer MJ, Lammers JW, Grobbee DE, Hoes AW. Heart failure and chronic obstructive pulmonary disease: An ignored combination? *European journal of heart failure*. 2006;8(7):706-11.
- 137** Hawkins NM, Huang Z, Pieper KS, Solomon SD, Kober L, Velazquez EJ, et al. Chronic obstructive pulmonary disease is an independent predictor of death but not atherosclerotic events in patients with myocardial infarction: analysis of the Valsartan in Acute Myocardial Infarction Trial (VALIANT). *European journal of heart failure*. 2009;11(3):292-8.
- 138** Iversen KK, Kjaergaard J, Akkan D, Kober L, Torp-Pedersen C, Hassager C, et al. The prognostic importance of lung function in patients admitted with heart failure. *European journal of heart failure*. 2010;12(7):685-91.
- 139** Buch P, Friberg J, Scharling H, Lange P, Prescott E. Reduced lung function and risk of atrial fibrillation in the Copenhagen City Heart Study. *Eur Respir J*. 2003;21(6):1012-6.
- 140** Almagro P, Lopez Garcia F, Cabrera F, Montero L, Morchon D, Diez J, et al. Comorbidity and gender-related differences in patients hospitalized for COPD. The ECCO study. *Respiratory medicine*. 2010;104(2):253-9.
- 141** Ekstrom MP, Jogreus C, Strom KE. Comorbidity and sex-related differences in mortality in oxygen-dependent chronic obstructive pulmonary disease. *PLoS one*. 2012;7(4):e35806.
- 142** Fabbri LM, Luppi F, Beghe B, Rabe KF. Complex chronic comorbidities of COPD. *Eur Respir J*. 2008;31(1):204-12.

- 143** Jorgensen NR, Schwarz P. Osteoporosis in chronic obstructive pulmonary disease patients. *Current opinion in pulmonary medicine*. 2008;14(2):122-7.
- 144** Calverley PM, Anderson JA, Celli B, Ferguson GT, Jenkins C, Jones PW, et al. Salmeterol and fluticasone propionate and survival in chronic obstructive pulmonary disease. *The New England journal of medicine*. 2007;356(8):775-89.
- 145** Vrieze A, de Greef MH, Wijkstra PJ, Wempe JB. Low bone mineral density in COPD patients related to worse lung function, low weight and decreased fat-free mass. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*. 2007;18(9):1197-202.
- 146** Jorgensen NR, Schwarz P, Holme I, Henriksen BM, Petersen LJ, Backer V. The prevalence of osteoporosis in patients with chronic obstructive pulmonary disease: a cross sectional study. *Respiratory medicine*. 2007;101(1):177-85.
- 147** Van Ede L, Yzermans CJ, Brouwer HJ. Prevalence of depression in patients with chronic obstructive pulmonary disease: a systematic review. *Thorax*. 1999;54(8):688-92.
- 148** Hill K, Geist R, Goldstein RS, Lacasse Y. Anxiety and depression in end-stage COPD. *Eur Respir J*. 2008;31(3):667-77.
- 149** Anthonisen NR, Connett JE, Enright PL, Manfreda J, Lung Health Study Research G. Hospitalizations and mortality in the Lung Health Study. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2002;166(3):333-9.
- 150** Maurer J, Rebbapragada V, Borson S, Goldstein R, Kunik ME, Yohannes AM, et al. Anxiety and depression in COPD: current understanding, unanswered questions, and research needs. *Chest*. 2008;134(4 Suppl):43S-56S.
- 151** Eisner MD, Blanc PD, Yelin EH, Katz PP, Sanchez G, Iribarren C, et al. Influence of anxiety on health outcomes in COPD. *Thorax*. 2010;65(3):229-34.
- 152** Ng TP, Niti M, Tan WC, Cao Z, Ong KC, Eng P. Depressive symptoms and chronic obstructive pulmonary disease: effect on mortality, hospital readmission, symptom burden, functional status, and quality of life. *Archives of internal medicine*. 2007;167(1):60-7.

- 153** Paz-Díaz H, Montes de Oca M, Lopez JM, Celli BR. Pulmonary rehabilitation improves depression, anxiety, dyspnea and health status in patients with COPD. *American journal of physical medicine & rehabilitation / Association of Academic Physiatrists*. 2007;86(1):30-6.
- 154** Di Marco F, Verga M, Reggente M, Maria Casanova F, Santus P, Blasi F, et al. Anxiety and depression in COPD patients: The roles of gender and disease severity. *Respiratory medicine*. 2006;100(10):1767-74.
- 155** Wasswa-Kintu S, Gan WQ, Man SF, Pare PD, Sin DD. Relationship between reduced forced expiratory volume in one second and the risk of lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *Thorax*. 2005;60(7):570-5.
- 156** Turner MC, Chen Y, Krewski D, Calle EE, Thun MJ. Chronic obstructive pulmonary disease is associated with lung cancer mortality in a prospective study of never smokers. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2007;176(3):285-90.
- 157** Zhang H. Molecular signaling and genetic pathways of senescence: Its role in tumorigenesis and aging. *Journal of cellular physiology*. 2007;210(3):567-74.
- 158** Lin WW, Karin M. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *The Journal of clinical investigation*. 2007;117(5):1175-83.
- 159** Ben-Zaken Cohen S, Pare PD, Man SF, Sin DD. The growing burden of chronic obstructive pulmonary disease and lung cancer in women: examining sex differences in cigarette smoke metabolism. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2007;176(2):113-20.
- 160** Song Y, Klevak A, Manson JE, Buring JE, Liu S. Asthma, chronic obstructive pulmonary disease, and type 2 diabetes in the Women's Health Study. *Diabetes research and clinical practice*. 2010;90(3):365-71.
- 161** Spranger J, Kroke A, Mohlig M, Hoffmann K, Bergmann MM, Ristow M, et al. Inflammatory cytokines and the risk to develop type 2 diabetes: results of the prospective population-based European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam Study. *Diabetes*. 2003;52(3):812-7.
- 162** Ndumele CE, Pradhan AD, Ridker PM. Interrelationships between inflammation, C-reactive protein, and insulin resistance. *Journal of the cardiometabolic syndrome*. 2006;1(3):190-6.

- 163** Gosselink R, Troosters T, Decramer M. Peripheral muscle weakness contributes to exercise limitation in COPD. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1996;153(3):976-80.
- 164** Seymour JM, Spruit MA, Hopkinson NS, Natanek SA, Man WD, Jackson A, et al. The prevalence of quadriceps weakness in COPD and the relationship with disease severity. *Eur Respir J*. 2010;36(1):81-8.
- 165** Gea J, Barreiro E. [Update on the mechanisms of muscle dysfunction in COPD]. *Archivos de bronconeumologia*. 2008;44(6):328-37.
- 166** Donaldson AV, Maddocks M, Martolini D, Polkey MI, Man WD. Muscle function in COPD: a complex interplay. *International journal of chronic obstructive pulmonary disease*. 2012;7:523-35.
- 167** Janssens W, Bouillon R, Claes B, Carremans C, Lehouck A, Buyschaert I, et al. Vitamin D deficiency is highly prevalent in COPD and correlates with variants in the vitamin D-binding gene. *Thorax*. 2010;65(3):215-20.
- 168** Ferrer M, Villasante C, Alonso J, Sobradillo V, Gabriel R, Vilagut G, et al. Interpretation of quality of life scores from the St George's Respiratory Questionnaire. *Eur Respir J*. 2002;19(3):405-13.
- 169** Eisner MD, Blanc PD, Omachi TA, Yelin EH, Sidney S, Katz PP, et al. Socioeconomic status, race and COPD health outcomes. *Journal of epidemiology and community health*. 2011;65(1):26-34.
- 170** Engstrom CP, Persson LO, Larsson S, Sullivan M. Health-related quality of life in COPD: why both disease-specific and generic measures should be used. *Eur Respir J*. 2001;18(1):69-76.
- 171** Han MK, Curran-Everett D, Dransfield MT, Criner GJ, Zhang L, Murphy JR, et al. Racial differences in quality of life in patients with COPD. *Chest*. 2011;140(5):1169-76.
- 172** Stahl E, Lindberg A, Jansson SA, Ronmark E, Svensson K, Andersson F, et al. Health-related quality of life is related to COPD disease severity. *Health and quality of life outcomes*. 2005;3:56.

- 173** Anzueto A. Impact of exacerbations on COPD. *European respiratory review* : an official journal of the European Respiratory Society. 2010;19(116):113-8.
- 174** de Torres JP, Casanova C, Hernandez C, Abreu J, Montejo de Garcini A, Aguirre-Jaime A, et al. Gender associated differences in determinants of quality of life in patients with COPD: a case series study. *Health and quality of life outcomes*. 2006;4:72.
- 175** Aryal S, Diaz-Guzman E, Mannino DM. COPD and gender differences: an update. *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine*. 2013;162(4):208-18.
- 176** Han MK, Postma D, Mannino DM, Giardino ND, Buist S, Curtis JL, et al. Gender and chronic obstructive pulmonary disease: why it matters. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2007;176(12):1179-84.
- 177** Scanlon PD, Connett JE, Waller LA, Altose MD, Bailey WC, Buist AS, et al. Smoking cessation and lung function in mild-to-moderate chronic obstructive pulmonary disease. The Lung Health Study. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2000;161(2 Pt 1):381-90.
- 178** Johnson M, Rennard S. Alternative mechanisms for long-acting beta (2)-adrenergic agonists in COPD. *Chest*. 2001;120(1):258-70.
- 179** O'Donnell DE, Fluge T, Gerken F, Hamilton A, Webb K, Aguilaniu B, et al. Effects of tiotropium on lung hyperinflation, dyspnoea and exercise tolerance in COPD. *Eur Respir J*. 2004;23(6):832-40.
- 180** Vestbo J, Soriano JB, Anderson JA, Calverley P, Pauwels R, Jones P, et al. Gender does not influence the response to the combination of salmeterol and fluticasone propionate in COPD. *Respiratory medicine*. 2004;98(11):1045-50.
- 181** Miravittles M, Soler-Cataluna JJ, Calle M, Molina J, Almagro P, Quintano JA, et al. [Spanish COPD Guidelines (GesEPOC): Pharmacological treatment of stable COPD]. *Atencion primaria / Sociedad Espanola de Medicina de Familia y Comunitaria*. 2012;44(7):425-37.
- 182** Leuppi JD, Schuetz P, Bingisser R, Bodmer M, Briel M, Drescher T, et al. Short-term vs conventional glucocorticoid therapy in acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease: the REDUCE randomized clinical trial. *Jama*. 2013;309(21):2223-31.



- 183** Schermer TR, Hendriks AJ, Chavannes NH, Dekhuijzen PN, Wouters EF, van den Hoogen H, et al. Probability and determinants of relapse after discontinuation of inhaled corticosteroids in patients with COPD treated in general practice. *Primary care respiratory journal : journal of the General Practice Airways Group*. 2004;13(1):48-55.
- 184** Bolton CE, Bevan-Smith EF, Blakey JD, Crowe P, Elkin SL, Garrod R, et al. British Thoracic Society guideline on pulmonary rehabilitation in adults. *Thorax*. 2013;68 Suppl 2:ii1-30.
- 185** Spruit MA, Singh SJ, Garvey C, ZuWallack R, Nici L, Rochester C, et al. An official American Thoracic Society/European Respiratory Society statement: key concepts and advances in pulmonary rehabilitation. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2013;188(8):e13-64.
- 186** Ries AL, Bauldoff GS, Carlin BW, Casaburi R, Emery CF, Mahler DA, et al. Pulmonary Rehabilitation: Joint ACCP/AACVPR Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. *Chest*. 2007;131(5 Suppl):4S-42S.
- 187** Foy CG, Rejeski WJ, Berry MJ, Zaccaro D, Woodard CM. Gender moderates the effects of exercise therapy on health-related quality of life among COPD patients. *Chest*. 2001;119(1):70-6.
- 188** Haggerty MC, Stockdale-Woolley R, ZuWallack R. Functional status in pulmonary rehabilitation participants. *Journal of cardiopulmonary rehabilitation*. 1999;19(1):35-42.
- 189** Long term domiciliary oxygen therapy in chronic hypoxic cor pulmonale complicating chronic bronchitis and emphysema. Report of the Medical Research Council Working Party. *Lancet*. 1981;1(8222):681-6.
- 190** Cukier A, Ferreira CA, Stelmach R, Ribeiro M, Cortopassi F, Calverley PM. The effect of bronchodilators and oxygen alone and in combination on self-paced exercise performance in stable COPD. *Respiratory medicine*. 2007;101(4):746-53.
- 191** Bradley JM, Lasserson T, Elborn S, Macmahon J, O'Neill B. A systematic review of randomized controlled trials examining the short-term benefit of ambulatory oxygen in COPD. *Chest*. 2007;131(1):278-85.

