



**UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE MEDICINA
COMISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO.
CURSO DE ESPECIALIZACIÓN EN NEUMONOLOGÍA CLÍNICA
HOSPITAL UNIVERSITARIO DE CARACAS**

**ENFERMEDAD PULMONAR OBSTRUCTIVA CRÓNICA: NIVELES DE NFκB
COMO MARCADOR INFLAMATORIO**

Trabajo Especial de Grado que se presenta para optar al Título de Especialista en
Neumonología Clínica.

María Eugenia Laucho Contreras

Tutora: Dra. Sonia Torres de Hecker

Caracas, 01 de octubre de 2012.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Montes de Oca y la Dra. Sonia Torres que con infinita paciencia me guiaron durante todo este proceso y me ayudaron a comprender que es un investigador.

Al Dr. Eduardo García y el Dr. Abdón Mata por ayudarme con la recolección de datos de mis pacientes.

A todos los pacientes que hicieron posible que con su entrega me ayudaron a realizar este trabajo.

DEDICATORIA

A mis hermanos que siempre me han apoyado, y a las dos mujeres que mas admiro mi madre y mi tía Nelly por su constancia, honestidad, inteligencia y que fueron las que me enseñaron a que todo tiene una explicación lógica, solamente hay que buscarla.

A mi esposo Abdon, que con su amor y lealtad incondicional me ayudaron a realizar este proyecto, sin su esfuerzo y sus palabras de aliento no se habría materializado esta investigación.

A mi profesor de bioquímica Dr. Clímaco Cano, que tempranamente me enseñó que las explicaciones mas simples (no las mas sencillas) son las que hacen ideas brillantes, y que todo debe verse de forma tridimensional.

A mis profesores de post grado Dr. Tálamo, Dra. Montes de Oca, Dra. Lugli, Dr. JR García, Dr. Silva, Dr. Acuña y Dr. Levy; y a mis compañeros de post grado por sus enseñanzas y apoyo.

A Dios que siempre está a mi lado en cada paso.

Enfermedad pulmonar obstructiva crónica: Niveles de NFκB como marcador inflamatorio
María Eugenia Laucho Contreras, C.I. 14.136.449. Sexo: Femenino, E-mail:
mlauch@gmail.com. Telf: 0414-2034999. Dirección: Hospital
 Universitario de Caracas. Especialización: Neumonología Clínica

RESUMEN

Objetivo: determinar los niveles de marcadores inflamatorios en pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y controles y su relación con el índice de masa magra (IMM). Métodos: se estudiaron 29 pacientes con EPOC (63,8±8,9 años, VEF₁ 44,9±17,1%) y 13 controles (58,7±8,5 años). Se realizó biopsia muscular, para determinar niveles de inhibidores del factor nuclear kappa B alfa y beta (IκBα, IκBβ) y subunidades del factor nuclear kappa B p65 y p50 (NFκB p65, NFκB p50). También se realizó determinación de los niveles plasmáticos del factor de necrosis tumoral alfa (TNFα) e interleukina 6 (IL6), IMM, espirometría y caminata de 6 minutos (C6M). Resultados: el NFκB p65 (1,61±0,68 AU vs 0,10±0,47 AU; p<0,05), el TNFα y la IL6 (6,79±9,39 pg/mL vs 1,80±0,98 pg/mL; p<0,05; 3,09±1,22 pg/mL vs 1,10±0,91 pg/mL; p<0,05 respectivamente) fueron mayores en los pacientes comparados con los controles. Los pacientes con IMM baja presentaron un NFκB p65 menor (1,24±0,59 AU vs 1,51±0,71 AU; p<0,05) y un NFκB p50 mayor (0,93±0,77 AU vs 0,41±0,26 AU; p<0,05) comparado con los de IMM normal. Se observó correlación directa entre los niveles de NFκBp65 y el grado de obstrucción en la capacidad vital forzada (CVF) y el volumen espiratorio forzado en el primer segundo (VEF₁) de los pacientes (r:0,53; p<0,01; r:0,49 p<0,01 respectivamente). Conclusión: la presencia de inflamación no se asocia a la disminución de la masa magra, y que ésta probablemente se asocia a la activación de la vía no clásica descrita en atrofia por desuso, cuyos mecanismos disparadores no están aclarados.

Palabras claves: EPOC, Índice de Masa Magra, Factor Nuclear Kappa B, TNFα e IL6.

ABSTRAC

Chronic obstructive pulmonary disease: NFκB levels as inflammatory markers

Objective: to determinate the levels of inflammatory markers in chronic obstructive pulmonary disease (COPD) patients and healthy controls and their relationship with the fat free mass index (FFMI). Methods: there were 29 COPD patients (63.8±8.9 years, FEV₁ 44.9±17.1 %) and 13 healthy controls (58,7±8,5 years) studied. Needle biopsies of the vastus lateralis muscles were performed and the protein content of NFκB and the NFκB-inhibitory protein IκB were measured. Also, tumour necrosis factor alfa (TNFα) and interleukin 6 (IL-6) plasma levels were measured, six min walk distance (6MWD) and spirometry were performed. Results: COPD patients compared to control subjects showed higher muscle levels of NFκB p65 (1.61±0.68 AU vs. 0.10±0.47 AU; p<0.05), and plasma TNFα and IL6 (6.79 ± 9.39 pg/mL vs.1.80 ± 0.98 pg/mL; p<0.05; 3.09 ± 1.22 pg/mL vs. 1.10 ± 0.91 pg/mL; p<0.05, respectively). Cachectic COPD patients showed lower NFκB p65 (1.24 ± 0.59 AU vs. 1.51 ± 0.71 AU; p<0.05) and higher NFκB p50 (0.93 ± 0.77 AU vs. 0.41±0.26 AU; p<0.05) compared to non-cachectic COPD patients. There was a direct correlation between the NFκB p65 levels and degree of obstruction in forced vital capacity (FVC) and forced expiratory volume in first second (FEV₁) in COPD patients (r:0,53; p<0,01; r:0,49 p<0,01 respectively). Conclusions: the inflammation is not associated with develop of cachexia in COPD patients, and may be it is due to activation of the non-canonical pathway that is related with atrophy for disuse.

Key words: COPD, Fat Free Mass Index, Nuclear Factor Kappa B, TNFα e IL6.

ÍNDICE

	Páginas
Resumen	
Introducción	6
Métodos	18
Resultados	23
Discusión	25
Referencias	33
Anexos	39

INTRODUCCIÓN

La disfunción del músculo esquelético es una de las manifestaciones extrapulmonares de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) que más afecta la calidad de vida del paciente, ya que limita las actividades cotidianas de su vida diaria. Los mecanismos fisiopatológicos mediante los cuales se produce esta disfunción de músculos esqueléticos no están aclarados, aunque la inmovilización, la hipoxia, los esteroides sistémicos, el estrés oxidativo y la inflamación parecen contribuir en mayor o menor medida.

Desde el punto de vista molecular el equilibrio entre la síntesis y la degradación de las fibras musculares es lo que permite mantener el músculo esquelético funcional. Las vías de señalización implicadas no están establecidas, sin embargo se cree que el factor nuclear kappa b (NFκB) a través de la activación de citoquinas como el factor de necrosis tumoral alfa (TNFα) o las interleukinas (IL-6, IL-8, IL-2), inclina este balance hacia la disminución de la síntesis y el aumento de la degradación dichas fibras musculares en los pacientes con EPOC.

La hipótesis en este estudio fue que en la fisiopatogenia de la disfunción de las fibras musculares en los pacientes con EPOC la inflamación sistémica y local juega un papel primordial y por esto, los factores que se encuentran en la producción del estado inflamatorio, como el NFκB, la IL6 y el TNFα, deben estar aumentados en los pacientes con EPOC que presenten atrofia muscular o caquexia.

Planteamiento del problema

La enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), se define como un “proceso patológico que se puede prevenir y tratar, y se caracteriza por una limitación del flujo aéreo que no es completamente reversible. La limitación del flujo aéreo es, por lo general, progresiva, y se asocia con una respuesta inflamatoria pulmonar anormal a partículas o a gases nocivos, principalmente causada por el tabaquismo. Aunque la EPOC afecta a los pulmones, también produce consecuencias sistémicas importantes”⁽¹⁾.

Esto nos pone de manifiesto que aunque la EPOC es una enfermedad primeramente de los pulmones, tiene manifestaciones secundarias sistémicas importantes cardiovasculares, neoplásicas, metabólicas, óseas, etc.⁽²⁻⁵⁾ En este grupo se incluye la caquexia y la disfunción de músculos esqueléticos, todo esto contribuye como factor independiente del funcionalismo pulmonar al deterioro del estado de salud del paciente y está reconocido como predictor de mortalidad⁽⁶⁾. En vista de ello se plantea el siguiente problema: ¿Cuál será el comportamiento de los niveles de factor nuclear kappa B (NFκB) en los músculos esqueléticos de los pacientes con EPOC en relación con la condición nutricional?.

Justificación del problema

Esta enfermedad es una patología que ha crecido exponencialmente en la última década, y se espera que vaya en aumento en los próximos 20 años. Schols et al⁽⁶⁾ demostraron que los efectos sistémicos sobre los músculos esqueléticos (atrofia y

disfunción muscular) son unos factores de mortalidad independientes del volumen espiratorio forzado en el primer segundo (VEF₁). Esto ha hecho que el interés por la etiopatogenia de esta disfunción sea elevado, sin embargo todavía no existe una explicación única y se asume que su origen es multifactorial ⁽²⁻⁵⁾.

En tiempos recientes se ha estudiado ampliamente la disfunción de músculos esqueléticos, y se han formulado diferentes hipótesis sobre su patogenia. Entre los agentes etiológicos propuestos se encuentran el efecto de decondicionamiento secundario a la inactividad y el sedentarismo que conlleva la EPOC, las alteraciones nutricionales, el proceso inflamatorio sistémico y estrés oxidativo, la hipoxia crónica y el efecto de los esteroides ^(4,5,7-10).

