

Título: DIFERENCIAS EN LOS MARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO ENTRE PACIENTES CON ENFERMEDAD PULMONAR OBSTRUCTIVA CRÓNICA SEGÚN FENOTIPO AGUDIZADOR Y NO AGUDIZADOR

Autores: A. Doménech¹, A. Muñoz-Montiel², J. Rioja³, P. Ruiz-Esteban^{4, 5}, P. Gutiérrez-Castaño¹, M.J. Prunera Pardell¹, C. Olveira⁵, M.A. Sánchez-Chaparro^{5, 6}, P. Valdivielso^{5, 6}.

¹Servicio de Neumología, Hospital Regional Universitario de Málaga.

²Unidad de Neumología, Agencia Sanitaria Costa del Sol, Marbella, Málaga.

³Laboratorio de Lípidos y Arteriosclerosis, Centro de Investigaciones Médico-Sanitarias, Universidad de Málaga.

⁴Departamento de Nefrología, Hospital Regional Universitario de Málaga.

⁵Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA), Universidad de Málaga.

⁶Medicina Interna, Hospital Clínico Universitario Virgen de la Victoria, Departamento de Medicina and Dermatología, Málaga.

Dirección para correspondencia: Dr. Adolfo Doménech.

Hospital Regional Universitario de Málaga.

Avda. Carlos Haya s/n.

29010 Málaga, España.

Email: adomenec@separ.es

Financiación: Este proyecto se ha financiado con las becas de NEUMOSUR 9/2013, SEPAR 110/2014 y una ayuda a la investigación sin restricciones del laboratorio Menarini.

Título abreviado: Las diferencias en marcadores de estrés oxidativo en pacientes con EPOC y agudizaciones frecuentes son poco relevantes en relación con aquellos que no las presentan.

Resumen:

Objetivo: en las agudizaciones de los pacientes con EPOC los marcadores de estrés oxidativo suelen estar elevados. Nuestro objetivo fue analizar si existen diferencias en estos marcadores entre pacientes con EPOC estable según fenotipo agudizador y no agudizador y la influencia de factores de confusión como la edad y el sexo.

Método: se analizaron pacientes remitidos a una consulta monográfica de EPOC. Tras realizar una historia clínica detallada se clasificaron como agudizadores los que habían presentado dos o más agudizaciones en el año previo o habían tenido ingreso hospitalario. Se realizaron una espirometria y una extracción de sangre, cuantificando el estado total antioxidante del suero y los grupos tioles totales (sistemas antioxidantes no enzimáticos), la actividad superóxido dismutasa (sistema antioxidante enzimático) y las especies reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS), los hidroperóxidos lipídicos, los productos avanzados de oxidación proteica y los productos finales de glicosilación avanzada como productos de oxidación.

Resultados: Se incluyeron 50 pacientes con fenotipo agudizador y 57 no agudizadores (edad media de 63 ± 7 años; 73% hombres). Se observaron valores superiores de TBARS en el fenotipo no agudizador, con significación estadística, a expensas de los pacientes mayores de 65 años y de sexo masculino. También se observó una tendencia a valores superiores de superóxido dismutasas en el fenotipo no agudizador.

Conclusiones: Existen pocas diferencias en los parámetros relacionados con el estrés oxidativo entre pacientes agudizadores y no agudizadores en fase estable. Encontramos valores más elevados de TBARS en pacientes no agudizadores, probablemente por causas no directamente relacionadas con la EPOC.

Palabras clave: estrés oxidativo, EPOC, fenotipo, especies reactivas del ácido tiobarbitúrico.