- 192** Eaton T, Garrett JE, Young P, Fergusson W, Kolbe J, Rudkin S, et al. Ambulatory oxygen improves quality of life of COPD patients: a randomised controlled study. *Eur Respir J*. 2002;20(2):306-12.
- 193** Stoller JK, Panos RJ, Krachman S, Doherty DE, Make B, Long-term Oxygen Treatment Trial Research G. Oxygen therapy for patients with COPD: current evidence and the long-term oxygen treatment trial. *Chest*. 2010;138(1):179-87.
- 194** Lacasse Y, Series F, Vujovic-Zotovic N, Goldstein R, Bourbeau J, Lecours R, et al. Evaluating nocturnal oxygen desaturation in COPD--revised. *Respiratory medicine*. 2011;105(9):1331-7.
- 195** Crockett AJ, Cranston JM, Moss JR, Alpers JH. Survival on long-term oxygen therapy in chronic airflow limitation: from evidence to outcomes in the routine clinical setting. *Internal medicine journal*. 2001;31(8):448-54.
- 196** Fabbri LM, Rabe KF. From COPD to chronic systemic inflammatory syndrome? *Lancet*. 2007;370(9589):797-9.
- 197** Sinden NJ, Stockley RA. Systemic inflammation and comorbidity in COPD: a result of 'overspill' of inflammatory mediators from the lungs? Review of the evidence. *Thorax*. 2010;65(10):930-6.
- 198** Gan WQ, Man SF, Senthilselvan A, Sin DD. Association between chronic obstructive pulmonary disease and systemic inflammation: a systematic review and a meta-analysis. *Thorax*. 2004;59(7):574-80.
- 199** Pinto-Plata V, Casanova C, Mullerova H, de Torres JP, Corado H, Varo N, et al. Inflammatory and repair serum biomarker pattern: association to clinical outcomes in COPD. *Respir Res*. 2012;13:71.
- 200** Pratico D, Basili S, Vieri M, Cordova C, Violi F, Fitzgerald GA. Chronic obstructive pulmonary disease is associated with an increase in urinary levels of isoprostane F2alpha-III, an index of oxidant stress. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1998;158(6):1709-14.
- 201** Rahman I, Morrison D, Donaldson K, MacNee W. Systemic oxidative stress in asthma, COPD, and smokers. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1996;154(4 Pt 1):1055-60.

- 202** Hurst JR, Donaldson GC, Perera WR, Wilkinson TM, Bilello JA, Hagan GW, et al. Use of plasma biomarkers at exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2006;174(8):867-74.
- 203** Perera WR, Hurst JR, Wilkinson TM, Sapsford RJ, Mullerova H, Donaldson GC, et al. Inflammatory changes, recovery and recurrence at COPD exacerbation. *Eur Respir J*. 2007;29(3):527-34.
- 204** Seemungal T, Harper-Owen R, Bhowmik A, Moric I, Sanderson G, Message S, et al. Respiratory viruses, symptoms, and inflammatory markers in acute exacerbations and stable chronic obstructive pulmonary disease. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2001;164(9):1618-23.
- 205** Dahl M, Tybjaerg-Hansen A, Vestbo J, Lange P, Nordestgaard BG. Elevated plasma fibrinogen associated with reduced pulmonary function and increased risk of chronic obstructive pulmonary disease. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2001;164(6):1008-11.
- 206** Dahl M, Vestbo J, Lange P, Bojesen SE, Tybjaerg-Hansen A, Nordestgaard BG. C-reactive protein as a predictor of prognosis in chronic obstructive pulmonary disease. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2007;175(3):250-5.
- 207** Engstrom G, Segelstorm N, Ekberg-Aronsson M, Nilsson PM, Lindgarde F, Lofdahl CG. Plasma markers of inflammation and incidence of hospitalisations for COPD: results from a population-based cohort study. *Thorax*. 2009;64(3):211-5.
- 208** Bolton CE, Stone MD, Edwards PH, Duckers JM, Evans WD, Shale DJ. Circulating matrix metalloproteinase-9 and osteoporosis in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Chronic respiratory disease*. 2009;6(2):81-7.
- 209** Olafsdottir IS, Janson C, Lind L, Hulthe J, Gunnbjornsdottir M, Sundstrom J. Serum levels of matrix metalloproteinase-9, tissue inhibitors of metalloproteinase-1 and their ratio are associated with impaired lung function in the elderly: a population-based study. *Respirology*. 2010;15(3):530-5.
- 210** Higashimoto Y, Iwata T, Okada M, Satoh H, Fukuda K, Tohda Y. Serum biomarkers as predictors of lung function decline in chronic obstructive pulmonary disease. *Respiratory medicine*. 2009;103(8):1231-8.

- 211** Higashimoto Y, Yamagata Y, Iwata T, Okada M, Ishiguchi T, Sato H, et al. Increased serum concentrations of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in COPD patients. *Eur Respir J*. 2005;25(5):885-90.
- 212** Pinto-Plata VM, Livnat G, Girish M, Cabral H, Masdin P, Linacre P, et al. Systemic cytokines, clinical and physiological changes in patients hospitalized for exacerbation of COPD. *Chest*. 2007;131(1):37-43.
- 213** Wouters EF, Groenewegen KH, Dentener MA, Vernooy JH. Systemic inflammation in chronic obstructive pulmonary disease: the role of exacerbations. *Proc Am Thorac Soc*. 2007;4(8):626-34.
- 214** Masaki T, Chiba S, Tatsukawa H, Yasuda T, Noguchi H, Seike M, et al. Adiponectin protects LPS-induced liver injury through modulation of TNF-alpha in KK-Ay obese mice. *Hepatology*. 2004;40(1):177-84.
- 215** Wolf AM, Wolf D, Rumpold H, Enrich B, Tilg H. Adiponectin induces the anti-inflammatory cytokines IL-10 and IL-1RA in human leukocytes. *Biochemical and biophysical research communications*. 2004;323(2):630-5.
- 216** Eagan TM, Gabazza EC, D'Alessandro-Gabazza C, Gil-Bernabe P, Aoki S, Hardie JA, et al. TNF-alpha is associated with loss of lean body mass only in already cachectic COPD patients. *Respir Res*. 2012;13:48.
- 217** Gooptu B, Lomas DA. Polymers and inflammation: disease mechanisms of the serpinopathies. *The Journal of experimental medicine*. 2008;205(7):1529-34.
- 218** Ning W, Li CJ, Kaminski N, Feghali-Bostwick CA, Alber SM, Di YP, et al. Comprehensive gene expression profiles reveal pathways related to the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101(41):14895-900.
- 219** Cordoba-Lanus E, de-Torres JP, Lopez-Aguilar C, Rodriguez-Perez MC, Maca-Meyer N, Montejo-de-Garcini A, et al. Association of IL-6 gene polymorphisms and COPD in a Spanish population. *Respiratory medicine*. 2008;102(12):1805-11.
- 220** He JQ, Foreman MG, Shumansky K, Zhang X, Akhbar L, Sin DD, et al. Associations of IL6 polymorphisms with lung function decline and COPD. *Thorax*. 2009;64(8):698-704.

- 221** Yanbaeva DG, Dentener MA, Spruit MA, Houwing-Duistermaat JJ, Kotz D, Passos VL, et al. IL6 and CRP haplotypes are associated with COPD risk and systemic inflammation: a case-control study. *BMC medical genetics*. 2009;10:23.
- 222** Gingo MR, Silveira LJ, Miller YE, Friedlander AL, Cosgrove GP, Chan ED, et al. Tumour necrosis factor gene polymorphisms are associated with COPD. *Eur Respir J*. 2008;31(5):1005-12.
- 223** Smolonska J, Wijmenga C, Postma DS, Boezen HM. Meta-analyses on suspected chronic obstructive pulmonary disease genes: a summary of 20 years' research. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2009;180(7):618-31.
- 224** Yuan Y, Jiang H, Kuang J, Hou X, Feng Y, Su Z. Genetic variations in ADIPOQ gene are associated with chronic obstructive pulmonary disease. *PloS one*. 2012;7(11):e50848.
- 225** Bentzinger CF, Wang YX, Rudnicki MA. Building muscle: molecular regulation of myogenesis. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2012;4(2).
- 226** Ennion S, Sant'ana Pereira J, Sargeant AJ, Young A, Goldspink G. Characterization of human skeletal muscle fibres according to the myosin heavy chains they express. *Journal of muscle research and cell motility*. 1995;16(1):35-43.
- 227** Lowry CV, Kimmey JS, Felder S, Chi MM, Kaiser KK, Passonneau PN, et al. Enzyme patterns in single human muscle fibers. *The Journal of biological chemistry*. 1978;253(22):8269-77.
- 228** Schiaffino S, Reggiani C. Fiber types in mammalian skeletal muscles. *Physiological reviews*. 2011;91(4):1447-531.
- 229** Reid WD, MacGowan NA. Respiratory muscle injury in animal models and humans. *Molecular and cellular biochemistry*. 1998;179(1-2):63-80.
- 230** Clarke MS, Bamman MM, Feedback DL. Bed rest decreases mechanically induced myofiber wounding and consequent wound-mediated FGF release. *Journal of applied physiology*. 1998;85(2):593-600.
- 231** Velders M, Diel P. How sex hormones promote skeletal muscle regeneration. *Sports medicine*. 2013;43(11):1089-100.

- 232** Belcastro AN, Shewchuk LD, Raj DA. Exercise-induced muscle injury: a calpain hypothesis. *Molecular and cellular biochemistry*. 1998;179(1-2):135-45.
- 233** Lieber RL, Friden J. Selective damage of fast glycolytic muscle fibres with eccentric contraction of the rabbit tibialis anterior. *Acta physiologica Scandinavica*. 1988;133(4):587-8.
- 234** Zhu E, Petrof BJ, Gea J, Comtois N, Grassino AE. Diaphragm muscle fiber injury after inspiratory resistive breathing. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1997;155(3):1110-6.
- 235** Macgowan NA, Evans KG, Road JD, Reid WD. Diaphragm injury in individuals with airflow obstruction. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2001;163(7):1654-9.
- 236** Lindsay DC, Lovegrove CA, Dunn MJ, Bennett JG, Pepper JR, Yacoub MH, et al. Histological abnormalities of muscle from limb, thorax and diaphragm in chronic heart failure. *European heart journal*. 1996;17(8):1239-50.
- 237** Orozco-Levi M, Coronell C, Ramirez-Sarmiento A, Lloreta J, Martinez-Llorens J, Galdiz JB, et al. Injury of peripheral muscles in smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *Ultrastructural pathology*. 2012;36(4):228-38.
- 238** Maltais F, Decramer M, Casaburi R, Barreiro E, Burelle Y, Debigare R, et al. An official american thoracic society/european respiratory society statement: update on limb muscle dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2014;189(9):e15-62.
- 239** Reid MB, Lannergren J, Westerblad H. Respiratory and limb muscle weakness induced by tumor necrosis factor-alpha: involvement of muscle myofilaments. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2002;166(4):479-84.
- 240** Barreiro E, Schols AM, Polkey MI, Galdiz JB, Gosker HR, Swallow EB, et al. Cytokine profile in quadriceps muscles of patients with severe COPD. *Thorax*. 2008;63(2):100-7.
- 241** Casadevall C, Coronell C, Ramirez-Sarmiento AL, Martinez-Llorens J, Barreiro E, Orozco-Levi M, et al. Upregulation of pro-inflammatory cytokines in the intercostal muscles of COPD patients. *Eur Respir J*. 2007;30(4):701-7.

- 242** Gea J, Martinez-Llorens J, Ausin P. [Skeletal muscle dysfunction in COPD]. *Archivos de bronconeumologia*. 2009;45 Suppl 4:36-41.
- 243** Jackson MJ, O'Farrell S. Free radicals and muscle damage. *British medical bulletin*. 1993;49(3):630-41.
- 244** Remels AH, Gosker HR, Langen RC, Schols AM. The mechanisms of cachexia underlying muscle dysfunction in COPD. *Journal of applied physiology*. 2013;114(9):1253-62.
- 245** Bloomfield SA. Changes in musculoskeletal structure and function with prolonged bed rest. *Medicine and science in sports and exercise*. 1997;29(2):197-206.
- 246** Maltais F, LeBlanc P, Simard C, Jobin J, Berube C, Bruneau J, et al. Skeletal muscle adaptation to endurance training in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1996;154(2 Pt 1):442-7.
- 247** Sala E, Roca J, Marrades RM, Alonso J, Gonzalez De Suso JM, Moreno A, et al. Effects of endurance training on skeletal muscle bioenergetics in chronic obstructive pulmonary disease. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1999;159(6):1726-34.
- 248** Brunelle JK, Chandel NS. Oxygen deprivation induced cell death: an update. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*. 2002;7(6):475-82.
- 249** Gonzalez NC, Wood JG. Alveolar hypoxia-induced systemic inflammation: what low PO<sub>2</sub> does and does not do. *Advances in experimental medicine and biology*. 2010;662:27-32.
- 250** Kulisz A, Chen N, Chandel NS, Shao Z, Schumacker PT. Mitochondrial ROS initiate phosphorylation of p38 MAP kinase during hypoxia in cardiomyocytes. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2002;282(6):L1324-9.
- 251** Yun Z, Lin Q, Giaccia AJ. Adaptive myogenesis under hypoxia. *Molecular and cellular biology*. 2005;25(8):3040-55.