Entre todas estas causas la inflamación crónica se ha postulado como una de los principales factores de disfunción de los músculos esqueléticos en la EPOC. Las moléculas que han recibido mas atención son el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), la interleukina 1 β (IL1 β), la interleukina 6 (IL6), proteína C reactiva (PCR), y los radicales libres de oxígeno ^(7,11-16). Estos marcadores inflamatorios estudiados han resultado elevados en pacientes con EPOC que fallan en la recuperación de peso, o están asociados a un aumento en la pérdida de energía ^(7,11). Así podemos lógicamente relacionar que siendo el NF κ B un elemento importante en la patogénesis de la inflamación, se debe estudiar a los pacientes con EPOC para determinar si juega un papel importante en la fisiopatología de la caquexia en dicha población ^(11, 16-18). La importancia de esto radica que el entendimiento cabal de la patogenia de esta disfunción en los pacientes con EPOC nos ayuda a identificar cuales son

los blancos terapéuticos que en un futuro puedan ser modificados para mejorar la calidad de vida de una población que crece exponencialmente con el tiempo.

Delimitación

Se estudió la población de pacientes con diagnóstico de EPOC tomados de la consulta externa del Servicio de Neumonología del Hospital Universitario de Caracas, y los controles se tomaron de la población en general desde abril 2011 hasta noviembre 2011. Se dividieron estos pacientes según su estado nutricional, los pacientes a su vez fueron divididos en grupos, y tanto los pacientes como a los controles se les practicó una biopsia muscular para medir el Factor Nuclear κ B y sus inhibidores. Asimismo se les tomó muestra de sangre para medir $\text{TNF}\alpha$ e interleukina 6.

Marco teórico

Enfermedad pulmonar obstructiva crónica y disfunción muscular periférica.

La Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica se acompaña de múltiples manifestaciones sistémicas entre ellas desde hace mas de una década numerosos estudios han estado dedicados a establecer el impacto y la etiología de la disfunción de los músculos esqueléticos en estos pacientes. Sin embargo, el funcionalismo pulmonar se ha asociado de manera moderada o leve con la actividad física, lo que sugiere que hay otros factores que contribuyen en esta noxa ^(2-5,8-10).

En relación a la miopatía en pacientes con EPOC se ha evidenciado que hay alteraciones tanto en la función como en la estructura del músculo esquelético. Cuando hablamos de función nos referimos a la fuerza y a la resistencia muscular. Hay un 20 – 30 % de disminución de fuerza muscular (definida como la capacidad de un músculo de realizar un trabajo) en las fibras musculares de los miembros inferiores de pacientes con EPOC moderada a severa en comparación con pacientes controles, y constituye un predictor de mortalidad importante. La resistencia (definida como la capacidad de un músculo de mantener una fuerza en el tiempo) también se ha encontrado disminuida en un 30% y se ha relacionado con una capacidad oxidativa mitocondrial reducida y el desarrollo del estrés oxidativo en el músculo ⁽¹⁹⁾.

Los cambios estructurales se encuentran manifestados por la atrofia de la fibra del músculo esquelético establecido por una disminución en el área transversal, el cambio en la proporción de las fibras musculares que se presenta como una reducción en la proporción de las fibras tipo I (contracción lenta oxidativa) y un aumento de las fibras tipo IIX (contracción rápida glicolítica); estas últimas desarrollan altas tensiones rápidamente y dependen del metabolismo anaeróbico por lo que tienden a la fatiga ^(20,21).

La mayoría de los investigadores convergen en la hipótesis de que la disfunción de músculos esqueléticos es multifactorial. Entre los factores etiológicos que se consideran relevantes se encuentran: la hipoxia, la hipercapnia, los medicamentos, estado nutricional, el balance energético, la inflamación local o sistémica, estrés oxidativo y la susceptibilidad genética ^(8,10,17,19).

Factor nuclear kappa B, inflamación y estrés oxidativo.

La inflamación sistémica se ha estudiado como uno de los agentes etiológicos mas importantes en la miopatía del paciente con EPOC. Entre los diversos componentes de la cascada inflamatoria que se han identificado en pacientes con estados de inflamación crónica (Ej. EPOC) y disfunción de músculos esqueléticos, el Factor de Necrosis Tumoral- α (TNF α), el cual es una de las principales citoquinas, y que también se ha visto elevado en los pacientes que fallan en la ganancia de peso durante la rehabilitación ^(4,8-11).

En los estados inflamatorios crónicos que se asocian a disfunción de músculos esqueléticos predomina un desbalance entre la degeneración, la apoptosis y regeneración de las fibras musculares. En condiciones normales la regeneración de estas fibras se realiza ocurre durante las actividades habituales, y se incrementa en condiciones de aumento de carga, daño muscular o en rehabilitación después de inactividad prolongada. Las células precursoras de las fibras musculares de reserva se llaman células satélites; después de activadas estas células proliferan (en este estadio se llaman mioblastos), transformándose en fibras musculares. Las lesiones en estas células derivan en interferencias en su habilidad para proliferar, diferenciarse y por último resulta en pérdida del músculo esquelético ^(7,14). El TNF α interfiere en todos estos pasos, sin embargo su actividad individual no es suficiente para la degradación de músculos maduros, para lo cual se necesitan además citoquinas, interleukinas (IL 1, IL 6, IL8) e interferón γ ^(7,9,10,12,15).

La familia del NFκB se refiere a los factores de transcripción eucarióticos relacionados en la familia Rel, constituidos por cinco miembros que pueden ser divididos en dos grupos. En un grupo se incluye el RelA (subunidad p65), RelB y c-Rel que se caracterizan por la presencia de un dominio N terminal Rel (RHD) esencial para ligarse a las secuencias de ADN, y por un dominio de activación transcripcional C terminal. El otro grupo está constituido por las proteínas NFκB1 (subunidad p50) y NFκB2 (subunidad p52) que son sintetizadas a partir de precursores denominados p105 y p100, y contienen un RHD N-terminal pero carecen del dominio transcripcional C-terminal activo ^(22,23).

El heterodímero prototipo del NFκB es el p50-p65 porque es el que se encuentra ampliamente distribuido en las células y es el responsable de la transcripción de muchos genes de supervivencia y moléculas proinflamatorias, sin embargo la subunidad p50 puede también ligarse a los sitios de ADN nuclear y actuar como un represor o activador, aunque sus mecanismos no son bien conocidos. Antes de la activación de los dímeros del NFκB la mayoría se encuentra ligados a unos inhibidores en el citoplasma denominados inhibidores del NFκB (IκBs), los cuales se dividen en siete grupos (IκBα, IκBβ, IκBε, IκBγ, BCL-3, y los precursores p100 y p105), estos actúan ocultando la localización nuclear de la secuencia del dímero NFκB, previniendo su traslocación nuclear manteniéndolo en un estado inactivo en el compartimiento citoplasmático ^(22,23).

La activación del NFκB se realiza mediante dos vías, una vía clásica que es activada por el TNFα entre otras citoquinas, que a través de la fosforilación del complejo de quinasas IκB (IKK) causa la degradación de los IκBs que se encuentran unidos al NFκB. Este último se trasloca al núcleo ligándose al ADN y se ha propuesto que estimula la expresión defectuosa de los genes musculares específicos (*ADNMyoD*) que ayudan a la diferenciación de los mioblastos. La activación del NFκB mediada por el TNFα se realiza en dos fases. La primera fase es potente y transitoria, la segunda fase es igualmente potente pero de mayor duración y esto está relacionado con la duración y la fuerza de la respuesta ^(7,14,22,23). La vía no clásica de activación del NFκB es menos conocida, sus mecanismos disparadores no se han identificado. Se realiza a través de la degradación proteosómica de los precursores p100 y p105, liberando a la molécula p50 y p52, sin intervención de la activación de la subunidad p65. Esta subunidad p50 se une a la proteína BCL-3 y permite la traslocación nuclear, regulando la transcripción de algunos genes que se han ligado a la atrofia muscular por desuso, de una manera independiente a la inflamación sistémica ⁽²²⁻²⁵⁾.

Se ha propuesto que el NFκB activado por el TNFα (vía clásica), a través de sus segundos mensajeros incrementa la degradación de proteínas por aumento en la expresión de las proteasas y además produce la inhibición de la regeneración muscular a través del estrés oxidativo. El NFκB regula la expresión de varios genes, entre estos citoquinas, quimocinas, moléculas de adhesión (ICAM, VCAM, selectina E) y enzimas inducibles efectoras (como la enzima sintasa inducible de óxido nítrico [iNOS]). El TNFα también induce la iNOS, lo que produce óxido nítrico (NO) que a su vez es un mediador de gran importancia en la respuesta inflamatoria sistémica y que se ha estudiado a través de sus

productos de degradación reportándose elevado en los pacientes con EPOC y disfunción de músculos esqueléticos ^(8,12,15,18,22,26).

Antecedentes

Di Francia et al ⁽¹³⁾ demostraron en pacientes con similar función pulmonar y tiempo de la EPOC que los niveles de TNF α estaban elevados significativamente en los pacientes con pérdida de peso inexplicable, en comparación con aquellos pacientes con EPOC y peso normal y los controles sanos, concluyendo que hay una mayor producción de este marcador inflamatorio. Creutzberg et al ⁽¹¹⁾ realizaron estudios en pacientes con EPOC que no presentaban ganancia de peso después de ingesta calórica aumentada, encontrando niveles significativamente elevados de TNF α , lo que sostiene la teoría de que la inflamación es responsable de la caquexia en esta población.

Wagner, ⁽¹⁷⁾ en una revisión reciente sobre los mecanismos de desarrollo de caquexia en pacientes con EPOC, expone que a pesar de haber numerosos estudios sobre el papel de TNF α en esta patología, se puede demostrar que en los estudios mas antiguos había una clara correlación entre la patogenia y el TNF α , pero en estudios mas recientes no se han podido identificar polimorfismos de esta molécula, e incluso los niveles absolutos no se reportan elevados, lo que sugiere probable falta de especificidad en los métodos diagnósticos empleados en el pasado.