INTRODUCCION

Los radicales libres son átomos o grupos de átomos inestables que reaccionan fácilmente con diversas moléculas orgánicas. La formación de estas sustancias con capacidad oxidativa es consecuencia de diversas vías metabólicas y participan en múltiples funciones fisiológicas¹. Con objeto de neutralizar su acción y evitar el daño celular, el organismo posee moléculas con capacidad antioxidante. El estrés oxidativo resulta del desequilibrio entre ambos sistemas. Su importancia en la patogenia de la EPOC radica en que, además de producir un daño directo en el aparato respiratorio, potencia la acción de otros mecanismos patogénicos². Así, por ejemplo, el tabaco es capaz de provocar la aparición de la EPOC, pero una vez establecida la enfermedad, el abandono del hábito tabáquico no detiene el estrés oxidativo que se mantiene mediante la producción de sustancias procedentes de diversas fuentes, contribuyendo a la progresión de la enfermedad³. Las frecuentes agudizaciones, en gran parte secundarias a infecciones, aumentan la carga oxidante que aportan los neutrófilos⁴.

Aún no se ha encontrado un marcador de estrés oxidativo ideal que pueda predecir el desarrollo de enfermedad⁵. Dentro de los métodos habitualmente utilizados para cuantificar el daño oxidativo, la peroxidación lipídica constituye el patrón oro. Entre sus productos resultantes se encuentra el malondialdehído (MDA) y el método más utilizado para su determinación, aunque con muchos inconvenientes, es espectrofotométrico y utiliza la detección de MDA por medio de la unión al ácido tiobarbitúrico (TBARS)⁶. Por otra parte, el proceso de glicosilación avanzada es una interacción espontánea entre azúcares reductores y una amplia variedad de proteínas y lípidos que induce una modificación de estos y puede aumentar la rigidez de la matriz proteica. Los productos finales de glicosilación avanzada son los productos de esta glicosilación no enzimática y de la oxidación de proteínas y lípidos^{7, 8}. El estrés oxidativo también hace a las proteínas más susceptibles a la degradación proteolítica modificando las cadenas de aminoácidos y formando agregados de proteínas. Estas modificaciones de las proteínas alteran la función normal de la célula y, también a múltiples mecanismos fisiológicos⁹. Sin embargo, sólo una pequeña proporción de fumadores desarrollan EPOC, por lo que en la actualidad la investigación se centra en los factores genéticos y epigenéticos que predisponen a esta situación.

En cuanto a los mecanismos antioxidantes de origen endógeno se subdividen en formas enzimáticas y no enzimáticas. Los de origen enzimático incluyen la superóxido dismutasa (SOD), catalasa, glutatión peroxidasa, glutatión-S-transferasa y la tiridoxina¹⁰. Entre las formas no enzimáticas con función antioxidante se encuentran moléculas de bajo peso molecular como el glutatión, el ácido ascórbico, el urato, el alfatofeol, la bilirrubina y algunos ácidos lipídicos¹¹.

Varios estudios han mostrado una clara asociación entre niveles reducidos de antioxidantes en el pulmón y el deterioro de la función pulmonar en la EPOC. Esto podría reflejar un incremento de la carga oxidativa como resultado de repetidas agudizaciones en un paciente. Sin embargo, ningún estudio ha demostrado que suplementar con antioxidantes a pacientes EPOC conduzca a la mejoría de algún parámetro clínico, como la reducción de las agudizaciones. El fallo de estos ensayos se ha atribuido a diferentes razones: la potencia del antioxidante, el no conseguir dirigir el antioxidante al compartimento celular adecuado o que la dosis y frecuencia utilizada en los ensayos puede no haber sido la correcta. Por ello, en la actualidad, se encuentran en

desarrollo un amplio espectro de moléculas antioxidantes, que tratan de conseguir una buena potencia y biodisponibilidad¹².

El proyecto de investigación en el que se basa este estudio trata de analizar las diferencias existentes entre pacientes agudizadores y no agudizadores en fase estable en diferentes aspectos clínicos y analíticos. En este trabajo analizamos las diferencias existentes en diversos marcadores de estrés oxidativos entre pacientes con exacerbaciones frecuentes y aquellos que no las presentan en fase estable de la enfermedad, y la influencia de diferentes factores de confusión como la edad y el sexo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño del estudio: estudio analítico, transversal y observacional de grupos paralelos de pacientes remitidos de forma consecutiva a la consulta monográfica de EPOC de un hospital de tercer nivel entre mayo de 2014 y mayo de 2015. A la citada consulta son remitidos pacientes diagnosticados previamente de EPOC¹³, con mal control de la disnea o las agudizaciones, y pacientes en estadios avanzados de la enfermedad que requieren otras medidas terapéuticas como: oxigenoterapia, ventilación mecánica no invasiva (VMNI) o valoración de trasplante pulmonar. Este trabajo forma parte de un proyecto financiado parcialmente por la Fundación Neumosur (beca Neumosur 9/2013) que trata de establecer diferencias en riesgo cardiovascular, aterosclerosis subclínica, marcadores de inflamación y estrés oxidativo entre pacientes agudizadores y no agudizadores.