- 252** Rafferty GF, Lou Harris M, Polkey MI, Greenough A, Moxham J. Effect of hypercapnia on maximal voluntary ventilation and diaphragm fatigue in normal humans. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1999;160(5 Pt 1):1567-71.
- 253** England BK, Chastain JL, Mitch WE. Abnormalities in protein synthesis and degradation induced by extracellular pH in BC3H1 myocytes. *The American journal of physiology*. 1991;260(2 Pt 1):C277-82.
- 254** Barreiro E, Gea J. Respiratory and Limb Muscle Dysfunction in COPD. *Copd*. 2015;12(4):413-26.
- 255** Guo Y, Gosker HR, Schols AM, Kapchinsky S, Bourbeau J, Sandri M, et al. Autophagy in locomotor muscles of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2013;188(11):1313-20.
- 256** Barreiro E, Peinado VI, Galdiz JB, Ferrer E, Marin-Corral J, Sanchez F, et al. Cigarette smoke-induced oxidative stress: A role in chronic obstructive pulmonary disease skeletal muscle dysfunction. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2010;182(4):477-88.
- 257** Man WD, Kemp P, Moxham J, Polkey MI. Skeletal muscle dysfunction in COPD: clinical and laboratory observations. *Clinical science*. 2009;117(7):251-64.
- 258** Vilaro J, Ramirez-Sarmiento A, Martinez-Llorens JM, Mendoza T, Alvarez M, Sanchez-Cayado N, et al. Global muscle dysfunction as a risk factor of readmission to hospital due to COPD exacerbations. *Respiratory medicine*. 2010;104(12):1896-902.
- 259** Fischer BM, Voynow JA, Ghio AJ. COPD: balancing oxidants and antioxidants. *International journal of chronic obstructive pulmonary disease*. 2015;10:261-76.
- 260** Tsiligianni IG, van der Molen T. A systematic review of the role of vitamin insufficiencies and supplementation in COPD. *Respir Res*. 2010;11:171.
- 261** Jackson AS, Shrikrishna D, Kelly JL, Kemp SV, Hart N, Moxham J, et al. Vitamin D and skeletal muscle strength and endurance in COPD. *Eur Respir J*. 2013;41(2):309-16.
- 262** De Batlle J, Romieu I, Anto JM, Mendez M, Rodriguez E, Balcells E, et al. Dietary habits of firstly admitted Spanish COPD patients. *Respiratory medicine*. 2009;103(12):1904-10.



- 263** Donaldson GC, Wilkinson TM, Hurst JR, Perera WR, Wedzicha JA. Exacerbations and time spent outdoors in chronic obstructive pulmonary disease. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2005;171(5):446-52.
- 264** Wagatsuma A, Sakuma K. Vitamin D signaling in myogenesis: potential for treatment of sarcopenia. *BioMed research international*. 2014;2014:121254.
- 265** Yoshikawa S, Nakamura T, Tanabe H, Imamura T. Osteomalacic myopathy. *Endocrinologia japonica*. 1979;26(Suppl):65-72.
- 266** Sato Y, Iwamoto J, Kanoko T, Satoh K. Low-dose vitamin D prevents muscular atrophy and reduces falls and hip fractures in women after stroke: a randomized controlled trial. *Cerebrovascular diseases*. 2005;20(3):187-92.
- 267** Sorensen OH, Lund B, Saltin B, Lund B, Andersen RB, Hjorth L, et al. Myopathy in bone loss of ageing: improvement by treatment with 1 alpha-hydroxycholecalciferol and calcium. *Clinical science*. 1979;56(2):157-61.
- 268** Dhesi JK, Bearne LM, Moniz C, Hurley MV, Jackson SH, Swift CG, et al. Neuromuscular and psychomotor function in elderly subjects who fall and the relationship with vitamin D status. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2002;17(5):891-7.
- 269** Stewart JW, Alekel DL, Ritland LM, Van Loan M, Gertz E, Genschel U. Serum 25-hydroxyvitamin D is related to indicators of overall physical fitness in healthy postmenopausal women. *Menopause*. 2009;16(6):1093-101.
- 270** Zamboni M, Zoico E, Tosoni P, Zivelonghi A, Bortolani A, Maggi S, et al. Relation between vitamin D, physical performance, and disability in elderly persons. *The journals of gerontology Series A, Biological sciences and medical sciences*. 2002;57(1):M7-11.
- 271** Hornikx M, Van Remoortel H, Lehouck A, Mathieu C, Maes K, Gayan-Ramirez G, et al. Vitamin D supplementation during rehabilitation in COPD: a secondary analysis of a randomized trial. *Respir Res*. 2012;13:84.
- 272** 27 Similowski T, Yan S, Gauthier AP, Macklem PT, Bellemare F. Contractile properties of the human diaphragm during chronic hyperinflation. *The New England journal of medicine*. 1991;325(13):917-23.

- 273** Levine S, Kaiser L, Leferovich J, Tikunov B. Cellular adaptations in the diaphragm in chronic obstructive pulmonary disease. *The New England journal of medicine*. 1997;337(25):1799-806.
- 274** Orozco-Levi M, Gea J, Lloreta JL, Felez M, Minguella J, Serrano S, et al. Subcellular adaptation of the human diaphragm in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J*. 1999;13(2):371-8.
- 275** Ramirez-Sarmiento A, Orozco-Levi M, Barreiro E, Mendez R, Ferrer A, Broquetas J, et al. Expiratory muscle endurance in chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax*. 2002;57(2):132-6.
- 276** Coronell C, Orozco-Levi M, Mendez R, Ramirez-Sarmiento A, Galdiz JB, Gea J. Relevance of assessing quadriceps endurance in patients with COPD. *Eur Respir J*. 2004;24(1):129-36.
- 277** Agusti AG, Noguera A, Sauleda J, Sala E, Pons J, Busquets X. Systemic effects of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J*. 2003;21(2):347-60.
- 278** Hamilton AL, Killian KJ, Summers E, Jones NL. Muscle strength, symptom intensity, and exercise capacity in patients with cardiorespiratory disorders. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1995;152(6 Pt 1):2021-31.
- 279** Ramirez-Sarmiento A, Orozco-Levi M, Guell R, Barreiro E, Hernandez N, Mota S, et al. Inspiratory muscle training in patients with chronic obstructive pulmonary disease: structural adaptation and physiologic outcomes. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2002;166(11):1491-7.
- 280** Troosters T, Gosselink R, Janssens W, Decramer M. Exercise training and pulmonary rehabilitation: new insights and remaining challenges. *European respiratory review : an official journal of the European Respiratory Society*. 2010;19(115):24-9.
- 281** Rabinovich RA, Vilaro J. Structural and functional changes of peripheral muscles in chronic obstructive pulmonary disease patients. *Current opinion in pulmonary medicine*. 2010;16(2):123-33.
- 282** Serres I, Gautier V, Varray A, Prefaut C. Impaired skeletal muscle endurance related to physical inactivity and altered lung function in COPD patients. *Chest*. 1998;113(4):900-5.

- 283** Gosker HR, Zeegers MP, Wouters EF, Schols AM. Muscle fibre type shifting in the vastus lateralis of patients with COPD is associated with disease severity: a systematic review and meta-analysis. *Thorax*. 2007;62(11):944-9.
- 284** Whittom F, Jobin J, Simard PM, Leblanc P, Simard C, Bernard S, et al. Histochemical and morphological characteristics of the vastus lateralis muscle in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Medicine and science in sports and exercise*. 1998;30(10):1467-74.
- 285** Jakobsson P, Jorfeldt L, Brundin A. Skeletal muscle metabolites and fibre types in patients with advanced chronic obstructive pulmonary disease (COPD), with and without chronic respiratory failure. *Eur Respir J*. 1990;3(2):192-6.
- 286** Jobin J, Maltais F, Doyon JF, LeBlanc P, Simard PM, Simard AA, et al. Chronic obstructive pulmonary disease: capillarity and fiber-type characteristics of skeletal muscle. *Journal of cardiopulmonary rehabilitation*. 1998;18(6):432-7.
- 287** Eliason G, Abdel-Halim SM, Piehl-Aulin K, Kadi F. Alterations in the muscle-to-capillary interface in patients with different degrees of chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Res*. 2010;11:97.
- 288** Menon MK, Houchen L, Singh SJ, Morgan MD, Bradding P, Steiner MC. Inflammatory and satellite cells in the quadriceps of patients with COPD and response to resistance training. *Chest*. 2012;142(5):1134-42.
- 289** Montes de Oca M, Torres SH, De Sanctis J, Mata A, Hernandez N, Talamo C. Skeletal muscle inflammation and nitric oxide in patients with COPD. *Eur Respir J*. 2005;26(3):390-7.
- 290** Crul T, Spruit MA, Gayan-Ramirez G, Quarck R, Gosselink R, Troosters T, et al. Markers of inflammation and disuse in vastus lateralis of chronic obstructive pulmonary disease patients. *European journal of clinical investigation*. 2007;37(11):897-904.
- 291** Martinez-Llorens J, Casadevall C, Lloreta J, Orozco-Levi M, Barreiro E, Broquetas J, et al. [Activation of satellite cells in the intercostal muscles of patients with chronic obstructive pulmonary disease]. *Archivos de bronconeumologia*. 2008;44(5):239-44.
- 292** Theriault ME, Pare ME, Lemire BB, Maltais F, Debigare R. Regenerative defect in vastus lateralis muscle of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Res*. 2014;15:35.

- 293** Morrison WL, Gibson JN, Scrimgeour C, Rennie MJ. Muscle wasting in emphysema. *Clinical science*. 1988;75(4):415-20.
- 294** Engelen MP, Wouters EF, Deutz NE, Menheere PP, Schols AM. Factors contributing to alterations in skeletal muscle and plasma amino acid profiles in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *The American journal of clinical nutrition*. 2000;72(6):1480-7.
- 295** Yoneda T, Yoshikawa M, Fu A, Tsukaguchi K, Okamoto Y, Takenaka H. Plasma levels of amino acids and hypermetabolism in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Nutrition*. 2001;17(2):95-9.
- 296** Doucet M, Russell AP, Leger B, Debigare R, Joannisse DR, Caron MA, et al. Muscle atrophy and hypertrophy signaling in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2007;176(3):261-9.
- 297** Plant PJ, Brooks D, Faughnan M, Bayley T, Bain J, Singer L, et al. Cellular markers of muscle atrophy in chronic obstructive pulmonary disease. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2010;42(4):461-71.
- 298** Barreiro E, de la Puente B, Minguella J, Corominas JM, Serrano S, Hussain SN, et al. Oxidative stress and respiratory muscle dysfunction in severe chronic obstructive pulmonary disease. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2005;171(10):1116-24.
- 299** Barreiro E, Gea J, Corominas JM, Hussain SN. Nitric oxide synthases and protein oxidation in the quadriceps femoris of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2003;29(6):771-8.
- 300** Natanek SA, Gosker HR, Slot IG, Marsh GS, Hopkinson NS, Moxham J, et al. Pathways associated with reduced quadriceps oxidative fibres and endurance in COPD. *Eur Respir J*. 2013;41(6):1275-83.
- 301** Puig-Vilanova E, Ausin P, Martinez-Llorens J, Gea J, Barreiro E. Do epigenetic events take place in the vastus lateralis of patients with mild chronic obstructive pulmonary disease? *PloS one*. 2014;9(7):e102296.
- 302** Puig-Vilanova E, Martinez-Llorens J, Ausin P, Roca J, Gea J, Barreiro E. Quadriceps muscle weakness and atrophy are associated with a differential epigenetic profile in advanced COPD. *Clinical science*. 2015;128(12):905-21.

- 303** Sjogaard G. Capillary supply and cross-sectional area of slow and fast twitch muscle fibres in man. *Histochemistry*. 1982;76(4):547-55.
- 304** Staron RS, Hagerman FC, Hikida RS, Murray TF, Hostler DP, Crill MT, et al. Fiber type composition of the vastus lateralis muscle of young men and women. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*. 2000;48(5):623-9.
- 305** Essen-Gustavsson B, Borges O. Histochemical and metabolic characteristics of human skeletal muscle in relation to age. *Acta physiologica Scandinavica*. 1986;126(1):107-14.
- 306** Simoneau JA, Bouchard C. Human variation in skeletal muscle fiber-type proportion and enzyme activities. *The American journal of physiology*. 1989;257(4 Pt 1):E567-72.
- 307** Frontera WR, Suh D, Krivickas LS, Hughes VA, Goldstein R, Roubenoff R. Skeletal muscle fiber quality in older men and women. *American journal of physiology Cell physiology*. 2000;279(3):C611-8.
- 308** Torres SH, Montes de Oca M, Loeb E, Mata A, Hernandez N. Gender and skeletal muscle characteristics in subjects with chronic obstructive pulmonary disease. *Respiratory medicine*. 2011;105(1):88-94.
- 309** Saltin B, Henriksson J, Nygaard E, Andersen P, Jansson E. Fiber types and metabolic potentials of skeletal muscles in sedentary man and endurance runners. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1977;301:3-29.
- 310** Luna-Heredia E, Martin-Pena G, Ruiz-Galiana J. Handgrip dynamometry in healthy adults. *Clinical nutrition*. 2005;24(2):250-8.
- 311** Puhan MA, Siebeling L, Zoller M, Muggensturm P, ter Riet G. Simple functional performance tests and mortality in COPD. *Eur Respir J*. 2013;42(4):956-63.
- 312** Stevens JE, Binder-Macleod S, Snyder-Mackler L. Characterization of the human quadriceps muscle in active elders. *Archives of physical medicine and rehabilitation*. 2001;82(7):973-8.