El TNF α es una molécula que permite la activación del factor nuclear κ B (NF κ B), que a su vez activa los genes responsables de la degeneración de las fibras musculares. Langen et al ⁽⁷⁾ demostraron esto en un modelo animal en el que el TNF α a través del incremento de la proteólisis de factor MyoD por el NF κ B, interfiriendo en la regeneración muscular. Ladner et al ⁽¹⁴⁾ por otra parte demostraron la activación bifásica del NF κ B evidenciando que hay una fase que permite que esta respuesta sea sostenida en el tiempo lo que explicaría su cronicidad.

El estrés oxidativo también juega un papel importante en la etiopatogenia de la disfunción de músculos esqueléticos⁽¹²⁾. Montes de Oca et al ⁽¹⁵⁾ estudiaron el estrés nitrosativo y diferentes marcadores de inflamación teniendo como resultado aumento de los niveles de la enzima sintasa inducible de óxido nítrico (iNOS) que promueve la producción y liberación del óxido nítrico (NO), y además de la nitrotirosina en el músculo de pacientes con EPOC. El NO puede ser parte de los procesos fisiológicos en el músculo esquelético, sin embargo en alta concentraciones puede ser citotóxico. Por otra parte, la nitrotirosinación de las proteínas puede facilitar la degradación proteica por la vía de ubiquitinas-proteosomas.

Agustí et al ⁽¹⁸⁾ realizaron un estudio en pacientes con EPOC comparando aquellos con índice de masa corporal normal y bajo, presentando estos últimos 30% de incremento en la unión de NF κ B con su ligando nuclear y con una expresión disminuida del inhibidor del factor nuclear κ B (I κ B α) y aumento en los niveles de iNOS en el músculo esquelético, lo cual puede ser una vía molecular que contribuye a la atrofia muscular en estos pacientes.

Por otra parte se ha propuesto como una teoría que para que se produzca atrofia muscular, se deben activar factores de transcripción como el NF κ B, que comanda una vía que permite la activación de proteosomas y de disminución de síntesis de ARNm *MyoD*; esto resulta en una producción menor de las proteínas del músculo esquelético y eventualmente la muerte del tejido ^(12,19,20).

Objetivos

Objetivo general:

Determinar los niveles de marcadores inflamatorios en músculo esquelético y plasma de pacientes con EPOC con diferentes condiciones nutricionales, determinados sobre la base de la composición corporal.

Objetivos específicos

1. Evaluar y definir el estado nutricional del paciente con enfermedad pulmonar obstructiva crónica en base al índice de masa magra.
2. Determinar los niveles de marcadores inflamatorios en músculo esquelético (NF κ Bp65, NF κ Bp50, I κ B α , I κ B β) en los pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica y sujetos controles de similar grupo etario.
3. Comparar los niveles de marcadores inflamatorios en músculo esquelético (NF κ Bp65, NF κ Bp50, I κ B α , I κ B β) entre los EPOC y los sujetos controles.

4. Comparar los niveles de marcadores inflamatorios en músculo esquelético (NF κ Bp65, NF κ Bp50, I κ B α , I κ B β) entre los pacientes con EPOC en diferentes condiciones nutricionales.
5. Determinar los niveles de marcadores inflamatorios en plasma (TNF α , IL6) en los pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica y sujetos controles de similar grupo etario.
6. Comparar los niveles de marcadores inflamatorios en plasma (TNF α , IL6) entre los EPOC y los sujetos controles
7. Comparar los niveles de marcadores inflamatorios en plasma (TNF α , IL6) entre los pacientes con EPOC en diferentes condiciones nutricionales.

MÉTODOS

Tipo de estudio

Este es un estudio prospectivo, transversal de estudio de casos y controles.

Población y muestra

Se estudiaron un total de 29 pacientes procedentes de la consulta externa del Servicio de Neumonología del Hospital Clínico Universitario, con diagnóstico de EPOC de acuerdo a los criterios de la iniciativa global para la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (GOLD, por sus siglas en inglés) ⁽²⁷⁾ y 13 individuos sanos de similar grupo etario que se tomaron como controles. A todos los individuos se le explicaron los objetivos y los procedimientos a realizar durante el estudio, con lo cual estuvieron de acuerdo y firmaron el consentimiento informado.

Criterios de inclusión:

1. Diagnóstico de EPOC acorde a criterios espirométricos de la GOLD.
2. Condición clínica estable para el momento del estudio y recibiendo tratamiento broncodilatador adecuado.

Criterios de exclusión:

1. Enfermedades neuromusculares de cualquier tipo.
2. Alcoholismo crónico.

3. Pacientes en programas de entrenamiento físico
4. Endocrinopatías (Diabetes mellitus)
5. Uso crónico de esteroides sistémicos.
6. Enfermedades neoplásicas.
7. Enfermedades inmunológicas
8. Otras enfermedades pleuropulmonares asociadas.

Los pacientes con EPOC se distribuyeron en 2 grupos de acuerdo al índice de masa magra:

- 19 pacientes con EPOC con índice de masa magra normal (femeninos $\geq 15 \text{ Kg/m}^2$ y masculinos $\geq 16 \text{ Kg/m}^2$)
- 10 pacientes con EPOC con índice de masa magra bajo (femeninos $< 15 \text{ kg/m}^2$, masculinos $< 16 \text{ Kg/m}^2$).

Procedimientos y técnicas

A todos los pacientes se les realizó: pruebas de función pulmonar; caminata de 6 minutos; evaluación de los músculos periféricos a través de la realización de biopsia muscular, medición de niveles en músculo de los inhibidores de factor nuclear kappa B ($\text{I}\kappa\text{B}\alpha$, $\text{I}\kappa\text{B}\beta$) y de las subunidades del factor nuclear kappa B p65 y p50 ($\text{NF}\kappa\text{B}$ p65, $\text{NF}\kappa\text{B}$ p50), y se determinaron los niveles en plasma de $\text{TNF}\alpha$ e IL6.

1) Prueba de función pulmonar

La espirometría simple, se realizó con un espirómetro MedGraphics Cardio2 System. Los valores de capacidad vital forzada (CVF), volumen espiratorio forzado al primer segundo (VEF_1) y la relación de VEF_1/CVF , fueron calculados siguiendo las recomendaciones de la Sociedad Americana del Tórax (ATS). Los resultados están expresados en valores y en porcentajes de lo esperado ⁽²⁸⁾.

2) Caminata de seis minutos

La caminata de seis minutos (C6M) se llevó a cabo en un pasillo libre que mide 22 metros de largo. Se realizaron 2 caminatas el mismo día, separadas por un periodo de treinta minutos. Los pacientes fueron instruidos y estimulados a caminar enérgicamente por un periodo de 6 minutos, siendo permitido descansar durante este intervalo si el paciente así lo requiere. Durante la prueba se midió la distancia recorrida en el tiempo preestablecido y la SaO_2 con un oxímetro de pulso. También se determinó tanto en reposo como a máximo esfuerzo, la frecuencia cardíaca y la intensidad de la disnea utilizando la escala visual. La distancia recorrida se registró en metros, y se escogieron los valores máximos alcanzados entre las dos pruebas ⁽²⁹⁾.

3) Evaluación de los músculos periféricos.

Para la evaluación de las características de los músculos esqueléticos (ME), se practicó biopsia muscular del vasto lateral (músculo cuádriceps) con aguja de Bergstrom a todos los pacientes que entraron en el protocolo.

Las proteínas musculares (40mg) se separaron por SDS-PAGE al 10 % y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Después de bloquear en una solución salina Tris-buffered con 5 % de leche no grasa seca, las membranas se incubaron durante toda la noche a 4°C con anticuerpos anti I κ B α (Cell signaling, Beverly, MA), I κ B β (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), NF κ B p50 (Cell Signaling), NF κ B p65 (Santa Cruz Biotechnology), IKK β (Cell Signaling) y fosfo-IKK β (Ser177/181) (Cell Signaling). Para todas estas proteínas se usó una membrana de nitrocelulosa de 0,45 μ m. Los anticuerpos ligados fueron detectados con anticuerpos completos contra inmunoglobulina de conejos, asociados a peroxidasa de rábano, usando agente quimioluminiscentes mejorados (PerkinsElmer Life Science, Boston, MA.) Las membranas fueron expuestas a la película y la intensidad de la banda fue cuantificada usando el software Image Tool (University of Texas Health Science Center en San Antonio, TX).

Las concentraciones de TNF α y la Interleukina 6 en plasma se determinaron usando un ensayo inmunoabsorbente unido a enzimas (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA).

4) Medición del Estado nutricional:

Se realizó con cinta métrica, peso y balanza médica calibrados, el índice de masa corporal (IMC) se midió a través de la fórmula estándar que es la relación entre el peso en kilogramos y la talla en metros al cuadrado. El índice de masa magra (IMM) se obtuvo a través del analizador corporal Tanita, modelo TBF-300^a.

Análisis estadístico

Los resultados de las características antropométricas, nutricionales (composición corporal), función pulmonar, y los valores de los marcadores inflamatorios de los músculos esqueléticos y en plasma se expresaron como media \pm desviación estándar (SD). Para determinar las diferencias de todos estos parámetros entre los grupos de pacientes y los controles, entre los pacientes con IMM normal y bajo se utilizó la prueba no paramétrica de Mann Whitney U Test. Dichos resultados están presentados en tablas y gráficos.

Para comparar los valores de los marcadores inflamatorios entre los tres grupos de individuos evaluados (pacientes con IMM normal, pacientes con IMM bajo y sujetos controles) se utilizó el método no paramétrico Kruskal-Wallis. Los resultados están representados en gráficos.

Las relaciones entre los marcadores inflamatorios y las pruebas de función pulmonar en pacientes con EPOC fueron evaluadas con el método de correlación de Pearson. Se aceptó un nivel de significación estadística menor de 0,05 ($p < 0,05$)

RESULTADOS

Se evaluaron 42 sujetos, 29 eran pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (17 masculinos y 12 femeninos) y 13 controles (10 femeninos y 3 masculinos). En el grupo de pacientes con EPOC, 19 tenían un índice de masa magra (IMM) normal y 10 presentaban IMM bajo (sexo masculino 12 con IMM normal y 5 con bajo IMM y sexo femenino 7 con IMM normal y 5 con IMM bajo).