Criterios de inclusión: edad mayor de 40 años y menor de 75, antecedente de consumo de tabaco superior a 10 paq/año, espirometría con relación FEV₁/FVC postbroncodilatador inferior 70%, FEV₁ postbroncodilatador menor del 80%, estabilidad clínica en las 8 semanas anteriores a su inclusión en el estudio y disponibilidad para asistir a la realización de las pruebas complementarias.

Criterios de exclusión: presencia de una enfermedad pulmonar concomitante (como tuberculosis pulmonar o bronquiectasias), enfermedad maligna, pacientes que estuvieran participando previamente en otro estudio o ensayo clínico y los que no firmaron el consentimiento informado.

Variables del estudio: a todos los pacientes se les realizó una historia clínica detallada con especial atención a la historia de agudizaciones del paciente en el último año, según los datos referidos por el paciente y los que constaban en su historia clínica digital, anotándose también las agudizaciones que el paciente no recordara pero estuvieran recogidas por su Médico de Familia, las asistencias a urgencia que figuraran en la historia y los tratamientos prescritos que estuvieran en relación con las agudizaciones de la EPOC. En función de estos datos se estableció si el paciente presentaba un fenotipo agudizador o no agudizador. Se consideró como agudizadores a los pacientes con EPOC que presentaban dos o más agudizaciones en el año previo moderadas (en las que se haya modificado su tratamiento habitual añadiendo antibióticos y/o corticoides) o graves (ingreso hospitalario). Estas agudizaciones debían estar separadas al menos 8 semanas desde la finalización del tratamiento de la agudización previa para no confundirlas con fracasos terapéuticos¹³.

Posteriormente se efectuó una espirometría y un test broncodilatador mediante dos dosis de terbutalina administradas con el sistema Turbuhaler siguiendo la normativa

SEPAR para la realización de esta técnica¹⁴, utilizando un neumotacógrafo marca Jaeger, Oxicom. Los valores de capacidad vital forzada (FVC) y volumen espirado máximo en el primer segundo (FEV₁) fueron analizados en valor absoluto (ml) y como porcentaje de los valores teóricos esperados para personas del mismo sexo, edad, peso y altura de una población de referencia¹⁵. El espirómetro fue calibrado diariamente con una jeringa de 3 litros de acuerdo a las instrucciones del equipo.

También se realizó una extracción de sangre en tubos para suero, Plasma-EDTA y plasma-citrato, que fueron centrifugados a 3.000 rpm a 4 °C durante 15 minutos. Las muestras de suero o plasma fueron fraccionadas en partes alícuotas e inmediatamente congeladas a -70°C para el posterior análisis de marcadores de los sistemas antioxidantes y productos de oxidación descritos a continuación.

Medición de sistemas antioxidantes:

- No enzimáticos

El estado total antioxidante (TAS) del suero fue cuantificado mediante el uso del kit comercial de RANDOX (RANDOX. TAS. Reino Unido)¹⁶. El ensayo se automatizó en un analizador clínico discreto Mindray BS-380. El control de calidad mostró un coeficiente de variación total (CV%) del 9,18%.

Los grupos tioles totales (SH-T) fueron cuantificados en muestras de plasma-EDTA de acuerdo con el método de Ellman modificado por Hu *et cols.*¹⁷, adaptado a su vez a un analizador clínico Mindray BS-380. El coeficiente de variación del control de calidad fue del 3,3%.