- 313** Hopkinson NS, Eleftheriou KI, Payne J, Nickol AH, Hawe E, Moxham J, et al. +9/+9 Homozygosity of the bradykinin receptor gene polymorphism is associated with reduced fat-free mass in chronic obstructive pulmonary disease. *The American journal of clinical nutrition*. 2006;83(4):912-7.
- 314** World Medical Association General A. World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. *Journal international de bioethique = International journal of bioethics*. 2004;15(1):124-9.
- 315** Garcia-Rio F, Calle M, Burgos F, Casan P, Del Campo F, Galdiz JB, et al. Spirometry. Spanish Society of Pulmonology and Thoracic Surgery (SEPAR). *Archivos de bronconeumologia*. 2013;49(9):388-401.
- 316** Roca J, Burgos F, Barbera JA, Sunyer J, Rodriguez-Roisin R, Castellsague J, et al. Prediction equations for plethysmographic lung volumes. *Respiratory medicine*. 1998;92(3):454-60.
- 317** Roca J, Rodriguez-Roisin R, Cobo E, Burgos F, Perez J, Clausen JL. Single-breath carbon monoxide diffusing capacity prediction equations from a Mediterranean population. *Am Rev Respir Dis*. 1990;141(4 Pt 1):1026-32.
- 318** Roca J, Sanchis J, Agusti-Vidal A, Segarra F, Navajas D, Rodriguez-Roisin R, et al. Spirometric reference values from a Mediterranean population. *Bull Eur Physiopathol Respir*. 1986;22(3):217-24.
- 319** Donaire-Gonzalez D, Gimeno-Santos E, Balcells E, Rodriguez DA, Farrero E, Batlle JD, et al. Physical activity in COPD patients: patterns and bouts. *Eur Respir J*. 2012.
- 320** Meguro M, Barley EA, Spencer S, Jones PW. Development and Validation of an Improved, COPD-Specific Version of the St. George Respiratory Questionnaire. *Chest*. 2007;132(2):456-63.
- 321** Barreiro E, Gea J, Matar G, Hussain SN. Expression and carbonylation of creatine kinase in the quadriceps femoris muscles of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2005;33(6):636-42.
- 322** Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C (T)) Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.

- 323** Barreiro E, Schols AM, Polkey MI, Galdiz JB, Gosker HR, Swallow EB, et al. Cytokine profile in quadriceps muscles of patients with severe COPD. *Thorax*. 2008;63(2):100-7.
- 324** Arismendi E, Rivas E, Vidal J, Barreiro E, Torralba Y, Burgos F, et al. Airway Hyperresponsiveness to Mannitol in Obesity Before and After Bariatric Surgery. *Obesity surgery*. 2015;25(9):1666-71.
- 325** Soriano JB, Miravittles M, Borderias L, Duran-Tauleria E, Garcia Rio F, Martinez J, et al. [Geographical variations in the prevalence of COPD in Spain: relationship to smoking, death rates and other determining factors]. *Archivos de bronconeumologia*. 2010;46(10):522-30.
- 326** Vestbo J, Prescott E, Almdal T, Dahl M, Nordestgaard BG, Andersen T, et al. Body mass, fat-free body mass, and prognosis in patients with chronic obstructive pulmonary disease from a random population sample: findings from the Copenhagen City Heart Study. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2006;173(1):79-83.
- 327** Ferrari R, Tanni SE, Caram LM, Correa C, Correa CR, Godoy I. Three-year follow-up of Interleukin 6 and C-reactive protein in chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Res*. 2013;14:24.
- 328** Agusti A, Edwards LD, Rennard SI, MacNee W, Tal-Singer R, Miller BE, et al. Persistent systemic inflammation is associated with poor clinical outcomes in COPD: a novel phenotype. *PloS one*. 2012;7(5):e37483.
- 329** Takabatake N, Nakamura H, Abe S, Hino T, Saito H, Yuki H, et al. Circulating leptin in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1999;159(4 Pt 1):1215-9.
- 330** Keatings VM, Collins PD, Scott DM, Barnes PJ. Differences in interleukin-8 and tumor necrosis factor-alpha in induced sputum from patients with chronic obstructive pulmonary disease or asthma. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1996;153(2):530-4.
- 331** Soler N, Ewig S, Torres A, Filella X, Gonzalez J, Zaubet A. Airway inflammation and bronchial microbial patterns in patients with stable chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J*. 1999;14(5):1015-22.

- 332** Gessner C, Scheibe R, Wotzel M, Hammerschmidt S, Kuhn H, Engelmann L, et al. Exhaled breath condensate cytokine patterns in chronic obstructive pulmonary disease. *Respiratory medicine*. 2005;99(10):1229-40.
- 333** Holick MF. Vitamin D deficiency. *The New England journal of medicine*. 2007;357(3):266-81.
- 334** Dawson-Hughes B. Serum 25-hydroxyvitamin D and muscle atrophy in the elderly. *The Proceedings of the Nutrition Society*. 2012;71(1):46-9.
- 335** Haroon M, Fitzgerald O. Vitamin D and its emerging role in immunopathology. *Clinical rheumatology*. 2012;31(2):199-202.
- 336** Litonjua AA, Weiss ST. Is vitamin D deficiency to blame for the asthma epidemic? *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2007;120(5):1031-5.
- 337** Ginde AA, Mansbach JM, Camargo CA, Jr. Association between serum 25-hydroxyvitamin D level and upper respiratory tract infection in the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Archives of internal medicine*. 2009;169(4):384-90.
- 338** Arnedo-Pena A, Juan-Cerdan JV, Romeu-Garcia MA, Garcia-Ferrer D, Holguin-Gomez R, Iborra-Millet J, et al. Vitamin D status and incidence of tuberculosis infection conversion in contacts of pulmonary tuberculosis patients: a prospective cohort study. *Epidemiology and infection*. 2015;143(8):1731-41.
- 339** Zhu B, Zhu B, Xiao C, Zheng Z. Vitamin D deficiency is associated with the severity of COPD: a systematic review and meta-analysis. *International journal of chronic obstructive pulmonary disease*. 2015;10:1907-16.
- 340** Xiaomei W, Hang X, Lingling L, Xuejun L. Bone metabolism status and associated risk factors in elderly patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Cell biochemistry and biophysics*. 2014;70(1):129-34.
- 341** Lee HM, Liu M, Lee K, Luo Y, Wong ND. Does low vitamin D amplify the association of COPD with total and cardiovascular disease mortality? *Clinical cardiology*. 2014;37(8):473-8.



- 342** Martineau AR, James WY, Hooper RL, Barnes NC, Jolliffe DA, Greiller CL, et al. Vitamin D3 supplementation in patients with chronic obstructive pulmonary disease (ViDiCO): a multicentre, double-blind, randomised controlled trial. *The Lancet Respiratory medicine*. 2015;3(2):120-30.
- 343** Janssen HC, Emmelot-Vonk MH, Verhaar HJ, van der Schouw YT. Determinants of vitamin D status in healthy men and women aged 40-80 years. *Maturitas*. 2013;74(1):79-83.
- 344** Fiaccadori E, Coffrini E, Ronda N, Vezzani A, Cacciani G, Fracchia C, et al. Hypophosphatemia in course of chronic obstructive pulmonary disease. Prevalence, mechanisms, and relationships with skeletal muscle phosphorus content. *Chest*. 1990;97(4):857-68.
- 345** Patel MS, Natanek SA, Stratakos G, Pascual S, Martinez-Llorens J, Disano L, et al. Vastus lateralis fiber shift is an independent predictor of mortality in chronic obstructive pulmonary disease. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2014;190(3):350-2.
- 346** Hoppeler H, Kleinert E, Schlegel C, Claassen H, Howald H, Kayar SR, et al. Morphological adaptations of human skeletal muscle to chronic hypoxia. *International journal of sports medicine*. 1990;11 Suppl 1:S3-9.
- 347** Barreiro E, Rabinovich R, Marin-Corral J, Barbera JA, Gea J, Roca J. Chronic endurance exercise induces quadriceps nitrosative stress in patients with severe COPD. *Thorax*. 2009;64(1):13-9.
- 348** Koechlin C, Couillard A, Simar D, Cristol JP, Bellet H, Hayot M, et al. Does oxidative stress alter quadriceps endurance in chronic obstructive pulmonary disease? *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2004;169(9):1022-7.
- 349** Koechlin C, Maltais F, Saey D, Michaud A, LeBlanc P, Hayot M, et al. Hypoxaemia enhances peripheral muscle oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax*. 2005;60(10):834-41.
- 350** de Theije C, Costes F, Langen RC, Pison C, Gosker HR. Hypoxia and muscle maintenance regulation: implications for chronic respiratory disease. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*. 2011;14(6):548-53.

- 351** Schuler M, Pette D. Fiber transformation and replacement in low-frequency stimulated rabbit fast-twitch muscles. *Cell and tissue research*. 1996;285(2):297-303.
- 352** Chen SE, Gerken E, Zhang Y, Zhan M, Mohan RK, Li AS, et al. Role of TNF- $\alpha$  signaling in regeneration of cardiotoxin-injured muscle. *American journal of physiology Cell physiology*. 2005;289(5):C1179-87.
- 353** Chen SE, Jin B, Li YP. TNF- $\alpha$  regulates myogenesis and muscle regeneration by activating p38 MAPK. *American journal of physiology Cell physiology*. 2007;292(5):C1660-71.
- 354** Langen RC, Schols AM, Kelders MC, Van Der Velden JL, Wouters EF, Janssen-Heininger YM. Tumor necrosis factor- $\alpha$  inhibits myogenesis through redox-dependent and -independent pathways. *American journal of physiology Cell physiology*. 2002;283(3):C714-21.
- 355** Langen RC, Van Der Velden JL, Schols AM, Kelders MC, Wouters EF, Janssen-Heininger YM. Tumor necrosis factor- $\alpha$  inhibits myogenic differentiation through MyoD protein destabilization. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2004;18(2):227-37.
- 356** Stewart CE, Newcomb PV, Holly JM. Multifaceted roles of TNF- $\alpha$  in myoblast destruction: a multitude of signal transduction pathways. *Journal of cellular physiology*. 2004;198(2):237-47.
- 357** McArdle A, Edwards RH, Jackson MJ. How does dystrophin deficiency lead to muscle degeneration?--evidence from the mdx mouse. *Neuromuscular disorders : NMD*. 1995;5(6):445-56.
- 358** Shi CS, Kehrl JH. Activation of stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase, but not NF- $\kappa$ B, by the tumor necrosis factor (TNF) receptor 1 through a TNF receptor-associated factor 2- and germinal center kinase related-dependent pathway. *The Journal of biological chemistry*. 1997;272(51):32102-7.
- 359** Velders M, Schleipen B, Fritzeimer KH, Zierau O, Diel P. Selective estrogen receptor-beta activation stimulates skeletal muscle growth and regeneration. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2012;26(5):1909-20.

- 360** Amelink GJ, Koot RW, Erich WB, Van Gijn J, Bar PR. Sex-linked variation in creatine kinase release, and its dependence on oestradiol, can be demonstrated in an in-vitro rat skeletal muscle preparation. *Acta physiologica Scandinavica*. 1990;138(2):115-24.
- 361** Persky AM, Green PS, Stubley L, Howell CO, Zaulyanov L, Brazeau GA, et al. Protective effect of estrogens against oxidative damage to heart and skeletal muscle in vivo and in vitro. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine Society for Experimental Biology and Medicine*. 2000;223(1):59-66.
- 362** Tiidus PM. Can oestrogen influence skeletal muscle damage, inflammation, and repair? *British journal of sports medicine*. 2005;39(5):251-3.
- 363** Enns DL, Tiidus PM. Estrogen influences satellite cell activation and proliferation following downhill running in rats. *Journal of applied physiology*. 2008;104(2):347-53.
- 364** Taaffe DR, Sipila S, Cheng S, Puolakka J, Toivanen J, Suominen H. The effect of hormone replacement therapy and/or exercise on skeletal muscle attenuation in postmenopausal women: a yearlong intervention. *Clinical physiology and functional imaging*. 2005;25(5):297-304.
- 365** MacNeil LG, Baker SK, Stevic I, Tarnopolsky MA. 17beta-estradiol attenuates exercise-induced neutrophil infiltration in men. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2011;300(6):R1443-51.
- 366** Farreras-Rozman F. *Medicina Interna*. 15ª ed. Madrid: Elsevier España; 2004.
- 367** Gea J, Casadevall C, Pascual S, Orozco-Levi M, Barreiro E. Respiratory diseases and muscle dysfunction. *Expert review of respiratory medicine*. 2012;6(1):75-90.



## VIII. ADDENDUM

Con la presente tesis se ha realizado el siguiente manuscrito que ha sido enviado para revisión a la revista *European Respiratory Journal*.

### **GENDER DIFFERENCES IN FUNCTION AND BIOLOGY OF THE QUADRICEPS MUSCLE IN COPD PATIENTS**

Pilar Ausín<sup>1</sup>, Juana Martínez-Llorens<sup>1,2</sup>, Marina Sabaté-Bresco<sup>1,3</sup>, Carme Casadevall<sup>1,2</sup>, Esther Barreiro<sup>1,2</sup>, Joaquim Gea<sup>1,2</sup>.