La tabla 1 muestra las características clínicas de los controles y pacientes. Se evidencia que el peso, el índice de masa corporal, la función pulmonar y los metros recorridos en la caminata de 6 minutos fueron significativamente menores en el grupo de pacientes con EPOC en comparación con los controles ($p < 0,05$); el resto de las variables (edad, talla, IMM) fueron similares en ambos grupos.

Los marcadores inflamatorios medidos en músculo ($I\kappa B\alpha$, $I\kappa B\beta$, $NF\kappa B$ p50, $NF\kappa B$ p65) se muestran en la tabla 2. El factor nuclear kappa B p65 ($NF\kappa B$ p65) fue significativamente mayor en los pacientes comparado con el grupo control, el resto de los marcadores inflamatorios musculares fueron similares. En los gráficos 1 y 2 se muestran los marcadores inflamatorios medidos en plasma, la IL6 y el $TNF\alpha$; ambos fueron significativamente mayores en los pacientes con EPOC en comparación con el grupo control.

En la tabla 3 se muestran las características clínicas (variables antropométricas, función pulmonar y metros recorridos en la caminata de 6 minutos) de los pacientes

discriminados de acuerdo con el índice de masa magra. En los pacientes con IMM baja fueron significativamente menores el peso y el índice de masa corporal. En relación a las pruebas de función pulmonar observamos que los pacientes con un IMM baja presentan un VEF_1 menor.

En las graficas 3 y 4 se muestran la diferencias significativas encontradas en los marcadores inflamatorios entre los tres grupos estudiados (pacientes con IMM bajo, normal y controles) encontradas. Se observa que el valor mas alto del $NF\kappa B$ p65 se encuentra en los pacientes con EPOC con IMM normal y el mas bajo en los controles. Similar comportamiento se observó en los valores del $TNF\alpha$.

Los marcadores inflamatorios de acuerdo al índice de masa magra se muestran en la tabla 4. El $NF\kappa B$ p50 es significativamente mayor en los pacientes con IMM baja y el $NF\kappa B$ p65 fue significativamente menor en este mismo grupo, (gráficas 3 y 5). En el resto de los marcadores inflamatorios en músculo y plasma no se encuentra diferencia estadísticamente significativa.

En los parámetros funcionales pulmonares de los pacientes con el $NF\kappa B$ p65 se correlacionaron de manera directa con la $CVF\%$, y el VEF_1 (expresado en porcentaje) en los pacientes con EPOC, Los gráficos 6 y 7 muestran los resultados.

DISCUSIÓN

Los hallazgos más importantes de este estudio sobre marcadores inflamatorios músculo esquelético y plasma en pacientes con EPOC discriminados por índice de masa magra y sujetos controles son: primero, los pacientes con EPOC tienen marcadores inflamatorios en plasma ($\text{TNF}\alpha$, IL6) más elevados en comparación con el grupo control. Segundo, los pacientes con EPOC tienen unos niveles de $\text{NF}\kappa\text{B}$ p65 medidos en músculo mayores que los pacientes controles. Tercero, se observó una diferencia significativa de los valores del $\text{NF}\kappa\text{B}$ p65 y el $\text{TNF}\alpha$ al comparar los tres grupos (EPOC IMM normal, EPOC IMM bajo, sujetos controles) obteniéndose los valores mas elevados en los EPOC con IMM normal y los mas disminuidos en los sujetos controles. Cuarto, al discriminar los pacientes con EPOC por IMM, los de IMM baja presentan un $\text{NF}\kappa\text{B}$ p65 menor y un $\text{NF}\kappa\text{B}$ p50 mayor en comparación con los pacientes con IMM normal. Quinto se observó una correlación directa entre el CVF (%), el VEF_1 y los niveles de $\text{NF}\kappa\text{B}$ p65 en los pacientes con EPOC.

La inflamación sistémica ha sido demostrada en pacientes con enfermedades crónicas, y particularmente en pacientes con EPOC ^(3,8-10,15,17). Takabatake et al ⁽³⁰⁾ encontraron en 27 pacientes con EPOC comparados con 15 sujetos controles, un aumento en los niveles séricos de $\text{TNF}\alpha$, asociado a una disminución de la presión parcial de oxígeno, Eid et al ⁽³¹⁾ estudiaron en 68 pacientes con EPOC los niveles plasmáticos de $\text{TNF}\alpha$, IL6 y sus receptores solubles, encontrando también valores elevados de estas citoquinas en los pacientes que presentaban bajo peso o un bajo índice de talla creatinina

(usado como medida indirecta del índice de masa magra). En un estudio más reciente García del Río et al⁽³²⁾ evaluaron en 324 pacientes con EPOC comparados con 110 sujetos controles los marcadores inflamatorios en plasma (TNF α e IL6). Estos autores encontraron niveles más elevados de estos marcadores en sujetos con EPOC comparados con el grupo control, concluyendo que los pacientes con EPOC tienen un estado proinflamatorio con aumento de los niveles circulantes de muchas citoquinas inflamatorias y reactantes de fase aguda. Broekhuizen et al⁽³³⁾, realizaron un estudio en 99 pacientes con EPOC, discriminados por índice de masa magra (35 caquéticos, 64 no caquéticos) y 20 sujetos controles encontrando en la medición de TNF, IL6 y otras citoquinas que había una diferencia en el perfil inflamatorio de los pacientes y los controles, pero no entre los pacientes IMM normal y bajo concluyendo que la caquexia no indica la gravedad de la inflamación. En el presente estudio se evidencia un aumento de los niveles de TNF α e IL6 significativamente mayores en los pacientes con EPOC comparado con los sujetos controles y cuando se hace la comparación entre los tres grupos estudiados (controles, EPOC IMM baja y EPOC IMM normal) se observa una diferencia significativa entre los tres grupos al medir la subunidad NF κ B p65 y el TNF α lo que confirma el hecho de que los pacientes en general tienen mayor inflamación causada por citoquinas en comparación con el grupo control. Estos resultados van en línea con los estudios anteriores y sugieren la presencia de una inflamación sistémica en los sujetos con EPOC^(2-6,9,10,17). La mayoría de los autores convergen en que la inflamación es parte de la patogenia en la EPOC^(34,35) y entre los diversos componentes de la cascada inflamatoria que se han identificado el TNF α y la IL6 son algunas de las principales citoquinas que se encuentran elevadas en plasma y suero^(7,11,13,14). Estas actúan a través de la activación de la vía del NF κ B, sin embargo se

mantiene confuso si las citoquinas son causantes de la remodelación muscular y si sus efectos facilitan o interfieren en la plasticidad de los músculos de los pacientes con EPOC⁽³⁵⁾.

Algunos estudios se han enfocado en la vía de señalización del NFκB a través de las citoquinas. Adams et al⁽³⁶⁾ estudiaron siete pacientes con insuficiencia cardíaca congestiva y encontraron un aumento de la expresión de NFκB en el músculo esquelético en comparación con siete individuos controles. En los pacientes con EPOC estables se ha evidenciado aumento de los marcadores de las vías de señalización del NFκB en diferentes tipos de células (músculo liso bronquial, esputo, macrófagos, músculo esquelético). Di Marco et al⁽¹⁶⁾, utilizando un modelo animal, demostraron que el NFκB activa la vía de iNOS-NO ayudando al desarrollo de caquexia al detener la regeneración de las fibras musculares por disminución de la producción del MyoD, y además aumentando la apoptosis de las fibras musculares. Isajevs et al⁽³⁷⁾ evaluaron en 20 pacientes con EPOC moderado, 20 fumadores sin EPOC y 19 sujetos controles, la expresión de NFκB p65 en músculo liso de la vía aérea encontrando valores más elevados en los pacientes con EPOC en relación con los sujetos controles. En músculo esquelético, Testelmans et al⁽³⁸⁾ tomaron biopsia de diafragma en 19 pacientes con EPOC severo y 13 sujetos controles, encontrando disminución de la actividad de los inhibidores del NFκB (IκBα, IκKβ) y de la subunidad p50 en los pacientes en comparación con los sujetos controles. Agustí et al⁽¹⁸⁾ a través de biopsia del cuádriceps midió en 7 pacientes con EPOC con IMC normal y 7 pacientes con EPOC con IMC bajo la subunidad NFκB p65 encontrando niveles más elevados en los pacientes con IMC bajo. Plant et al⁽³⁹⁾, tomaron biopsia en el cuádriceps de 9 pacientes con

EPOC y 9 pacientes controles sin encontrar diferencia de los niveles de NFκB p65 y NFκB p50 entre los dos grupos. En el presente estudio se encontró que los pacientes con EPOC tenían niveles de NFκB p65 significativamente mayores comparados con los sujetos controles. La diferencia encontrada con el estudio de Plant probablemente puede ser debida a que dichos autores solamente incluyeron pacientes que tenían IMC normal, no midieron IMM, y el número de sujetos estudiados fue menor al del presente estudio. La presencia de marcadores inflamatorios elevados en los pacientes del presente estudio puede ser explicada por la activación de la vía clásica, porque esta actúa a través de la activación por TNFα de la familia de factores nucleares kappa B, y para ello se dimerizan varios factores, lo que les facilita ligarse a la región blanco del núcleo. Entre ellos los heterodímeros prototipos son el p65 y el p50 que se encuentra en casi todas las células y se encargan de inducir por la vía clásica la expresión de genes transcriptores de citoquinas proinflamatorias. La activación del NFκB se produce a través de la fosforilación, ubiquitinación y degradación de las proteínas IκB, que actúan como ligandos represores en el citosol. Esto conlleva a la liberación de los dímeros NFκB p65 y NFκB p50 y luego a través de varias modificaciones a la traslocación hacia el núcleo donde se liga a sitios específicos del ADN y promueve la transcripción de genes claves en la inflamación^(22,23,40).