- Enzimático

La Actividad Superóxido Dismutasa (SOD) fue cuantificada en muestras de plasma-citrato utilizando el kit comercial de Cayman (SOD Activity Kit. Cayman Chemical. Estados Unidos). Una unidad SOD se define como la cantidad de enzima necesaria para dismutar el 50% del radical superóxido¹⁸. Todos los pacientes fueron analizados en un solo ensayo, con un coeficiente de variación total del 5,9%.

Medición de productos de oxidación:

Las sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS) se cuantificaron con un kit comercial de Cayman (TBARS Assay Kit. Cayman Chemical. Estados Unidos)¹⁹. Los pacientes fueron analizados en un solo ensayo con un coeficiente de variación del 3,5%.

La cuantificación de hidroperóxidos lipídicos en suero (LOOH) se realizó mediante el método de Arab *et cols.*²⁰. Este método está basado en la oxidación del Fe²⁺ a Fe³⁺ por los hidroperóxidos a pH ácido. Todos los pacientes fueron analizados en un solo ensayo, siendo el coeficiente de variación del 3,0%.

Los Productos Avanzados de oxidación proteica (AOPPs) fueron cuantificados en muestras de plasma-citrato siguiendo el método de Witko-Sarsat modificado por Kolusová M *et cols.*²¹. Todos los pacientes fueron analizados en un solo ensayo, siendo el coeficiente de variación del 1,5%.

Finalmente, La cuantificación de productos finales de glicosilación (AGEs), esta se realizó en muestras de suero de acuerdo con el método de Kasulová *M et cols.*²¹. Todos los pacientes fueron analizados en un solo ensayo, siendo el coeficiente de variación del 10%.

Análisis estadístico: el estudio fue realizado con SPSS versión 22.0 ® para Windows. Las variables cuantitativas se han expresado como la media (medida de centralización) \pm desviación estándar (medida de variabilidad). En el caso de variables cualitativas se usaron frecuencias relativas y absolutas. Se realizó el análisis de normalidad para todas las variables utilizando el test de Kolmogorov-Smirnov. Para la comparación entre variables cuantitativas entre grupos se usaron pruebas paramétricas (t-Student) o no paramétricas (U de Mann-Whitney). La comparación entre grupos de variables cualitativas se realizó mediante la prueba Chi-Cuadrado.

Aspectos éticos: el estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Investigación Provincial de Málaga. Todos los pacientes firmaron el consentimiento informado. La base de datos generada garantizaba el anonimato y la confidencialidad de acuerdo con la legislación vigente.

RESULTADOS

Se evaluaron 129 pacientes, de los cuales se excluyeron 20 por no mostrar disponibilidad para realizar las exploraciones necesarias y 2 por no cumplir los criterios de inclusión. Finalmente, se incluyeron 107 pacientes que completaron la historia clínica, las pruebas de función respiratoria y las determinaciones de marcadores de estrés oxidativo.

La tabla 1 muestra las características generales de la población. Se trata de una población mayoritariamente de hombres, con un tercio de los fumadores, con sobrepeso y un grado de obstrucción grave de acuerdo con la clasificación GOLD²². No existían diferencias en las comorbilidades de los pacientes de ambos grupos, pero sí una mayor utilización de corticoides inhalados en el grupo agudizador.

Cuando se comparan los valores de los marcadores de estrés oxidativo de la población de estudio agrupados según fenotipo de la EPOC agudizador o no agudizador (tabla 2), se observan valores mayores de TBARS en el fenotipo no agudizador con significación estadística. También se observa una tendencia a valores de SOD superiores en el fenotipo no agudizador que no alcanza la significación estadística. No encontramos una asociación entre los valores de los marcadores de estrés oxidativo y el fenotipo agudizador (tabla 3)

En la tabla 4 se comparan los valores de los marcadores de estrés oxidativo de la población de estudio categorizados por la mediana de edad (65 años) observándose que los valores mayores de TBARS en el fenotipo no agudizador se debe fundamentalmente al grupo de mayor edad. Cuando realizamos esta comparación según el sexo (tabla 5), se aprecia que la diferencia existente en los valores de TBARS es atribuible a los pacientes de sexo masculino, sin que se observe ésta en el sexo femenino. Sin embargo, en las mujeres se observan valores superiores de TAS en el grupo no agudizador, que alcanza significación estadística.