<sup>1</sup>*Department of Respiratory Medicine, Hospital del Mar. Unitat de Recerca en Múscul i Aparell Respiratori (URMAR), Institut Hospital del Mar d'Investigacions Mèdiques (IMIM). Ciber de Enfermedades Respiratorias (CIBERES), ISC III. Barcelona, Catalonia, Spain.*

<sup>2</sup>*CEXS Department, Universitat Pompeu Fabra (UPF), Barcelona, Catalonia, Spain.*

<sup>3</sup>*AO Research Institute Davos. Swiss Institute of Allergy and Asthma Research (SIAF), University of Zurich. Davos, Switzerland.*

**Corresponding author:** Joaquim Gea.

*Servei de Pneumologia, Hospital del Mar,*

*C/ Dr. Aiguader, 88. Barcelona, E-08003 Spain.*

Telephone: (+34) 93 316 0387 Fax: (+34) 93 316 0410.

Email: [jgea@parcdesalutmar.cat](mailto:jgea@parcdesalutmar.cat)

Funded by Plan Nacional SAF2011-26908& SAF2014-54371, FIS 11/02029 & 12/02534, 2014SGR424, MTV3-07-1010, FUCAP 09 & 11, SEPAR 761 and CIBERES.

**ABSTRACT (292 words)**

COPD is a complex and multidimensional disorder, which in addition to the respiratory involvement also targets other organs and systems. Even though there is some knowledge regarding gender differences in the presentation of the lung disease, little is known on the potential differences that can also be present in its extrapulmonary manifestations. Muscle dysfunction is one of the most prevalent of them and negatively impacts on the patients' quality of life and mortality. The aim of the study was to analyze the specific profile of muscle dysfunction, structure and biology in COPD women. Twenty-one women and 19 men with stable COPD as well as 15 controls of both genders were included. Nutritional status, level of physical activity, lung and muscle function, exercise capacity and quality of life were assessed in all subjects. In addition, blood, breath condensate and quadriceps muscle samples were obtained and all of them were tested for inflammatory markers. Moreover, fiber phenotype, signs of damage and/or regeneration and the expression of key genes linked to myogenesis were analyzed in the muscle. Inflammatory markers were increased in all body compartments analyzed but no correlation was found amongst them. Muscle dysfunction was present in both COPD groups but was more marked in women. The opposite occurred with the increase in the percentage of type II fibers that was present in COPD patients from both genders but was significantly lower in women despite the existence of a similar level of airway obstruction than men. Female COPD also showed higher histological signs of muscle damage than both control females and COPD men, who in contrast exhibited higher signs of muscle regeneration. We conclude that gender influences muscle phenotype and function in COPD. Further studies will be required to investigate the causes for these differences.

**KEYWORDS**

Gender – Peripheral Muscles – Muscle Dysfunction – Muscle Damage - COPD.

## INTRODUCTION

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is a rising cause of morbidity and mortality worldwide (1). Historically there has been greater prevalence among men than women, mostly related to the epidemiology of cigarette smoking. In line with this, current European studies still show a higher prevalence in men than in women but with a worryingly high incidence of COPD in middle-aged women (2, 3). Moreover, recent studies carried out in the United States, where women have started smoking in increasing numbers since 1940, show that the prevalence is now higher in women than in men (4), and the risk for death from COPD is already similar in both genders (5). Therefore, the potential differences that men and women may exhibit regarding susceptibility to COPD, forms of clinical presentation and prognosis are a subject of great interest.

The authors of different reports have suggested that women may be more susceptible to cigarette smoke and more likely to develop early-onset COPD than men (6-9), and have a greater lung function decline than their male counterparts (10). In addition, several studies have shown sex differences in the expression of the disease, including symptoms, radiological features, number and severity of exacerbations and mortality. In this regard, women complain more about dyspnea and seem to have worse health-related quality-of-life scores for the same predicted FEV<sub>1</sub> than men (11, 12). In addition, women have a higher hyperresponsiveness than men (13) and CT exams reveal that they have less extensive emphysema and peripheral involvement (12, 14, 15), smaller airway lumens and disproportionately thick airway walls than them (12). Moreover, COPD women show a higher risk of being admitted to hospital (6) and their mortality rates are higher than those of men (16, 17). However, the effect of gender in systemic manifestations of COPD is still an unexplored area. Skeletal muscle dysfunction is probably the most studied systemic manifestation of COPD and is very prevalent. It has been recently demonstrated that as far as a 28% of the patients in stages 1 and 2 and 38% of those in stage 4 have quadriceps weakness (18). Muscle dysfunction also has an important impact on exercise tolerance and quality of life of the patients (19), being an independent mortality predictor (20). The main factors involved in muscle dysfunction are the decrease in physical activity that leads to deconditioning, nutritional abnormalities and a low grade of systemic inflammation (21). These factors are associated to structural and biological changes within the limb muscles, which include a switch to a higher percentage of type II fibers, apoptosis, muscle damage, oxidative stress and local inflammation, among others (22-26). Nevertheless, the preceding studies have been made on male COPD patients or in a mixture of both genders, without paying attention to the presence of potential differences between men and women. Therefore, the specific characteristics of muscle dysfunction in the latter still remain unexplored. Accordingly, the aim of the present study was to determine if those factors related to gender influence the clinical presentation of muscle dysfunction in women, with special focus on the most relevant ethiological factors as well as on muscle structure and biology.

## METHODS

### Subjects

Twenty-one Caucasian women with stable COPD (27) and 19 men with the same condition and matched for age, body mass index (BMI) and severity were consecutively recruited from the clinics at our institution. Those patients with relevant comorbidities were excluded from the study. Additionally, 8 healthy women and 7 healthy men, matched for age and BMI with COPD patients, never smokers were recruited from the general population. Approval was obtained from the local institutional Ethics Committee on Human Investigation and informed written consent was obtained from all individuals.

**Nutritional assessment:** Anthropometric variables including BMI and fat free mass index (FFMI, acquired by bioelectrical impedance) (BODYSTAT 1500, Bodystat LTD. Isle of Man, UK) as well as serum nutritional markers (cholesterol, albumin, total proteins, haemoglobin and prothrombin time) were obtained in all subjects.

**Respiratory function:** Forced spirometry was performed (Datospir 92, SIBEL, Barcelona, Spain), and static lung volume and airway resistance (Body plethysmography, Masterlab, Jaeger, Würzburg, Germany) as well as carbon monoxide transfer (DLCO) (Masterlab) were obtained in all subjects. Variables are expressed through both absolute and percentage of predicted values. Equations for a Mediterranean population were always used (28-30). Arterial blood gases were only obtained in COPD patients (gas analyzer GEM Premier 3000 Instrumentation Laboratory Worldwide Headquarters, Bedford, MA. USA).

**Muscle Function:** handgrip and quadriceps muscle strength were evaluated in all the subjects through dynamometry as described elsewhere (28-33).

**Physical endurance** was evaluated through the six minutes walking test following the ATS/ERS recommendations (34). Walking distance was expressed as both absolute and related to predicted values (31).

**Physical activity** was measured using accelerometers (SenseWear® Pro2 Armband SWA; Body Media, Pittsburgh, PA, USA) for 7 consecutive days as described elsewhere (35). Data are expressed as steps per day and metabolic equivalents (METS).

**Quality of life** was assessed by the COPD specific version of the St. George's Respiratory Questionnaire (SGRQ-C) (36) using those published for the Spanish population as reference values (37).



### **Blood samples**

Blood samples were obtained after fasting overnight and, following 30 min of blood withdrawing, centrifuged at 2000–3000 rpm for 10 min. Serum was separated and stored in cryotubes at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Routine blood tests (complete blood count, biochemistry including liver and kidney functions) as well as high sensitivity C-reactive protein (hsCRP), calcidiol (25(OH)D), calcitriol, and parathyroid hormone (PTH) were analyzed in all subjects, and estrogen, progesterone and follicle-stimulating hormone (FSH) levels only in women. In addition, A Bio-Plex human cytokine assay was run according to the recommended procedure (Bio-Plex Precision Pro Assays Human Cytokine 10-Plex ref. 171-A1001P. Bio-Rad Laboratories, Hercules CA, USA). Then, serum levels of tumor necrosis factor (TNF)  $-\alpha$ , interferon (IFN)  $-\gamma$ , interleukin (IL)  $-1\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 and IL-13, follistatin, leptin, granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF), hepatocyte growth factor (HGF), vascular endothelial growth factor (VEGF), platelet-derived growth factor (PDGF) and platelet endothelial cell adhesion molecule (PECAM) were determined. All analyses were performed in duplicate.

### **Breath Condensate**

Patients were asked to breath for 10 minutes in a condensator under ventilatory control (EcoScreen/ECoVent, Jaeger, Germany) according to the recommendations from ATS/ERS Task Force (38). The samples were immediately frozen and later analysed. The proteins expression of the following cytokines TNF  $\alpha$ , TNF  $\beta$ , IFN  $\gamma$ , IL-1b, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12  $\gamma$  VEGF were quantified using specific ELISA kits (RayBiotech, Norcross, GA, USA) following previously published methodologies (7). For all the sample specimens equal amounts of total protein were always loaded in duplicated. Protocol was also followed according to the corresponding manufacturer's instructions for each cytokine.

### **Muscle samples**

Open muscle biopsies of the *vastuslateralis* were obtained from COPD patients and controls following the procedures previously published by our group (39). All muscle structural and biological analyses were conducted blind in the same laboratory and by the same investigators.

### **Structural analyses**

Briefly, on 3- $\mu\text{m}$  muscle paraffin-embedded sections from both patients and controls, myosin heavy chain (MyHC) -I and -II isoforms were identified using specific antibodies

as published elsewhere (40). The percentages of fiber types and their cross-sectional areas were then calculated. In addition, to assess the presence of histological signs of muscle damage and regeneration, the area fraction of normal and abnormal muscle was also evaluated following previously published methodologies (41).

### Gene expression

The expression of key genes for inflammation (TNF- $\alpha$  and its receptors RI and RII, IL-1 $\beta$ , IL-6 and its receptor, IL-10 and insulin-like growth factor (IGF) -1 and its receptor), cell damage or stress (embryonic and perinatal MyHC isoforms (MyHC-emb) (MyHC-peri), respectively) and myogenesis (Paired box protein 7 (Pax7), myogenic factor 5 (MyF5), M-Cadherin, and differentiation factor 1 (Myo-D)) were evaluated by determining their transcriptomes (mRNA) in the muscle. Succinctly, total RNA was extracted from muscle samples using TRIzol reagent (Invitrogen, Life Technologies SA, Grand Island, NY, USA) according to the manufacturer's protocol. First strand cDNAs were produced from total RNA using oligo (dT)<sub>12-18</sub> primers and SuperScript III reverse transcriptase (Life technologies). Then, quantitative PCR reactions were performed using TaqMan low-density arrays (TLDA). The cDNA was mixed with 2x TaqMan Universal PCR Master Mix (Assays-on-Demand Gene Expression Products, Applied Biosystems), loaded into a port of the TLDA card and run on an ABI Prism 7900HT Sequence Detection System (Life Technologies). The TLDA cards contained 24 different TaqMan gene expression assays (Applied Biosystems) including 3 housekeeping genes. From them, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was the most stably expressed housekeeping gene among all samples and therefore, it was chosen as our endogenous control. One sample was used as calibrator for data normalization. Data calculation was performed using the RQ Manager package from the Sequence Detection System (SDS) software, version 2.2.2 (Applied Biosystems) and was based on the  $\Delta\Delta C_t$  method (42).

### Protein levels

Due to limitations of the muscle sample size, protein levels of only selected cytokines (TNF- $\alpha$  and its receptors RI and RII, interferon- $\gamma$ , transforming growth factor beta 1 (TGF- $\beta$ 1), IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-12 and VEGF) were quantified using specific ELISA kits (RayBiotech, Norcross, GA, USA) and following previously published methodologies (41, 43).

### **Statistical analysis**

Normal distribution of each variable was determined by the Kolmogorov-Smirnov test. Data are presented as mean±SD. Comparisons of physiological and biological variables between both groups of COPD patients and between each of these groups with their corresponding gender controls were analyzed using the Student's t test. Bivariate relations between physiological and biological variables were explored using the Pearson's correlation coefficient and a multivariate analysis was also conducted. Data analysis was done using the SPSS Statistics® package (version 20.0) and GraphPadPrism® (version 6.0). In all cases, statistical significance was defined by a  $p \leq 0.05$ .

## RESULTS

### General characteristics of the study population

Table 1 shows the main general, nutritional and functional characteristics of all different study groups. Briefly, the cumulated exposure to tobacco smoking was higher in male COPD patients than in women with the disease, and a relatively large percentage of all patients were still active smokers (33% women vs. 26% men, not significant). However, COPD patients of both sexes showed similar nutritional parameters than their respective healthy controls. Moreover, the percentage of patients with low body weight (BMI < 18,5 kg/m<sup>2</sup>) was similar for COPD women and men (19 vs. 21%, respectively).