Existe información limitada sobre la activación de los factores nucleares kappa B en relación con IMM en pacientes con EPOC. Hunter et al⁽²⁴⁾ demostraron en un modelo animal que la estimulación por citoquinas como TNFα no es necesaria en la atrofia por desuso, a través de la activación de los precursores de p50, sin activación de p65 y sin degradación de IκBα, debido a la activación de la vía no clásica. Recientemente Wu et

al⁽²⁵⁾, también en un modelo animal con ratones alterados genéticamente para no expresar genes decodificadores de p50 y Bcl-3 identificaron 7 genes que se encuentran ligados a la producción de atrofia muscular por desuso, la mayoría de ellos involucrados con degradación, transporte, señales, traslocación y transcripción de proteínas. La subunidad p65 no mostró ser un ligando específico de estas proteínas. Por otra parte, Agustí et al⁽¹⁸⁾ encontraron un aumento de los niveles de NFκB p65 en los pacientes con EPOC con índice de masa corporal (IMC) bajo comparados con los pacientes con IMC normal. Shin et al⁽⁴¹⁾ en un estudio con 65 pacientes con EPOC, no encontraron diferencias significativas en los valores de TNFα en plasma al discriminar los pacientes por IMM. Eagan et al⁽⁴²⁾ en un estudio con 409 pacientes con EPOC discriminados por IMM no encontraron diferencias significativas entre los niveles de receptor de TNFα en plasma entre los grupos con IMM bajo y normal. En el presente estudio al discriminar los pacientes según IMM se encontró en los pacientes con EPOC e IMM bajo niveles elevados de NFκB p50 y disminuidos de NFκB p65. Las discrepancias observadas entre los resultados del presente estudio y los reportados por Agustí et al⁽¹⁸⁾, pueden ser explicadas por varios factores; primero los pacientes estudiados en el trabajo citado fueron clasificados sobre la base de IMC y no con el IMM. Adicionalmente los pacientes incluidos en el presente estudio tenían un IMC promedio menor y en los pacientes con IMM bajo la obstrucción del flujo aéreo (VEF₁) fue mayor que los pacientes del grupo de Agustí et al⁽¹⁸⁾. Así mismo, en el estudio de dichos autores se analizó la subunidad p65 y no la subunidad p50. En este estudio al discriminar los pacientes con EPOC por IMM, los de IMM baja presentan un NFκB p65 menor y un NFκB p50 mayor en comparación con los pacientes con IMM normal y por otra parte, no encontramos diferencias significativas en los marcadores inflamatorios plasmáticos (TNFα,

IL6) entre los grupos de pacientes con EPOC, lo que sugiere que la inflamación sistémica (vía clásica) no es la causa principal de la pérdida de masa magra y que la vía no clásica es probablemente la activada en estos pacientes. No está establecido con exactitud cual es el mecanismo de activación de la vía no clásica; se cree que es activada por proteínas, diferentes a las citoquinas, que actúan a través del procesamiento proteosomal de los precursores de p50 y p52, sin la degradación de I κ B y que deriva en una respuesta transcripcional diferente a la de la vía clásica ^(22-25,40,43).

No se encontró ningún estudio previo que haya evaluado la relación entre los niveles de marcadores inflamatorios en músculo de pacientes con EPOC y diferentes aspectos del funcionalismo respiratorio. En el presente estudio se observó en pacientes con EPOC una correlación directa entre los niveles de NF κ B p65 en músculo y los parámetros funcionales pulmonares (CVF y el VEF₁), lo que indicaría que a mayor inflamación en músculo hay una mejor función pulmonar. Estos hallazgos aparentemente contradictorios pueden ser explicados porque los pacientes con IMM bajo tienen una CVF y un VEF₁ menor (y probablemente una mayor limitación física), así como un NF κ B p65 mas bajo que los pacientes con IMM normal, lo que va en línea con lo discutido anteriormente que sugiere que la presencia de una masa magra baja en los pacientes con EPOC no es consecuencia de la inflamación sistémica sino probablemente de atrofia por desuso.

Existen algunas limitaciones en este estudio que ameritan ser mencionadas. Debido a la naturaleza invasiva del procedimiento para obtener las muestras de músculo esquelético, un número relativamente pequeño fue incluido en el estudio. Esto

probablemente limite la extrapolación directa de los hallazgos encontrados a la población entera de pacientes con EPOC. Sin embargo, 29 pacientes con EPOC y 13 sujetos controles comprenden el más grande grupo reportado usando biopsia de músculo periférico para evaluar marcadores inflamatorios.

Con estos hallazgos podemos concluir que en pacientes con EPOC existe una evidencia de respuesta inflamatoria sistémica. Sin embargo el papel de las citoquinas en la fisiopatología de la caquexia sigue siendo un tema de discusión. Los resultados de este estudio sugieren que la presencia de inflamación sistémica (citoquinas) y local (subunidad p65) no se asocia a la disminución de la masa magra, y que esta probablemente está asociada con la activación de la vía no clásica (subunidad p50), cuyos mecanismos disparadores no están aclarados. Sería importante realizar estudios a futuro que analicen la subunidad p50 o p52 en otras poblaciones de pacientes con EPOC relacionándolos con IMM, que permitan aclarar si la caquexia es debida a mecanismos como atrofia por desuso o es una predisposición genética.

Conclusiones y Recomendaciones

Con estos resultados podemos concluir que la inflamación juega un papel importante en la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, sin embargo no explica la fisiopatología de la caquexia y que debemos estudiar otros mecanismos de producción como predisposición genética o desuso en estos pacientes.

Se recomienda para evaluar de forma completa incluir en próximos trabajos las características histoquímicas de los músculos, cuestionarios de actividad física y marcadores genéticos así como ampliar la investigación hacia pacientes con caquexia debido a otras enfermedades y que permitan comprender mejor su fisiopatología.

REFERENCIAS

1. Celli BR, MacNee W; ATS/ERS. Task Force. Standards for the diagnosis and treatment of patients with COPD: a summary of the ATS/ERS position paper. *Eur Respir J.* 2004; 23:932-46.
2. Gross NJ. Extrapulmonary effects of COPD. *Curr Opin Pulm Med* 2001; 7:84-92
3. Casanova C, Torres JC, Montes de Oca M. Aspectos Sistémicos y Factores Pronósticos. *Arch Bronconeumol.* 2007;43 Supl 3:25-34
4. Montes de Oca M, Celli B. Los músculos periféricos en la EPOC: Descondicionamiento o miopatía?. *Arch Bronconeumol* 2001; 37:82-87.
5. Vestbo J, Prescott E, Almdal T, Dahl M, Nordestgaard B, Andersen T, Sorensen T, Lange P. Ody mass, fat free body mass, and prognosis in patients with chronic obstructive pulmonary disease from a random population sample. *Am j Respir Crit Care Med* 2006; 173:79-89.
6. Schols AM, Slangen J, Volovics L, Wouters EF. Weight loss is a reversible factor in the prognosis of COPD. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157:1791-1797.
7. Langen R, Van Der Velden J, Schols A, Kelders M, Wouters E, Janssen/Heininger Y. Tumor necrosis factor-alpha inhibits myogenic differentiation through MyoD protein destabilization. *FASEB J* 2004. 18, 227–237.
8. ManW, Kemp P, Moxham J, Polkey M. Skeletal muscle dysfunction in COPD: clinical and laboratory observations. *Clinical Science* (2009) 117, 251–264
9. Sin D, Man S. Skeletal muscle weakness, reduced exercise tolerance, and COPD: is systemic inflammation the missing link?. *Thorax* 2006;61:1–3

10. ManW, Kemp P, Moxham J, Polkey M. Exercise and muscle dysfunction in COPD: implications for pulmonary rehabilitation. *Clinical Science* (2009) 117, 281–291
11. Creutzberg E, Schols A, Weling-Scheepers C, Burman W, Wouters E. Characterization of Nonresponse to High Caloric Oral Nutritional Therapy in Depleted Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:745–752.
12. Mata H. Efectos de la malnutrición sobre las características de los músculos periféricos y el proceso inflamatorio en pacientes con Enfermedad Pulmonar obstructiva Crónica. Trabajo especial de investigación para optar al título de especialista en Neumonología Clínica. Hospital Universitario de Caracas. Curso de especialización en Neumonología. 2004.
13. Di Francia MD, Barbier D, Mege JL, Orejek J. Tumor necrosis factor-alpha levels and weight loss in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1994;150:1453-1455
14. Ladner K, Caligiuri M, Guttridge D. Tumor Necrosis Factor-regulated biphasic activation of NF- κ B is required for cytokine induced loss of skeletal muscle gene products. *J Biol Chem*. 2003; 278(4):2294-303
15. Montes de Oca M, Torres SH, Di Sanctis J, Mata A, Hernández N, Tálamo C. Skeletal muscle inflammation and nitric oxide in patients with COPD. *Eur Respir J* 2005; 26: 390–397.
16. Di Marco S, Mazroui R, Dallaire P, Chittur S, Tenenbaum S, Radzioch D, Marette A, Gallouzi I. NF- κ B- Mediated MyoD decay during muscle wasting requires nitric oxide synthase mRNA stabilization, HuR protein, and nitric oxide release. *Mol Cell Bio* 2005; 25(15): 6533-6545.

17. Wagner P. Possible mechanisms underlying the development of cachexia in COPD. *Eur Respir J*. 2008; 31: 492-501.
18. Agustí A, Morla M, Sauleda J, Saus C, Busquets X. NF-kappaB activation and iNOS upregulation in skeletal muscle of patients with COPD and low body weight. *Thorax*. 2004;59:483-7.
19. Kim HC, Mofarrahi M, Hussain S. Skeletal muscle dysfunction in patients with chronic pulmonary disease. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2008; 3(4): 637–658
20. Satta A, Migliori GB, Spanevello A. Fiber types in skeletal muscles of chronic obstructive pulmonary disease patients related to respiratory function and exercise tolerance. *Eur Respir J* 1997;10:2853-2860.
21. Jobin J, Maltais F, Doyon JF. Chronic obstructive pulmonary disease: capillarity and fiber-type characteristics of skeletal muscle. *J Cardiopulm Rehab* 1998;18:432-437.
22. Li H, Malhotra S, Kumar A. Nuclear Factor-kappa B Signaling in Skeletal Muscle Atrophy. *J Mol Med* 2008. 86; 1113-1126.
23. Hayden M, Ghosh S; Shared Principles in NF-κB Signaling. *Cell*. 2008, 132: 344-62
24. Hunter RB, Stevenson E, Koncarevic A, Mitchell-Felton H, Essig DA, Kandarian SC. Activation of an alternative NF-kappaB pathway in skeletal muscle during disuse atrophy. *FASEB J*. 2002; 16:529-38.
25. Wu C, Kandarian S, Jackman R; Identification of genes that elicit disuse muscle atrophy via transcription factors p50 and Bcl-3. *Plos ONE*. 2011, 6(1): e16171
26. Bernard S, Leblanc P, Whittom F, Carrier G, Jobin J, Belleau R, Maltais F. Peripheral muscle weakness in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158: 629-634.