DISCUSIÓN

En nuestro estudio, sólo hemos encontrado valores significativamente más altos de TBARS en los pacientes no agudizadores, a expensas fundamentalmente de los pacientes con mayor edad y de sexo masculino, sin encontrar diferencias en el resto de los marcadores de estrés oxidativo.

Existen multitud de trabajos de investigación que analizan el estrés oxidativo en sujetos no fumadores, fumadores y en pacientes con EPOC, para intentar explicar los mecanismos fisiopatológicos por los cuales algunos fumadores desarrollan EPOC y otros no. También existen estudios que analizan las diferencias entre los valores de estrés oxidativo en las agudizaciones y en fase estable²³. Sin embargo, en nuestro conocimiento no se ha investigado las diferencias en los marcadores de estrés oxidativo en fase estable entre pacientes con EPOC agudizadores y aquellos que no lo son. Los marcadores de estrés oxidativo se han estudiado en diferentes muestras como plasma, esputo, lavado broncoalveolar o muestras de tejido pulmonar²⁴. En este trabajo estudiamos los valores en plasma intentando analizar de forma global la carga de estrés oxidativo del organismo.

La determinación de la peroxidación lipídica es un método habitualmente utilizado para cuantificar el daño oxidativo en distintas patologías. Los niveles de TBARS se han relacionado con el tabaquismo en la EPOC. En nuestro estudio existe un porcentaje similar de fumadores en los grupos agudizador y no agudizador, y no hemos encontrado diferencias en los niveles de TBARS entre pacientes fumadores y no fumadores. Karadag y cols. tampoco observaron diferencias en los valores de peroxidación lipídica determinados por las cifras plasmáticas de malondialdeido, entre fumadores y no fumadores²⁵. Rahman *et cols.* comparando a 29 enfermos con EPOC estable y 15 agudizados mostrando valores significativamente elevados en aquellos con una agudización de la EPOC, aunque no observaron diferencias entre los pacientes con EPOC estables y los fumadores sin obstrucción²⁶. Otro trabajo, de este mismo grupo, observó que tanto los TBARS como los grupos tioles totales alcanzaban valores significativamente más altos durante las exacerbaciones y retornaban a la normalidad en el momento del alta hospitalaria, alcanzando valores muy similares a los obtenidos por nosotros para los grupos tioles totales y para los TBARS en el grupo agudizador²⁷. En este sentido, Wozniak *et cols.* observaron que los niveles de TBARS en los sujetos fumadores se reducían un 43% a los tres meses de dejar el hábito tabáquico, lo que atribuían a la restauración del balance oxidantes-antioxidantes⁶, considerando que era un periodo de tiempo pequeño para valorar la evolución del balance oxidación-reducción a largo plazo. Nosotros encontramos que esta diferencia es fundamentalmente a expensas del sexo masculino, y que son la mayoría de los pacientes incluidos en estos trabajos.

El hecho de que en nuestro estudio observemos valores significativamente más altos de TBARS en el grupo de pacientes no agudizadores, nos lleva a considerar la posibilidad de que no se deba a causas directamente relacionadas con la EPOC. La presencia de cifras más elevadas en la presión arterial diastólica entre los enfermos no agudizadores podría explicar el aumento en los TBARS en este grupo, ya que la hipertensión se ha relacionado con el aumento de diferentes marcadores de estrés oxidativo, incluidos los productos de la peroxidación lipídica²⁸.