Regarding respiratory function, the group of women showed a mean FEV<sub>1</sub> of 39±15% ref., with marked air trapping, reduced carbon monoxide transfer, and slight hypoxemia without hypercapnia. The level of impairment was similar for COPD women and men, with a similar distribution of the severity levels. Muscle of the lower limbs in both COPD groups was weaker compared with their respective controls, although this reduction was more important in female patients, even after normalization by fat free mass. In contrast, the upper limb function was similar in the four study groups. The exercise capacity in turn, was slightly reduced in COPD women, and again this reduction was slightly higher than that observed in COPD men. Obviously, respiratory and limb symptoms at the maximum effort level were more pronounced in both COPD groups than in their respective healthy controls, but there was no difference between COPD women and men. The level of physical activity was similarly reduced in both groups of COPD patients, but women showed a direct relationship of this dimension with quadriceps strength normalized by FFM. A similar tendency was observed in COPD men. Finally, the Saint George's questionnaire showed a moderate and similar deterioration in the quality of life in both groups of patients. However, women showed a tendency to have a higher perception of dyspnea than men.

### Systemic inflammation

Both COPD groups showed elevated levels of different inflammatory markers in their peripheral blood, with no differences between men and women (Table 2). Moreover, women with COPD showed a direct correlation between the levels of IL-6 and the severity of the airway obstruction ( $r^2 = 0.17$ ,  $p < 0.05$ ), which was absent in COPD men.

## Lung inflammation

COPD women showed higher levels of diverse inflammatory markers than their healthy controls in the exhaled condensate. Moreover, their IL-8 levels were even higher than those shown by COPD men, with a similar trend for IL-10 (Table 3).

## Vitamin D and calcium metabolism

The level of 25 (OH) Vit D was significantly lower in women with COPD than in their healthy controls. COPD males showed a similar trend, although less marked than women (Table 4). Furthermore, a decreased level of 25 (OH) Vit D was evident in the latter, even in the subgroup of patients with only moderate lung disease. By contrast, levels of calcium, phosphate and PTH were similar among the four study groups. Interestingly, the levels of 25 (OH) Vit D were directly associated with muscle strength ( $r^2=0.14$ ,  $p=0.05$ , for handgrip; and  $r^2=0.27$ ,  $p=0.01$ , for quadriceps strength) and inversely with IL-6 levels ( $r^2=0.16$ ,  $p<0.05$ ) in women.

## Structure and molecular events in the quadriceps muscle (Table 5)

a) *Fiber Phenotype*: COPD patients of both genders showed a higher proportion of type II fibers than their respective healthy controls. However, this increase was significantly lower in COPD women compared with COPD men, and the former also showed a direct relationship between the proportion of type II fibers and both the degree of airway obstruction and the BODE index (Figure 1), as well as an inverse correlation with oxygen saturation at the end of the 6 minute walking test. In addition, both COPD groups showed a tendency to have smaller fibers than their respective healthy controls, although this did not reach statistical significance. However, type II were smaller than type I fibers in COPD women, while in male patients both fiber types exhibited a similar size.

b) *Damage and Muscle regeneration*: The proportion of abnormal muscle (a surrogate for the presence of damage and repair phenomena) was higher in both COPD groups than in their controls, with no differences between both genders. However, when this general index was divided into its different components, the percentage of muscle with abnormal or necrotic fibers (a surrogate of muscle injury) was increased in COPD women, not only when compared with their female controls, but also with COPD men. This difference was present even in women with a moderate lung disease. Conversely, COPD women showed a lower proportion of muscle with internalized nuclei (a surrogate of the initial stages of regeneration) than COPD men. In addition, the proportion of abnormal muscle directly correlated with the degree of airway obstruction, the BODE index and the proportion of type II fibers, and inversely with the level of physical activity and the oxygen saturation at the end of the walking test in COPD women.

c) Gene expression (Table 6): COPD women did not show significant differences with their healthy controls in the expression of key genes involved in myogenesis. However, their PAX7, MyF5 and M-Cadherin expression levels were higher than those observed in COPD men. No differences were observed between each one of the COPD groups and their specific healthy controls for those genes linked to cell stress or encoding adhesion molecules or proinflammatory cytokines. However, COPD women showed a higher expression of ITG-b, RI of TNF-a and the receptor of IGF-1 than COPD men. Moreover, the expression of TNF-a and its two receptors was directly correlated with that of different genes involved in stress and myogenesis, such as PAX7, MyF5, MyHC-emb and MyHC-peri in COPD women.

d) ) Molecular levels of key proteins (Table 7): In addition to transcriptome levels, the protein levels of a few selected proteins related to inflammation were also determined. Overall, they show similar results to the former, without differences between COPD patients and controls, with the exception of the receptors of TNF-a, whose levels were higher in COPD women when compared with their female controls and, in the particular case of RII, with COPD men.

Inflammation in systemic, pulmonary and muscle compartments. Regarding inflammatory markers, no correlations of interest were obtained between the different body compartments analyzed in the study.

## DISCUSSION

The most novel finding of the present study refers to the increased histological signs of injury in the quadriceps muscle of female patients with COPD. These signs were higher to those shown by COPD men, although their levels of functional impairment, nutritional status, systemic inflammation and physical activity were similar. Moreover, this phenomenon was evident even in moderate stages of the disease. The opposite occurred with early signs of muscle regeneration, which were lower in COPD women than in men. Moreover, the shift towards an increase in the proportion of type II fibers was lower in COPD women when compared with that observed in men. This study also confirms some findings of previous authors regarding the greater decrease in muscle strength and exercise capacity shown by COPD women, and their higher perception of dyspnea. It also confirms the absence of relationships between the levels of systemic, lung and muscle inflammation.

The patients of the present study showed muscle dysfunction, expressed by a decrease in quadriceps strength. This decrease was more pronounced in women, even after normalization for fat free mass (absent in previous studies), indicating that the intrinsic properties of the muscle were more altered in females. Moreover, the loss of strength in women was related to the level of physical activity, reinforcing the idea of a key role for muscle deconditioning in the genesis of the dysfunction. In contrast with the lower limbs, the function of the upper limb muscles showed no differences between patients and healthy subjects. This confirms earlier findings of our group, which demonstrated that muscle phenotype is more preserved in the upper limb muscles, probably due to less severe muscle deconditioning and phenotypic changes (44, 45).

As for structural muscle findings, COPD patients showed the increase in the percentage of type II fibers classically observed in this condition (21, 23), but this switch was markedly lower in COPD women than in men. This is especially relevant since as mentioned this occurs even though both populations showed a very similar nutritional status, and similar levels of bronchial obstruction, systemic inflammation and physical activity. Interestingly, the percentage of type II fibers in women was associated with the degree of hypoxemia during exercise. Although it is not possible to infer a cause-effect relationship given the nature of the present study, several authors have shown that the level of oxygenation may modulate fiber phenotype in skeletal muscles (46, 47). Also estrogens, with very low levels in our patients but with potential residual effects from the preceding years, may have influenced their muscle phenotype (48, 49). Interestingly, our group in collaboration with other international teams has recently shown the importance of the switch in fiber types occurring in the quadriceps muscle of COPD patients to predict mortality (50).

Moreover, our COPD women showed higher histological evidences of muscle damage than healthy controls and even than COPD men. The latter in contrast, showed greater signs of early steps of muscle regeneration than COPD women. As a whole, these findings suggest different susceptibility of patients of both genders to injury, that may have been caused by different stimuli, including tobacco (many of the patients were active smokers) and/or exercise (26, 51) The fact that COPD men showed signs of early regeneration must be taken with caution, since several groups have recently shown that this reparative process fails in its final steps in patients (52).

Another point of interest is the presence of a vitamin D deficiency in patients with COPD, which was more pronounced in women than in men, and was present even in those with only moderate lung disease. In addition, vitamin D levels were associated with muscle strength in women, both in the upper and lower limbs. The trophic effect that vitamin D has on bone is very well known but its effects on muscle are less familiar to the medical community. However, it has been shown that vitamin D positively influences the maintenance of muscle mass (53). It is possible to speculate that the deficit in this vitamin, perhaps derived from the lack of outdoors activity of the patients and easily preventable with oral supplements, had played a role in the structural and functional changes exhibited by our female patients.

The present results also confirm the absence of any relationship in the levels of inflammation (as indicated by the expression of specific markers) between systemic, pulmonary and muscle compartments. This reinforces the idea that the initial trigger (i.e. tobacco) probably targets various organs separately, and works against the theory of the spill over of inflammation from the lungs.

Another interesting issue is the proportion of patients with low weight and low muscle mass observed in this study, which was approximately one fifth, with no differences between men and women. This proportion is close to those reported in previous studies conducted in North America and Northern Europe, and much higher than previous studies performed in the Mediterranean area (54). This geographical difference has been attributed to lifestyle divergences. Our higher proportion of patients with low body weight can probably be explained by the origin of the patients (clinics from a reference hospital), which has determined their major severity and phenotypic traits. Previous studies conducted in Spain analyzed mild COPD, while the mean  $FEV_1$  of the present study was 39% ref. and the patients showed a predominance of the emphysema phenotype.



## **Study limitations**

One limitation of the present study is the relatively small number of healthy subjects, which may have prevented the achievement of statistical significance in some variables. However, the ethical constraints of taking a biopsy of the quadriceps muscle in healthy subjects is obvious. Moreover, the control groups are similar to those used in previous studies and significant differences have been obtained in the main variables of the present one. The muscle sample size was minimized for the same ethical reasons. This did not affected the structural and transcriptome analyses, but has limited the number of proteins included in the study, and thus, only those considered as more relevant for the objectives were chosen.

In conclusion, the present study has revealed for the first time functional and structural differences in peripheral muscles of women and men with COPD, also confirming other discrepancies in physiological outcomes and symptoms between both genders.

- 1** Mathers CD, Loncar D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Med.* 2006;3(11):e442.
- 2** Ancochea J, Badiola C, Duran-Tauleria E, Garcia Rio F, Miravitlles M, Munoz L, et al. [The EPI-SCAN survey to assess the prevalence of chronic obstructive pulmonary disease in Spanish 40-to-80-year-olds: protocol summary]. *Arch Bronconeumol.* 2009;45(1):41-7.
- 3** van Durme YM, Verhamme KM, Stijnen T, van Rooij FJ, Van Pottelberge GR, Hofman A, et al. Prevalence, incidence, and lifetime risk for the development of COPD in the elderly: the Rotterdam study. *Chest.* 2009;135(2):368-77.
- 4** Varkey AB. Chronic obstructive pulmonary disease in women: exploring gender differences. *Curr Opin Pulm Med.* 2004;10(2):98-103.
- 5** Thun MJ, Carter BD, Feskanich D, Freedman ND, Prentice R, Lopez AD, et al. 50-year trends in smoking-related mortality in the United States. *N Engl J Med.* 2013;368(4):351-64.
- 6** Prescott E, Bjerg AM, Andersen PK, Lange P, Vestbo J. Gender difference in smoking effects on lung function and risk of hospitalization for COPD: results from a Danish longitudinal population study. *Eur Respir J.* 1997;10(4):822-7.
- 7** Arismendi E, Rivas E, Vidal J, Barreiro E, Torralba Y, Burgos F, et al. Airway Hyperresponsiveness to Mannitol in Obesity Before and After Bariatric Surgery. *Obes Surg.* 2015;25(9):1666-71.
- 8** Gan WQ, Man SF, Postma DS, Camp P, Sin DD. Female smokers beyond the perimenopausal period are at increased risk of chronic obstructive pulmonary disease: a systematic review and meta-analysis. *Respir Res.* 2006;7:52.
- 9** Gold DR, Wang X, Wypij D, Speizer FE, Ware JH, Dockery DW. Effects of cigarette smoking on lung function in adolescent boys and girls. *N Engl J Med.* 1996;335(13):931-7.
- 10** Vestbo J, Prescott E, Lange P. Association of chronic mucus hypersecretion with FEV1 decline and chronic obstructive pulmonary disease morbidity. Copenhagen City Heart Study Group. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996;153(5):1530-5.
- 11** I de Torres JP, Casanova C, Hernandez C, Abreu J, Aguirre-Jaime A, Celli BR. Gender and COPD in patients attending a pulmonary clinic. *Chest.* 2005;128(4):2012-6.

- 12** Martinez FJ, Curtis JL, Scirba F, Mumford J, Giardino ND, Weinmann G, et al. Sex differences in severe pulmonary emphysema. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007;176(3):243-52.
- 13** Kanner RE, Connett JE, Altose MD, Buist AS, Lee WW, Tashkin DP, et al. Gender difference in airway hyperresponsiveness in smokers with mild COPD. The Lung Health Study. *Am J Respir Crit Care Med.* 1994;150(4):956-61.
- 14** Camp PG, Coxson HO, Levy RD, Pillai SG, Anderson W, Vestbo J, et al. Sex differences in emphysema and airway disease in smokers. *Chest.* 2009;136(6):1480-8.
- 15** Dransfield MT, Washko GR, Foreman MG, Estepar RS, Reilly J, Bailey WC. Gender differences in the severity of CT emphysema in COPD. *Chest.* 2007;132(2):464-70.
- 16** Lange P, Nyboe J, Appleyard M, Jensen G, Schnohr P. Relation of ventilatory impairment and of chronic mucus hypersecretion to mortality from obstructive lung disease and from all causes. *Thorax.* 1990;45(8):579-85.
- 17** Machado MC, Krishnan JA, Buist SA, Bilderback AL, Fazolo GP, Santarosa MG, et al. Sex differences in survival of oxygen-dependent patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006;174(5):524-9.
- 18** Seymour JM, Spruit MA, Hopkinson NS, Natanek SA, Man WD, Jackson A, et al. The prevalence of quadriceps weakness in COPD and the relationship with disease severity. *Eur Respir J.* 2010;36(1):81-8.
- 19** Gosselink R, Troosters T, Decramer M. Peripheral muscle weakness contributes to exercise limitation in COPD. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996;153(3):976-80.
- 20** Swallow EB, Reyes D, Hopkinson NS, Man WD, Porcher R, Cetti EJ, et al. Quadriceps strength predicts mortality in patients with moderate to severe chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax.* 2007;62(2):115-20.
- 21** Maltais F, Decramer M, Casaburi R, Barreiro E, Burelle Y, Debigare R, et al. An official american thoracic society/european respiratory society statement: update on limb muscle dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2014;189(9):e15-62.