27. Global Strategy for the diagnostic, management and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. Abril 2011. Disponible en <http://www.goldcopd.org>.
28. American Thoracic Society. Standardization of spirometry 1987 update. ATS statement. *Am Rev Respir Dis* 1987; 136:1285-1298.
29. American Thoracic Society. ATS statement: guidelines for the Six-Minute Walk Test. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166:111-117
30. Takabakate N, Nakamura H, Abe S, Inoue S, Hino T, Saito H, Yuki H, Kato S, Tomoike H. The relationship between chronic hypoxemia and activation of the tumor necrosis factor- α system in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Resp Crit Care Med* 2000; 161:1179-84
31. Eid AA, Ionescu AA, Nixon LS, Lewis-Jenkins V, Matthews SB, Griffiths TL, Shale DJ. Inflammatory response and body composition in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;164(8):1414-8
32. Garcia-Rio F, Miravittles M, Soriano J, Muñoz L, Duran-Tauleria D, Sánchez G, Sobradillo V, Ancochea J. Systemic inflammation in chronic obstructive pulmonary disease: a population-based study; *Respiratory Research* 2010, 11:63.
33. Broekhuizen R, Grimble R, Howell W, Shale D, Creutzberg E, Wouters E, Schols A; Pulmonary cachexia, systemic inflammatory profile, and the interleukin 1 β -511 single nucleotide polymorphism. *Am J Clin Nutr* 2005;82:1059–64.
34. Gan WQ, Man SFP, Senthilselvan A, Sin DD. Association between chronic obstructive disease and systemic inflammation: a systematic review and metaanalysis. *Thorax* 2004; 59: 574-80.

35. Langen RCJ, Schols A; Inflammation: friend or foe of muscle remodeling in COPD?. *Eur Resp J* 2007; 30: 605-607.
36. Adams V, Späte U, Kränkel N, Schulze PC, Linke A, Schuler G, Hambrecht R. Nuclear factor kappa B activation in skeletal muscle of patients with chronic heart failure: correlation with the expression of inducible nitric oxide synthase. *Eur J cardiovas Prev Rehabil.* 2003; 10(4):273-7
37. Isajevs S, Taivans I, Svirina D, Strazda G, Kopeika U. Patterns of inflammatory responses in large and small airways in smokers with and without chronic obstructive pulmonary disease. *Respiration* 2011; 81:362-371.
38. Testelmans D, Crul T, Maes K, Agten A, Crombach M, Decramer M, Gayan-Ramirez G. Atrophy and hypertrophy signalling in the diaphragm of patients with COPD. *Eur Respir J* 2010; 35: 549-52
39. Plant P, Brooks D, Faughnan M, Bayley T, Bain J, Singer L, Correa J, Pearce D, Binnie M, Batt J. Cellular Markers of Muscle Atrophy in Chronic Obstructive Pulmonary Disease; *Am J Respir Cell Mol Biol* 2010, 42.:461–471.
40. Edwards M, Barlet N, Clarke D, Birrell M, Belvisi M, Johnston S; Targeting the NFκB pathway in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Pharmacol and Ther* 2009; 121:1-13
41. Shin, KC, Chung JH, Lee KH. Effects of TNF-α and Leptin on Weight Loss in Patients with Stable Chronic Obstructive Pulmonary Disease; *Korean J Intern Med.* 2007;22(4):249-55

42. Eagan TM, Aukrust P, Ueland T, Hardie JA, Johannessen A, Mollnes TE, Damås JK, Bakke PS, Wagner PD. Body composition and plasma levels of inflammatory biomarkers in COPD. *Eur Respir J* 2010; 36(5): 1027-33
43. Hunter R, Kandarian S; Disruption of either the NFκB1 or the Bcl3 gene inhibits skeletal muscle atrophy. *J Clin Invest* 2004; 114: 1504-1511

ANEXOS

TABLA 1: Características antropométricas, función pulmonar y caminata de 6 minutos de pacientes con EPOC y controles

	Pacientes (n=29)	Controles (n=13)	p*
Edad (años)	63,8 ± 8,9	58,7 ± 8,5	> 0,05
Peso (Kg)	58,2± 17,4	72,7± 14,6	<0,01
Talla (cms)	160,5 ± 8,4	160,3 ± 8,4	>0,05
IMC (Kg/m²)	22,30± 5,31	28,21± 4,38	<0,01
IMM (kg/m²)	17,07± 2,5	18,15± 2,15	>0,05
CVF %	72,89± 18,4	99,18± 15,3	<0,01
VEF 1 %	44,9± 17,1	98,4± 13,0	<0,01
VEF1%/CVF	48,2± 14,4	79,09± 6,2	<0,01
C6M (m)	465±154	566±59	<0,05

IMC: índice de masa corporal, IMM: índice de masa magra, CVF: capacidad vital forzada, VEF₁: volumen espiratorio forzado en el primer segundo, VEF₁/CVF: relación entre volumen espiratorio forzado en el primer segundo y la capacidad vital forzada, C6M: caminata de 6 minutos

*Mann Whitney U Test

TABLA 2: Marcadores inflamatorios en músculo esquelético y plasma en pacientes con EPOC y controles

	Pacientes	Controles	
	(n=29)	(n=13)	p*
IκBα (AU)	0,62 ± 0,50	1,00. ± 0,78	>0,05
IκBβ (AU)	0,68± 0,65	1,00.± 0,87	>0,05
NFκBp65 (AU)	1,61 ± 0,68	0,10 ±0,47	<0,05
NFκBp50 (AU)	0,58± 0,53	1,13± 0,92	>0,05

IκBα: inhibidor del factor nuclear kappa B alfa, IκBβ: inhibidor del factor nuclear kappa B beta, NFκB p65: factor nuclear kappa B subunidad p65, NFκB p50: factor nuclear kappa B subunidad p50, TNFα: factor de necrosis tumoral alfa, IL6: interleukina 6.

*Mann Whitney U Test

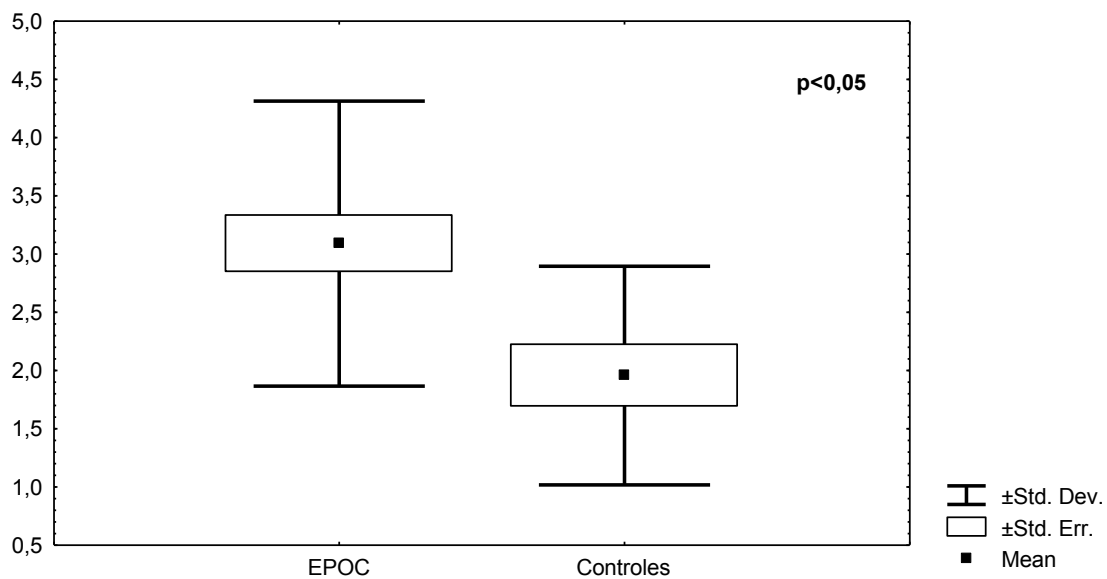
GRÁFICO 1: Valores de IL6 en plasma (pg/mL) en pacientes y controles.

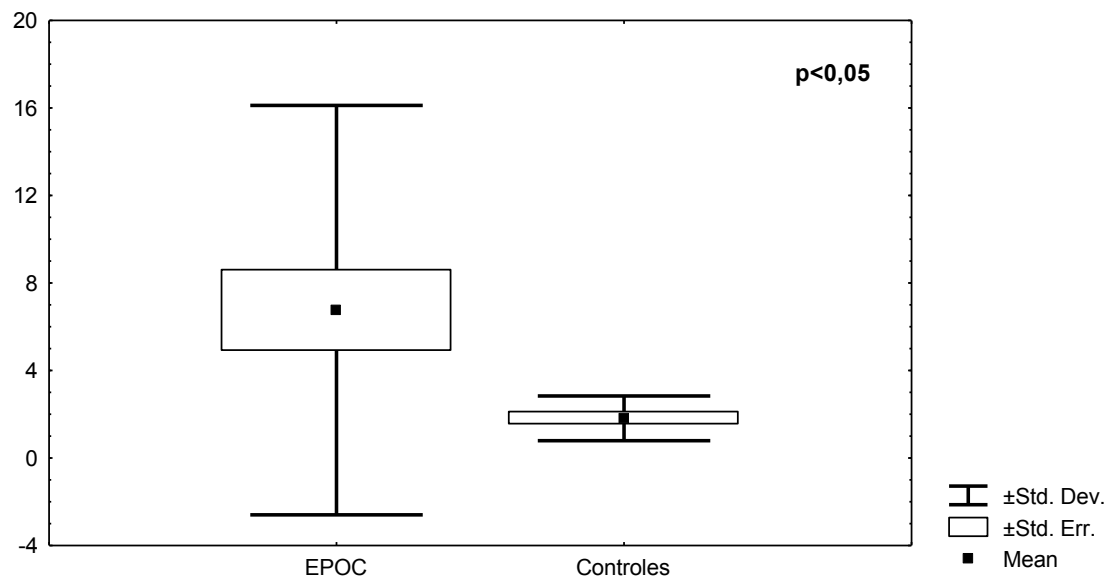
GRÁFICO 2: Valores de TNF α (pg/mL) en plasma en pacientes y controles

TABLA 3: Características antropométricas, función pulmonar y caminata de 6 minutos de los pacientes con EPOC en relación con índice de masa magra.