La enzima superóxido dismutasa elimina los radicales superóxidos, catalizando su reacción a peróxido de hidrógeno. Los pacientes no agudizadores de nuestro estudio mostraron valores similares a los que encuentran Rai *et cols.* en enfermos con EPOC al compararlos con controles sanos²⁹. Por otro lado, en el grupo agudizador también observamos valores similares a los encontrados por Rai *et cols.* en sujetos con bronquiectasias que suelen presentar infección bronquial crónica y agudizaciones repetidas, circunstancia también frecuente entre los enfermos agudizadores con EPOC. Oliveira *et cols.* también encontraron valores más reducidos de la enzima superóxido dismutasa e incremento intracelular de anión superóxido en pacientes con bronquiectasias en comparación con los controles³⁰. Diferentes autores han observado una disminución de la enzima superóxido dismutasa en el ingreso hospitalario de pacientes con EPOC y que se mantienen reducidos al alta²⁷. Este hecho ha sido justificado por mantener una elevación de radicales libres que condicionarían que los sistemas antioxidantes se agoten. Stanojkovic *et cols.* también describieron un aumento de sustancias prooxidantes en los pacientes con cardiopatía isquémica³¹. Los enfermos con EPOC suelen tener importantes comorbilidades y por ello pueden influir otros factores que actúen sobre los fenómenos de oxidación-reducción en el momento de una agudización y en los meses posteriores.

Dentro de los múltiples marcadores de estrés oxidativo existentes, el más cercano a alcanzar utilidad en la práctica clínica es la cuantificación del receptor soluble de los productos finales de glicosilación avanzada, éste se encuentra en estudio para identificar a los sujetos con riesgo de progresión del enfisema³². Sin embargo, en nuestro trabajo hemos analizado los niveles plasmáticos de productos finales de glicosilación y, como observan otros autores, no están más elevados en pacientes con EPOC que en controles sanos, probablemente debido a su gran volatilidad y a que sus resultados pueden afectarse por la alimentación y el hábito tabáquico³³. No existen en nuestro conocimiento trabajos que analicen cómo se comporta este biomarcador en las agudizaciones de la EPOC.

Una fortaleza de nuestro estudio es que los sujetos fueron seleccionados consecutivamente de entre los atendidos en una consulta monográfica de EPOC siempre por la misma persona lo que garantiza una correcta inclusión en el fenotipo agudizador o no agudizador. Las pruebas complementarias fueron realizadas por el mismo personal de enfermería especialmente entrenado para ello.

Entre las limitaciones de nuestro trabajo se encuentra la falta de grupo control para establecer las diferencias con fumadores y no fumadores sin EPOC. Tampoco hemos determinado los receptores solubles de los productos finales de glicosilación avanzada relacionados con el predominio de la inflamación neutrofílica, con la alteración de la función pulmonar (desarrollo del enfisema) y riesgo cardiovascular³⁴. Por otra parte, nuestra muestra es fundamentalmente de pacientes con EPOC en estadios avanzados lo que limita la extrapolación de los resultados al conjunto de enfermos con EPOC.

Con todo lo reflejado previamente podemos concluir que no existen grandes diferencias en los valores de estrés oxidativo analizados entre pacientes agudizadores y no agudizadores en fase estable. Hemos encontrado sólo elevación de los TBARs en pacientes no agudizadores, que probablemente sean debidos a causas diferentes a la propia agudización de la EPOC. Son necesarios estudios prospectivos y con un mayor número de pacientes que nos permitan establecer relaciones de causalidad y analizar otros aspectos de interés suscitados en el presente estudio.

BIBLIOGRAFIA:

1. Rajendrasozhan S, Yang SR, Edirisinghe I et al. Deacetylases and NF-kappaB in redox regulation of cigarette smoke-induced lung inflammation: epigenetics in pathogenesis of COPD. *Antioxid Redox Signal*. 2008; 10:799-811.
2. Cavalcante AG, de Bruin PF. The role of oxidative stress in COPD: current concepts and perspectives. *J Bras Pneumol*. 2009; 35:1227-37.
3. Louhelainen N, Ryttila P, Haahtela T et al. Persistence of oxidant and protease burden in the airways after smoking cessation. *BMC Pulm Med*. 2009; 9:25.
4. Barnes PJ. Mechanisms of development of multimorbidity in the elderly. *Eur Respir J*. 2015; 45:790-806
5. Ogino K, Wang DH. Biomarkers of oxidative/nitrosative stress: an approach to disease prevention. *Acta Med Okayama*. 2007; 61:181-9.
6. Wozniak A, Gorecki D, Szpinda M et al. Oxidant-antioxidant balance in the blood of patients with chronic obstructive pulmonary disease after smoking cessation. *Oxid Med Cell Longev*. 2013: 897075.
7. Wu L, Ma L, Nicholson LF et al. Advanced glycation end products and its receptor (RAGE) are increased in patients with COPD. *Respir Med*. 2011; 105:329-36.
8. Gopal P, Reynaert NL, Scheijen JL et al. Plasma advanced glycation end-products and skin autofluorescence are increased in COPD. *Eur Respir J*. 2014; 43:430-8.
9. Kirkham PA, Barnes PJ. Oxidative stress in COPD. *Chest*. 2013; 144:266-73.
10. Fischer BM, Voynow JA, Ghio AJ. COPD: balancing oxidants and antioxidants. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2015; 10:261-76.
11. Ramírez-Prieto MT, García-Río F, Villamor J. Papel del estrés oxidativo en las enfermedades respiratorias y su monitorización. *Med clin*. 2006; 127: 386-96.
12. Rahman I, MacNee W. Antioxidant pharmacological therapies for COPD. *Curr Opin Pharmacol*. 2012; 12:256-65.
13. Miravittles M, Soler-Cataluna JJ, Calle M et al. Spanish guidelines for management of chronic obstructive pulmonary disease (GesEPOC) 2017. Pharmacological treatment of stable phase. *Arch Bronconeumol*. 2017; 56:324-35.
14. Garcia-Rio F, Calle M, Burgos F et al. Espirometria. Normativa Sociedad Española de Patología Respiratoria. (SEPAR). *Arch Bronconeumol*. 2013; 49: 388-401.

15. Roca J, Burgos F, Sunyer J et al. Reference values for forced spirometry. Group of the European Community Respiratory Health Survey. *Eur Respir J*. 1998; 11:1354-62.
16. Miller NJ, Rice-Evans C, Davies MJ et al. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin Sci. (Lond)*. 1993; 84: 407-12.
17. Hu ML. Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma. *Methods Enzymol*. 1994; 233: 380-5.
18. Sandstrom J, Nilsson P, Karlsson K et al. 10-fold increase in human plasma extracellular superoxide dismutase content caused by a mutation in heparin-binding domain. *J Biol Chem*. 1994; 269:19163-6.
19. Yagi K. Simple assay for the level of total lipid peroxides in serum or plasma. *Methods Mol Biol*. 1998; 108:101-6.
20. Arab K, Steghens JP. Plasma lipid hydroperoxides measurement by an automated xylenol orange method. *Anal Biochem*. 2004; 325: 158-63.
21. Kalousova M, Zima T, Tesar V et al. Advanced glycation end products and advanced oxidation protein products in hemodialyzed patients. *Blood Purif*. 2002; 20: 31-6.
22. From the global strategy for the diagnosis, management and prevention of COPD, Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) 2016. Available from: <http://www.goldcopd.org/>. Date last updated: Nov 2017. Date last accessed: April 1,2018
23. Gerritsen WB, Asin J, Zanin J et al. Markers of inflammation and oxidative stress in exacerbated chronic obstructive pulmonary disease patients. *Respir Med*. 2005; 99: 84-90.
24. Inonu H, Doruk S, Sahin S et al. Oxidative stress levels in exhaled breath condensate associated with COPD and smoking. *Resp Care*. 2012; 57: 413-9.
25. Karadag F, Cildag O, Altinisik et al. Trace elements as a component of oxidative stress in COPD. *Respirology*. 2004; 9: 33-7.
26. Rahman I, MacNee W. Role of oxidants/antioxidants in smoking-induced lung diseases. *Free Radic Biol Med*. 1996; 21: 669-81.
27. Rahman I, Skwarska EF, MacNee W et al. Attenuation of oxidant/antioxidant imbalance during treatment of exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax*. 1997; 52: 565-8.
28. Ferroni P, Basili S, Paoletti V et al. Endothelial dysfunction and oxidative stress in arterial hypertension. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2006; 16: 222-33.