- 22** Barreiro E, de la Puente B, Minguella J, Corominas JM, Serrano S, Hussain SN, et al. Oxidative stress and respiratory muscle dysfunction in severe chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005;171(10):1116-24.
- 23** Gosker HR, Zeegers MP, Wouters EF, Schols AM. Muscle fibre type shifting in the vastus lateralis of patients with COPD is associated with disease severity: a systematic review and meta-analysis. *Thorax.* 2007;62(11):944-9.
- 24** Guo Y, Gosker HR, Schols AM, Kapchinsky S, Bourbeau J, Sandri M, et al. Autophagy in locomotor muscles of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2013;188(11):1313-20.
- 25** Menon MK, Houchen L, Singh SJ, Morgan MD, Bradding P, Steiner MC. Inflammatory and satellite cells in the quadriceps of patients with COPD and response to resistance training. *Chest.* 2012;142(5):1134-42.
- 26** Orozco-Levi M, Coronell C, Ramirez-Sarmiento A, Lloreta J, Martinez-Llorens J, Galdiz JB, et al. Injury of peripheral muscles in smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *Ultrastruct Pathol.* 2012;36(4):228-38.
- 27** Vestbo J, Hurd SS, Rodriguez-Roisin R. The 2011 revision of the global strategy for the diagnosis, management and prevention of COPD (GOLD)--why and what? *The clinical respiratory journal.* 2012;6(4):208-14.
- 28** Roca J, Burgos F, Barbera JA, Sunyer J, Rodriguez-Roisin R, Castellsague J, et al. Prediction equations for plethysmographic lung volumes. *Respir Med.* 1998;92(3):454-60.
- 29** Roca J, Rodriguez-Roisin R, Cobo E, Burgos F, Perez J, Clausen JL. Single-breath carbon monoxide diffusing capacity prediction equations from a Mediterranean population. *Am Rev Respir Dis.* 1990;141(4 Pt 1):1026-32.
- 30** Roca J, Sanchis J, Agusti-Vidal A, Segarra F, Navajas D, Rodriguez-Roisin R, et al. Spirometric reference values from a Mediterranean population. *Bull Eur Physiopathol Respir.* 1986;22(3):217-24.
- 31** Enright PL, Sherrill DL. Reference equations for the six-minute walk in healthy adults. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998;158(5 Pt 1):1384-7.

- 32** Luna-Heredia E, Martin-Pena G, Ruiz-Galiana J. Handgrip dynamometry in healthy adults. *Clin Nutr.* 2005;24(2):250-8.
- 33** Mathiowetz V, Kashman N, Volland G, Weber K, Dowe M, Rogers S. Grip and pinch strength: normative data for adults. *Archives of physical medicine and rehabilitation.* 1985;66(2):69-74.
- 34** Laboratories ATSCoPSfCPF. ATS statement: guidelines for the six-minute walk test. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002;166(1):111-7.
- 35** Donaire-Gonzalez D, Gimeno-Santos E, Balcells E, Rodriguez DA, Farrero E, Batlle JD, et al. Physical activity in COPD patients: patterns and bouts. *Eur Respir J.* 2012.
- 36** Meguro M, Barley EA, Spencer S, Jones PW. Development and Validation of an Improved, COPD-Specific Version of the St. George Respiratory Questionnaire. *Chest.* 2007;132(2):456-63.
- 37** Ferrer M, Villasante C, Alonso J, Sobradillo V, Gabriel R, Vilagut G, et al. Interpretation of quality of life scores from the St George's Respiratory Questionnaire. *Eur Respir J.* 2002;19(3):405-13.
- 38** Horvath I, Hunt J, Barnes PJ, Alving K, Antczak A, Baraldi E, et al. Exhaled breath condensate: methodological recommendations and unresolved questions. *Eur Respir J.* 2005;26(3):523-48.
- 39** Barreiro E, Gea J, Matar G, Hussain SN. Expression and carbonylation of creatine kinase in the quadriceps femoris muscles of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2005;33(6):636-42.
- 40** Barreiro E, Gea J, Corominas JM, Hussain SN. Nitric oxide synthases and protein oxidation in the quadriceps femoris of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2003;29(6):771-8.
- 41** Macgowan NA, Evans KG, Road JD, Reid WD. Diaphragm injury in individuals with airflow obstruction. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;163(7):1654-9.
- 42** Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C (T)) Method. *Methods.* 2001;25(4):402-8.

- 43** Barreiro E, Schols AM, Polkey MI, Galdiz JB, Gosker HR, Swallow EB, et al. Cytokine profile in quadriceps muscles of patients with severe COPD. *Thorax*. 2008;63(2):100-7.
- 44** Gea JG, Pasto M, Carmona MA, Orozco-Levi M, Palomeque J, Broquetas J. Metabolic characteristics of the deltoid muscle in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J*. 2001;17(5):939-45.
- 45** Hernandez N, Orozco-Levi M, Belalcazar V, Pasto M, Minguella J, Broquetas JM, et al. Dual morphometrical changes of the deltoid muscle in patients with COPD. *Respir Physiol Neurobiol*. 2003;134(3):219-29.
- 46** Brunelle JK, Chandel NS. Oxygen deprivation induced cell death: an update. *Apoptosis*. 2002;7(6):475-82.
- 47** Gonzalez NC, Wood JG. Alveolar hypoxia-induced systemic inflammation: what low PO<sub>2</sub> does and does not do. *Adv Exp Med Biol*. 2010;662:27-32.
- 48** Tiidus PM. Can oestrogen influence skeletal muscle damage, inflammation, and repair? *Br J Sports Med*. 2005;39(5):251-3.
- 49** Velders M, Diel P. How sex hormones promote skeletal muscle regeneration. *Sports Med*. 2013;43(11):1089-100.
- 50** Patel MS, Natanek SA, Stratakos G, Pascual S, Martinez-Llorens J, Disano L, et al. Vastus lateralis fiber shift is an independent predictor of mortality in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2014;190(3):350-2.
- 51** Barreiro E, Peinado VI, Galdiz JB, Ferrer E, Marin-Corral J, Sanchez F, et al. Cigarette smoke-induced oxidative stress: A role in chronic obstructive pulmonary disease skeletal muscle dysfunction. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010;182(4):477-88.
- 52** Theriault ME, Pare ME, Lemire BB, Maltais F, Debigare R. Regenerative defect in vastus lateralis muscle of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Res*. 2014;15:35.
- 53** Dawson-Hughes B. Serum 25-hydroxyvitamin D and muscle atrophy in the elderly. *Proc Nutr Soc*. 2012;71(1):46-9.
- 54** Coronell C, Orozco-Levi M, Gea J. COPD and body weight in a Mediterranean population. *Clin Nutr*. 2002;21(5):437; author reply -8.

**Table 1.** Demographic characteristics, lung and muscle function, physical activity and exercise.

	Healthy women	Healthy men	COPD women	COPD men
<b>Subjects, n</b>	8	7	21	19
<b>Age, years</b>	62 ± 8.2	61 ± 9	63 ± 8	66 ± 9
<b>BMI, Kg/m<sup>2</sup></b>	25.9 ± 2.4	27.5 ± 3.1	24.8 ± 5.5	24.1 ± 4.3
<b>FFMI, Kg/m<sup>2</sup></b>	18 ± 1.4	19.5 ± 2.2	16.4 ± 2.2 <sup>(*)</sup> , p=0.10)	17.5 ± 2.1 <sup>(*)</sup> , p=0.06)
<b>Smoking status</b>				
Current smokers, n (%)	0	0	7 (33)	5 (26)
Packs-year	0	0	39 ± 15	54 ± 16 <sup>**</sup>
<b>Lung function tests</b>				
FEV <sub>1</sub> , % pred.	102 ± 14	98 ± 7	39 ± 15 <sup>**</sup>	40 ± 14 <sup>**</sup>
% RV/TLC	40 ± 5	39 ± 7	69 ± 11 <sup>**</sup>	65 ± 9 <sup>**</sup>
DLCO, % pred.	104 ± 14	104 ± 7	55 ± 19 <sup>***</sup>	56 ± 21 <sup>**</sup>
PaO <sub>2</sub> , mm Hg	-	-	70 ± 8	71 ± 12
PaCO <sub>2</sub> , mm Hg	-	-	42.8 ± 2.8	40.7 ± 3.6
<b>Physical activity,</b>				
Steps/day	12441 ± 4525	13490 ± 4217	5946 ± 3955 <sup>**</sup>	7327 ± 4158 <sup>*</sup>
METs	1.9 ± 0.4	2.0 ± 0.3	1.5 ± 0.3 <sup>**</sup>	1.4 ± 0.3 <sup>**</sup>
<b>Muscular Strength</b>				
HG	26 ± 9	34 ± 6	21 ± 4	32 ± 5 <sup>***</sup>
HG, % pred.	115 ± 34	120 ± 22	104 ± 22	100 ± 26
QMVC, Kg	45 ± 17	54 ± 12	29 ± 8 <sup>**</sup>	43 ± 11 <sup>(*)</sup> , p=0.09) <sup>**</sup>
QMVC/FFM (%)	119 ± 50	134 ± 26	68 ± 22 <sup>*</sup>	99 ± 35 <sup>* **</sup>
<b>Exercise (6MWT)</b>				
Distance, m	551 ± 67	566 ± 102	363 ± 107 <sup>***</sup>	429 ± 103 <sup>** *</sup>
Distance, % pred.	109 ± 19	106 ± 8	73 ± 20 <sup>***</sup>	86 ± 19 <sup>**</sup>
SpO <sub>2</sub> , %	98 ± 1	98 ± 1	93 ± 3 <sup>**</sup>	94 ± 3 <sup>*</sup>
End-SpO <sub>2</sub> , %	97 ± 1.3	98 ± 1	88 ± 6 <sup>**</sup>	88 ± 6 <sup>**</sup>

Data are presented as mean±SD or as n (%). Abbreviations: BMI, body mass index; FFMI, fat-free mass index; FEV<sub>1</sub>, forced expiratory volume in 1 sec; pred., predicted; RV, residual volume; TLC, total lung capacity; DLCO, diffusing capacity of the lung for carbon monoxide; PaO<sub>2</sub>, partial pressure of oxygen in arterial blood; PaCO<sub>2</sub>, partial pressure of carbon dioxide in arterial blood; MET, metabolic equivalent; HG, handgrip; QMVC, quadriceps isometric maximum voluntary contraction; 6MWT, 6 minute walking test; SpO<sub>2</sub>, oxygen saturation (oxymeter) at baseline; end-SpO<sub>2</sub>, oxygen saturation at the end of the 6MWT. Significance: \*, p≤ 0.05; \*\*, p≤ 0.01; \*\*\*, p≤ 0.001 between healthy and COPD women or healthy and COPD men. \*, p≤ 0.05; \*\*, p≤ 0.01 between COPD men and women.

**Table 2.** Serum measurements of different cytokines

	Healthy women	Healthy men	COPD women	COPD men
CRP, mg/dl	0.47 ± 0.70	0.20 ± 0.51	0.83 ± 116	0.62 ± 1.08
HsCRP, mg/dL	0.16 ± 0.11	0.19 ± 0.12	0,68 ± 0,60 **	0.54 ± 0.41*
Fibrinogen, mg/dl	356 ± 39	341 ± 26	403 ± 91	434 ± 107 *
Ceruloplasmin, mg/dl	26 ± 5	22 ± 4	26 ± 6	28 ± 13
TNF- $\alpha$ , pg/ml	17 ± 4	14 ± 5	25 ± 10 **	24 ± 10 **
IFN-g, pg/ml	153 ± 38	129 ± 30	207 ± 64 **	193 ± 48 ***
VEGF, pg/ml	92 ± 51	90 ± 58	89 ± 60	92 ± 62
PDGF, pg/ml	94 ± 64	97 ± 71	133 ± 162	133 ± 143
G-CSF, pg/ml	327 ± 136	317 ± 172	298 ± 195	320 ± 249
PECAM, ng/ml	49 ± 18	51 ± 17	49 ± 29	48 ± 32
IL-1, pg/ml	19 ± 5	16 ± 4	24 ± 8 *	23 ± 6 **
IL-2, pg/ml	112 ± 22	110 ± 24	142 ± 49 *	140 ± 38 *
IL-4, pg/ml	37 ± 9	36 ± 11	45 ± 13 *	43 ± 8
IL-5, pg/ml	301 ± 62	283 ± 66	395 ± 104 **	368 ± 67 **
IL-6, pg/ml	209 ± 76	182 ± 39	310±107 **	269±81 **
IL-8, pg/ml	67 ± 42	71 ± 38	74 ± 65	78 ± 68
IL-10, pg/ml	214 ± 57	191 ± 32	287 ± 88 *	266 ± 59 ***
IL-12, pg/ml	62 ± 16	61 ± 15	81 ± 29 *	75 ± 19 *
IL-13, pg/ml	80 ± 16	72 ± 14	106 ± 33 *	100 ± 20 ***

Data are presented as mean±SD. Abbreviations: pg, picogram; ml, milliliter; CPR, C-reactive protein; HsCPR, high sensitivity C-reactive protein; TNF, tumour necrosis factor; IFN, interferon; VEGF, vascular endothelial growth factor; PDGF, platelet-derived growth factor; G-CSF, Granulocyte colony-stimulating factor; IL, interleukin; HGF, Hepatocyte growth factor; PECAM, Platelet endothelial cell adhesion molecule. Significance: \*,  $p \leq 0.05$ ; \*\*,  $p \leq 0.01$ ; \*\*\*,  $p \leq 0.001$  between healthy and COPD women or healthy and COPD men.