	Normal (n=19)	Bajo (n=10)	p*
Edad (años)	64,3 ± 7,58	62,7 ± 11,42	>0,05
Peso (Kg)	66,3± 15,6	42,83± 7,35	<0,01
Talla (cms)	161,1 ± 8,88	159,3 ± 7,57	>0,05
IMC (Kg/m²)	25,20± 3,99	16,78± 2,04	<0,01
IMM (kg/m²)	18,37± 2,07	14,58± 0,72	<0,01
CVF %	76,66± 19,46	65,33± 14,01	>0,05
VEF₁ %	49,5± 16,7	35,66± 14,64	<0,05
VEF₁/CVF	51,3± 14,8	42,11± 12,06	>0,05
C6M (m)	474±136	448±188	>0,05

IMC: índice de masa corporal, IMM: índice de masa magra, CVF: capacidad vital forzada, VEF₁: volumen espiratorio forzado en el primer segundo, VEF₁/CVF: relación entre volumen espiratorio forzado en el primer segundo y la capacidad vital forzada, C6M: caminata de 6 minutos

*Mann Whitney U Test

GRÁFICO 3: Valores de NFκB p65 (AU) en controles y pacientes con EPOC de acuerdo al índice de masa magra.

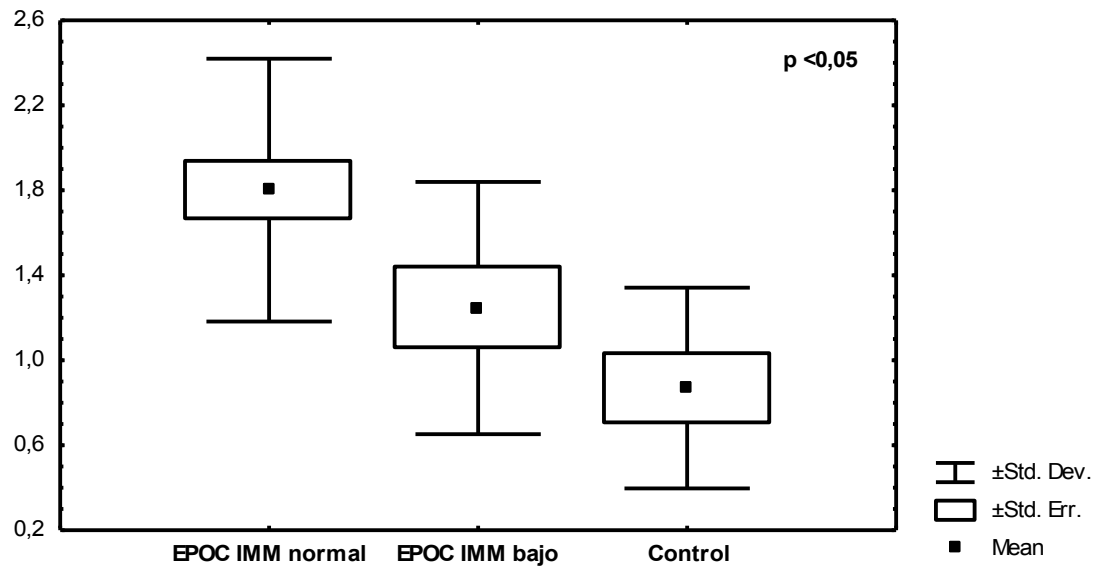


GRÁFICO 4: Valores de TNF α (pg/mL) en controles y pacientes con EPOC de acuerdo al índice de masa magra

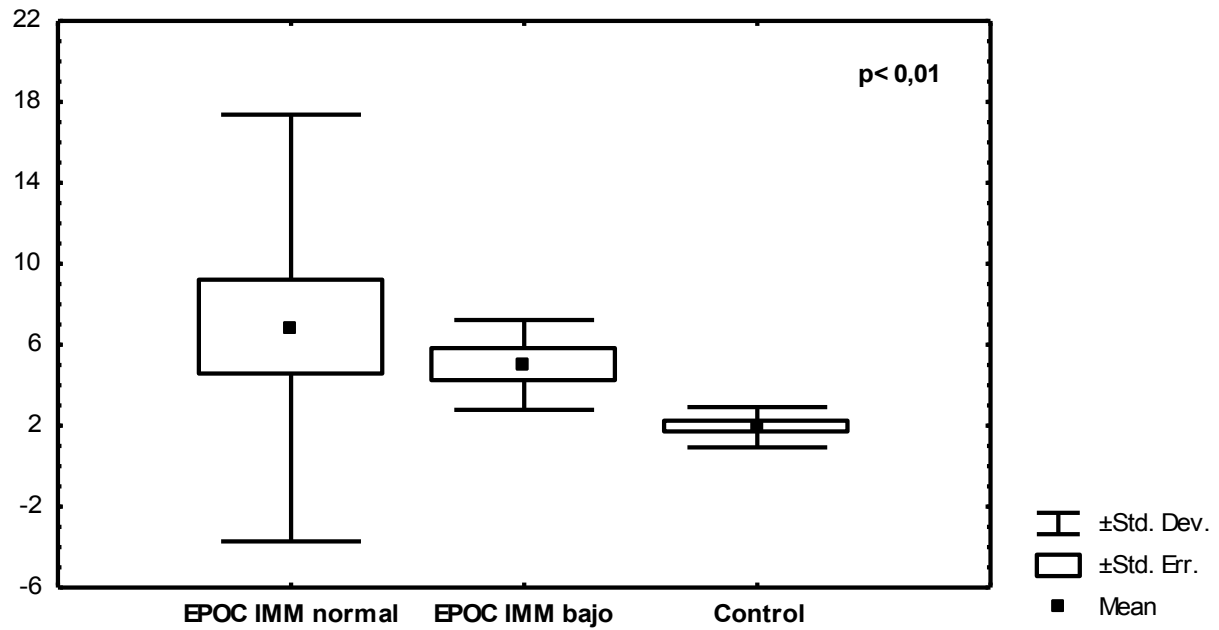


TABLA 4: Características de marcadores inflamatorios en de los pacientes con EPOC en relación con índice de masa magra (IMM)

	Normal (n=19)	Bajo (n=10)	p*
IκBα (AU)	0,48 ± 0,37	0,90 ± 0,63	>0,05
IκBβ (AU)	0,56± 0,44	0,93± 0,95	>0,05
IL6 (pg/mL)	3,29± 1,16	2,57± 1,31	>0,05
TNFα (pg/mL)	7,44± 10,95	5,00± 2,22	>0,05

IκBα: inhibidor del factor nuclear kappa B alfa, IκBβ: inhibidor del factor nuclear kappa B beta, NFκB p65: factor nuclear kappa B subunidad p65, NFκB p50: factor nuclear kappa B subunidad p50, TNFα: factor de necrosis tumoral alfa, IL6: interleukina 6.

*Mann Whitney U Test

GRÁFICO 5: Valores de NFκB p50 (AU) en músculo esquelético en pacientes con EPOC de acuerdo al índice de masa magra

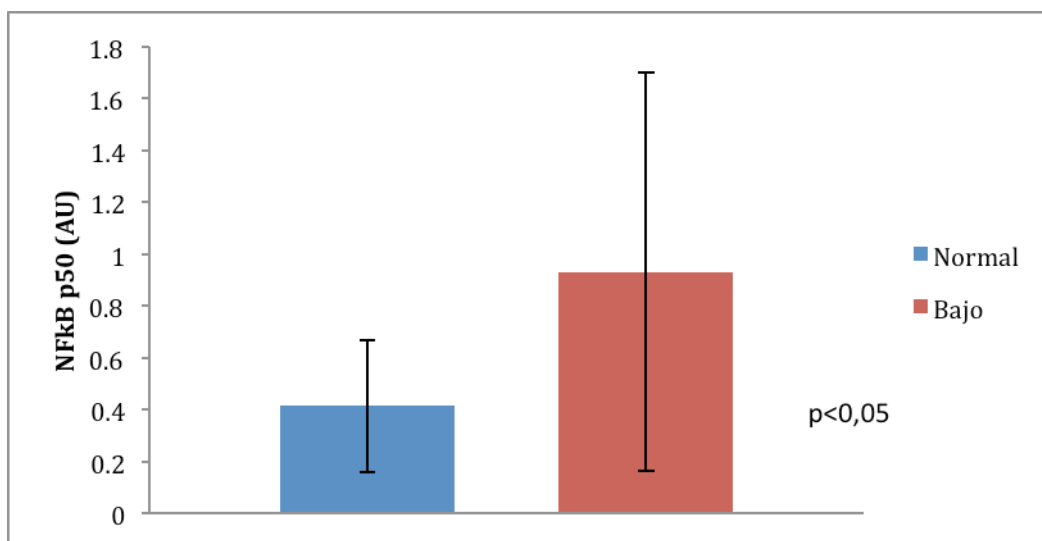


GRÁFICO 6: Correlación entre los niveles de NFκB p65 (AU) en músculo esquelético y la CVF (%) en pacientes con EPOC.

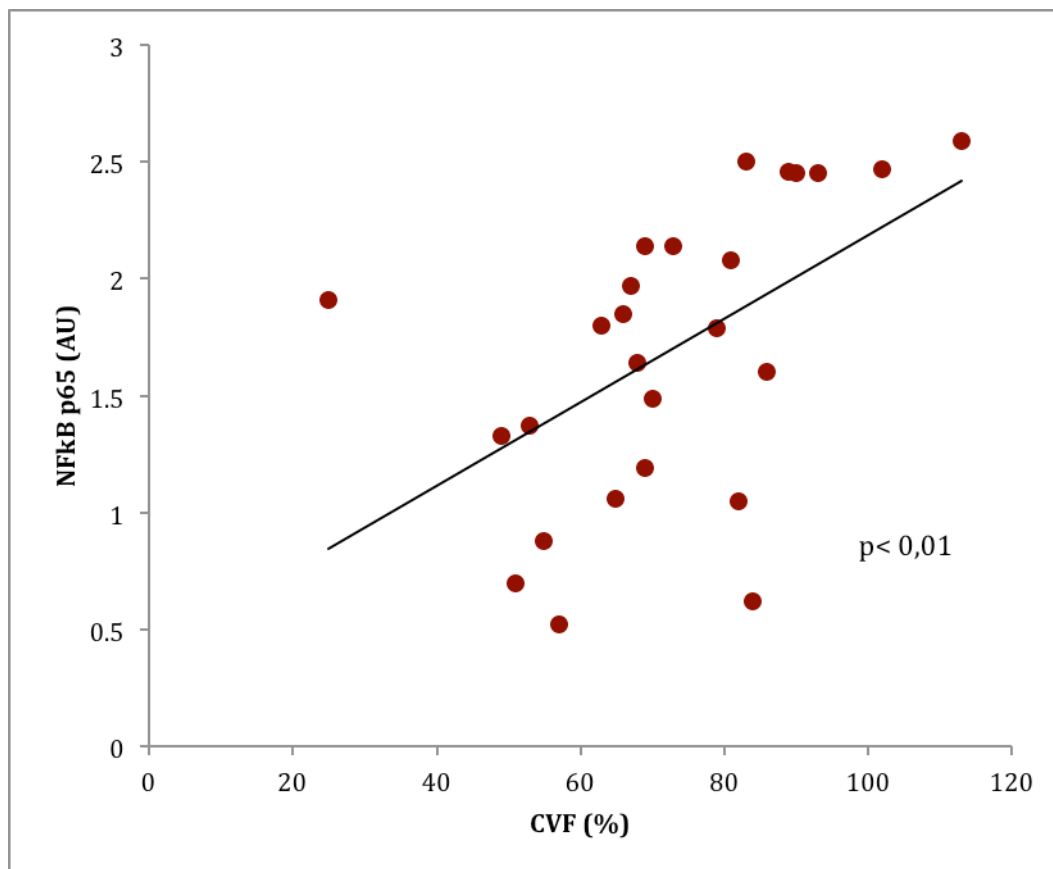
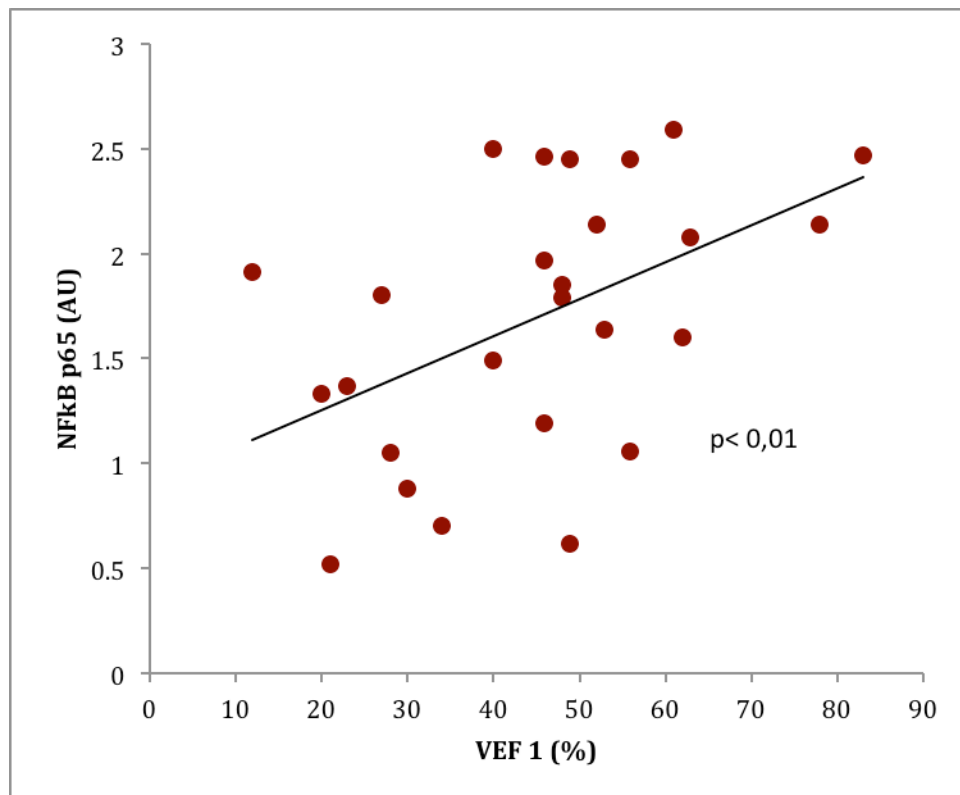


GRÁFICO 7: Correlación entre los niveles de NFκB p65 (AU) en músculo esquelético y la VEF₁ (%) en pacientes con EPOC.



CONSENTIMIENTO INFORMADO
NIVELES DE NFκB COMO MARCADOR INFLAMATORIO EN PACIENTES
CON ENFERMEDAD PULMONAR OBSTRUCTIVA CRÓNICA.

DRA. MARÍA EUGENIA LAUCHO

RESIDENTE DE NEUMONOLOGÍA CLÍNICA

PROPÓSITO: conocer la relación entre los niveles de factor nuclear kappa B y el estado nutricional de los pacientes con EPOC.

PROCEDIMIENTO: Se realizará espirometría con uso de broncodilatadores tipo salbutamol siguiendo las normas de la Asociación Americana del Tórax (ATS), y caminata de seis minutos que consiste en caminar a la mayor velocidad que pueda el paciente en una superficie plana durante 6 minutos en los cuales se medirá de forma no invasiva la saturación y la frecuencia cardíaca, posteriormente se tomará biopsia muscular bajo medidas de asepsia y antisepsia en vasto lateral de cuádriceps derecho, esa muestra será almacenada en nitrógeno líquido para su posterior procesamiento. Se obtendrá sangre venosa periférica (previamente a la realización de biopsia muscular), que será centrifugada y almacenada hasta su uso. Luego se determinará la presencia de Factor Nuclear kappa B y se correlacionará con el estado nutricional del paciente.

BENEFICIOS: Utilidad para estimar la relación del el factor nuclear kappa B y el estado nutricional y llegar a establecer los mecanismos etiopatológicos de la caquexia en pacientes con EPOC.

RIESGOS: Hematomas en sitios de venopunción y en sitio de toma de biopsia, dolor en sitio de toma de biopsia.

CONFIDENCIALIDAD: los resultados se mantendrán bajo el secreto médico- paciente, y se publicaran sin identificación del paciente

DERECHO A NEGARSE A PARTICIPAR:

PREGUNTAS:

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo, **sexo,** **edad** Portador de la C.I. Luego que me hubieren explicado con toda claridad el propósito, el procedimiento, los beneficios, los riesgos, las ventajas, las complicaciones, las otras opciones diagnósticas y/o terapéuticas, y habiendo yo formulado todas las preguntas concernientes a mis dudas, y contestadas todas ellas satisfactoriamente ACEPTO VOLUNTARIAMENTE participar en el trabajo de investigación titulado **Niveles de NFκB como marcador inflamatorio en pacientes con Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica**. Llevado a cabo por Médico Tutor: Dra. Sonia Hecker de Torres, Médico Residente: María Eugenia Laucho del Servicio de Neumonología Clínica del Post-Grado Universitario de Neumonología Clínica del Hospital Universitario de Caracas.

	PACIENTE	TESTIGO	INVESTIGADOR
NOMBRE Y APELLIDO			
FIRMA			
C.I. N°			
TELÉFONO			

INFORMACION PARA EL PACIENTE

NOMBRE: C.I.-

“USTED TIENE UN ENFERMEDAD PULMONAR OBSTRUCTIVA CRONICA, QUE AFECTA LOS PULMONES Y TAMBIEN LOS MUSCULOS.

ESTA ENFERMEDAD TIENE COMO CONSECUENCIA QUE PUEDA QUEDAR DESNUTRIDO O CON MUY BAJO PESO.

NOSOTROS CONSIDERAMOS QUE ES OPORTUNA REALIZAR UNA BIOPSIA DEL MUSCULO Y TOMAR UNA MUESTRA DE SANGRE PARA EVALUAR CUAN AVANZADA ESTA LA ENFERMEDAD Y CUANTO A AFECTADO SU ESTADO NUTRICIONAL.

CON ESTA BIOPSIA NOS PROPONEMOS ESTUDIAR LOS NIVELES DE UN MARCADOR INFLAMATORIO (FACTOR NUCLEAR KAPPA B) Y CORRELACIONARLOS CON SU ESTADO NUTRICIONAL PARA DESCUBRIR LA CAUSA DE QUE EN LOS PACIENTES CON EPOC SEA COMUN TENER BAJO PESO Y LOS RIESGOS Y CONSECUENCIAS NEGATIVAS DE LA BIOPSIA Y LA TOMA DE SANGRE SON DOLOR Y SANGRAMIENTO EN EL SITIO DE TOMA DE LA MUESTRA, INFECCION EN EL SITIO DE LA TOMA DE MUESTRA.

FIRMA DE PACIENTE:

FIRMA DE TESTIGO:

NOMBRE DE PACIENTE

NOMBRE DE TESTIGO:

C.I.No.

C.I. No.