**Table 3.** Breath condensate measurements of different cytokines in COPD groups and healthy men

	<b>Healthy women</b> (n=7)	<b>COPD women</b> (n=14)	<b>COPD men</b> (n=16)
TNF- $\alpha$ , pg/ml	156 $\pm$ 8	175 $\pm$ 13 *	172 $\pm$ 15
TNF- $\beta$ , pg/ml	108 $\pm$ 16	117 $\pm$ 8	119 $\pm$ 12
IFN-g, pg/ml	618 $\pm$ 93	681 $\pm$ 164	712 $\pm$ 177
IL-1b, pg/ml	26 $\pm$ 18)	29 $\pm$ 13	36 $\pm$ 10
IL-2, pg/ml	488 $\pm$ 44	493 $\pm$ 77	475 $\pm$ 57
IL-4, pg/ml	189 $\pm$ 10	206 $\pm$ 16 *	205 $\pm$ 26
IL-5, pg/ml	115 $\pm$ 21	113 $\pm$ 28	122 $\pm$ 26
IL-6, pg/ml	23 $\pm$ 12	30 $\pm$ 3	31 $\pm$ 4
IL-8, pg/ml	79 $\pm$ 5	86 $\pm$ 8 *	79 $\pm$ 5 †
IL-10, pg/ml	101 $\pm$ 15	128 $\pm$ 19 *	114 $\pm$ 18 (*, p=0.07)
IL-12, pg/ml	79 $\pm$ 24	65 $\pm$ 31	57 $\pm$ 26
VEGF, pg/ml	447 $\pm$ 45	440 $\pm$ 79	431 $\pm$ 76

Data are presented as mean $\pm$ SD. Abbreviations: pg, picogram; ml, milliliter; TNF: tumor necrosis factor; IFN, interferon; IL, interleukin; VEGF, vascular endothelial growth factor. Significances: \*, p $\leq$  0.05 between healthy and COPD women or healthy and COPD men; †, p $\leq$  0.05 between COPD men and women.

**Table 4.** Serum measurements of calcium metabolism parameters.

	Healthy women	Healthy men	COPD women	COPD men
<b>Adjusted calcium,</b> mg/dL	8.8 ± 0.5	8.9 ± 0.5	9.1 ± 0.4	8.6 ± 2.1
<b>Phosphate,</b> mg/dL	3.1 ± 0.3	3.2 ± 0.4	3.3 ± 0.4	2.8 ± 0.4 <sup>+</sup>
<b>Magnesium,</b> mg/dL	1.9 ± 0.1	1.9 ± 0.2	1.8 ± 0.2	1.9 ± 0.1
<b>25(OH) Vit D</b> Δ, ng/dL Δ, %	24.1 ± 9.3 -	17.9 ± 3.6 -	12.1 ± 5.0 * 50 ± 15	14.3 ± 6.2 28 ± 12 <sup>++</sup>
<b>PTH,</b> pg/dL	42 ± 18	48 ± 14	44 ± 23	47 ± 19

Data are presented as mean±SD. Abbreviations: 25(OH)D, 25-hydroxvitamin D; PTH, parathyroid hormone. Significances: \*, p≤ 0.05 between healthy and COPD women. <sup>+</sup>, p≤ 0.05; <sup>++</sup>, p≤ 0.01 between COPD men and women.

**Table 5.** Structural characteristics of the *vastus lateralis* muscle.

	Healthy women	Healthy men	COPD women	COPD men
<b>Fibrillar phenotype</b>				
Type I Fibres, %	43 ± 12	41 ± 11	30 ± 11 *	22 ± 9 <sup>**</sup>
Type II Fibres, %	57 ± 12	59 ± 11	70 ± 11 *	78 ± 9 <sup>**</sup>
CSA type I Fibres, μm <sup>2</sup>	2678 ± 619	3055 ± 625	2457 ± 885	2743 ± 820
CSA type II Fibres, μm <sup>2</sup>	1932 ± 621	2784 ± 758 <sup>+</sup>	1777 ± 504	2384 ± 748 <sup>+</sup>
<b>Injury and repair signs</b>				
Abnormal muscle, %	2.1 ± 0.8	1.7 ± 1.1	3.3 ± 1.4 *	3.3 ± 1.6 *
Internal nuclei, %	0.9 ± 0.4	1.2 ± 0.9	1.2 ± 0.5	1.8 ± 0.5 <sup>**</sup>
Inflammatory cells, %	1.1 ± 0.6	0.9 ± 0.8	1.2 ± 0.7	1.7 ± 0.8
Lipofuscin, %	0.04 ± 0.1	0.06 ± 0.1	0.06 ± 0.1	0.1 ± 0.1
Abnormal fibers, %	0.07 ± 0.2	0.06 ± 0.16	0.43 ± 0.3 *	0.24 ± 0.2
Necrotic fibers, %	0.04 ± 0.06	0.06 ± 0.15	0.45 ± 0.4 *	0.23 ± 0.2
Abnormal + Necrotic fibers, %	0.12 ± 0.2	0.16 ± 0.3	0.85 ± 0.6 *	0.4 ± 0.3 <sup>**</sup>

Data are presented as mean±SD. Abbreviations: CSA, cross sectional area. Significance: \*, p≤ 0.05 between healthy and COPD women or healthy and COPD men; <sup>+</sup>, p≤ 0.05 between COPD men and women.

**Table 6.** Transcriptome expression (in arbitrary units) of different factors of myogenesis and cytokines in the vastus lateralis muscle.

	Healthy women	Healthy men	COPD women	COPD men
Pax7	1 ± 0.5	0.7 ± 0.5	1.2 ± 0.6	0.6 ± 0.6 *
MyF5	1 ± 0.5	0.7 ± 0.5	1 ± 0.6	0.6 ± 0.3 *
Myo-D	1 ± 0.3	0.8 ± 0.2	0.7 ± 0.2	0.6 ± 0.2
Miogenin	1 ± 0.4	1.2 ± 0.3	1.5 ± 0.6	1.3 ± 0.9
MyHC3-emb	1 ± 0.7	1.2 ± 1.2	1.4 ± 1.4	1.5 ± 1.3
MyHC8-peri	1 ± 0.7	1.4 ± 0.9	1.3 ± 1.1	1.1 ± 0.8
M-Cadherin	1 ± 0.4	1.1 ± 0.5	1.3 ± 0.4	0.8 ± 0.4 *
NCAM	1 ± 0.4	1.3 ± 0.3	1.2 ± 0.9	1.2 ± 0.7
CAV3	1 ± 0.4	0.9 ± 0.5	0.9 ± 0.4	0.8 ± 0.4
ITGβ	1 ± 0.5	1 ± 0.2	1.1 ± 0.4	0.6 ± 0.2 *
TNF-α	1 ± 0.4	1.1 ± 0.4	0.8 ± 0.4	0.7 ± 0.7
TNF-α RI	1 ± 0.6	1.1 ± 0.7	1.7 ± 0.7	0.9 ± 0.6 *
TNF-α RII	1 ± 0.3	0.8 ± 0.4	1.1 ± 0.6	1.2 ± 0.6
IL-1β	1 ± 0.5	0.8 ± 0.4	0.7 ± 0.5	0.7 ± 0.8
IL-1β Receptor	1 ± 0.4	1.3 ± 0.7	1.3 ± 0.6	1 ± 0.6
IL-6	1 ± 0.7	0.6 ± 0.8	1.3 ± 1.2	1.7 ± 1.6
IL-6 Receptor	1 ± 0.2	1.1 ± 0.3	1.1 ± 0.6	0.8 ± 0.2
IGF-1	1 ± 0.4	0.8 ± 0.4	0.9 ± 0.4	0.6 ± 0.3 *
IGF-1 Receptor	1 ± 0.3	1.1 ± 0.5	1.5 ± 0.8	0.7 ± 0.4 *

Data are presented as mean ± SD. Abbreviations: Pax7, paired box protein Pax7; MyF5, myogenic factor 5; Myo-D, myogenic differentiation 1; MyHC-emb, embryonic myosin heavy chain; MyHC-peri, perinatal myosin heavy chain; NCAM, neural cell adhesion molecule; CAV3, Caveolin 3; ITG β, integrin β; TNF, tumor necrosis factor; R, receptor; IL interleukin; IGF-1, insulin-like growth factor 1. Significance: \*, p ≤ 0.05 differences between COPD men and women.

**Table 7.** Muscle measurements of different cytokines.

	Healthy women	Healthy men	COPD women	COPD men
TNF- $\alpha$ , pg/ml	16 $\pm$ 14	19 $\pm$ 14	18 $\pm$ 11	17 $\pm$ 16
IFN $\gamma$ , pg/ml	71 $\pm$ 27	58 $\pm$ 33	97 $\pm$ 68	94 $\pm$ 83
IL-1b, pg/ml	1.7 $\pm$ 0.7	1.7 $\pm$ 0.6	2.1 $\pm$ 1.1	2.4 $\pm$ 0.9
IL-6, pg/ml	9.2 $\pm$ 3.4	19,5 $\pm$ 2,1	18,2 $\pm$ 21	18,5 $\pm$ 24
IL-10, pg/ml	4.4 $\pm$ 3.0	-	5.0 $\pm$ 5	6.4 $\pm$ 9.2
VEGF, pg/ml	60 $\pm$ 39	62 $\pm$ 26	35 $\pm$ 45	48 $\pm$ 37
TNF- $\alpha$ RI, pg/ml	18 $\pm$ 5	-	35 $\pm$ 22 *	42 $\pm$ 9
TNF- $\alpha$ RII, pg/ml	44 $\pm$ 19	-	175 $\pm$ 139 **	91 $\pm$ 38 †

Data are presented as mean $\pm$ SD. Abbreviations: pg, picogram; ml, milliliter; TNF, tumor necrosis factor; IFN, interferon; IL, interleukin; VEGF, vascular endothelial growth factor; R, receptor. Significance: \*,  $p \leq 0.05$ ; \*\*,  $p \leq 0.01$  between healthy and COPD women or healthy and COPD men; †,  $p \leq 0.05$  between COPD men and women.

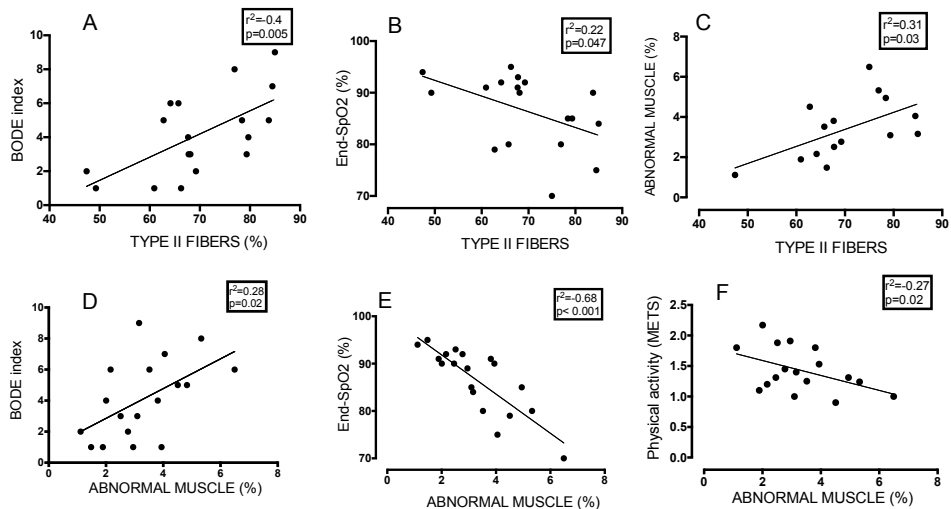


Figure: **A:** Correlation between Type II fibers and BODE index. **B:** Inverse correlation between Type II Fibers and Oxygen saturation (SpO<sub>2</sub>) at the end of 6 minutes walking test (End-SpO<sub>2</sub>). **C:** Relationship between type II fibers and percentage of abnormal muscle. **D:** Correlation between percentage of abnormal muscle and BODE index. **E:** Inverse correlation between percentage of abnormal muscle and End-SpO<sub>2</sub>. **F:** Inverse correlation between physical activity measured by the metabolic equivalent (METs) and percentage of abnormal muscle.