29. Rai RR, Phadke MS. Plasma oxidant-antioxidant status in different respiratory disorders. *Indian J Clin Biochem.* 2006; 21:161-4.
30. Oliveira G, Oliveira C, Dorado A et al. Cellular and plasma oxidative stress biomarkers are raised in adults with bronchiectasis. *Clin Nutr.* 2013; 32: 112-7.
31. Stanojkovic I, Kotur-Stevuljevic J, Milenkovic B et al. Pulmonary function, oxidative stress and inflammatory markers in severe COPD exacerbation. *Respir Med.* 2011;105 Suppl 1:S31-7.
32. Yonchuk JG, Silverman EK, Bowler RP et al. Circulating soluble receptor for advanced glycation end products (sRAGE) as a biomarker of emphysema and the RAGE axis in the lung. *Am J Respir Crit Care Med.* 2015; 192:785-92.
33. Hoonhorst SJ, Lo Tam Loi AT, Pouwels SD et al. Advanced glycation endproducts and their receptor in different body compartments in COPD. *Respir Res.* 2016; 17: 46.
34. Urban MH, Valipour A, Kiss D et al. Soluble receptor of advanced glycation end-products and endothelial dysfunction in COPD. *Respir Med.* 2014; 108: 891-7.

TABLAS

Tabla 1. Características generales de la población de estudio según fenotipo.

	Población Estudio n=107	AGUDIZADOR n= 50	NO AGUDIZADOR n=57	p
Sexo (hombre) %	79 (73,8)	38 (76,0)	41 (71,9)	0,663
Edad (años)	63,1 ± 6,6	63,4±5,7	62,9±7,3	0,771
Fumador %	34 (31,8)	16 (32,0)	18 (31,6)	0,963
Cooximetría (ppm)	4,94 ± 6,62	4,52 □ 5,89	5,30 □ 7,29	0,393
Disnea MRC	1,81 □ 0,60	1,92 □ 0,57	1,72 □ 0,62	0,054
Comorbilidades (%)				
• Enfermedad Cardiovascular	25 (23,4)	11 (22,0)	14 (24,6)	0,755
• Fibrilación Auricular	10 (9,3)	7 (14,0)	3 (5,3)	0,121
• Hipertensión Arterial	66 (61,7)	32 (64,0)	34 (59,6)	0,644
• Diabetes	18 (16,8)	11 (22,0)	7 (12,3)	0,180
• Dislipemia	40 (37,4)	18 (36,0)	22 (38,6)	0,782
• Insuficiencia Renal	3 (2,8)	1 (2,0)	2 (3,5)	0,637
• Síndrome metabólico	43 (40,2)	21 (42,0)	22 (38,6)	0,720
• Índice de Charlson	1,63 ± 0,92	1,62 ± 0,86	1,63 ± 0,98	0,515
• Índice de Cote	1,27 ± 2,18	0,96±1,96	1,62±2,37	0,121
Medicación (%)				
• LABA	103 (96,3)	49(98,0)	54(94,7)	0,375
• LAMA	102 (95,3)	48 (96,0)	54(94,7)	0,757
• Corticoides inhalados	90 (84,1)	46(92,0)	44(77,2)	0,037
IMC (kg/m ²)	28,3 ± 6,2	28,8 ± 7,5	27,8 ± 4,9	0,549
FVC (ml) post.	2308 ± 722	2211 ± 605,7	2393 ± 806,2	0,186
FVC (%) post.	58,5 ± 14,1	55,3 ± 12,9	61,3 ± 14,6	0,027
FEV ₁ (ml) post.	1244 ± 473	1213 ± 400,3	1271 ± 531	0,520
FEV ₁ (%) post.	43,9 ± 14,1	41,8 ± 11,9	45,7 ± 15,7	0,153
GOLD II	38 (35,8)	16 (32,0)	22 (39,3)	NS
GOLD III	50 (47,2)	25 (50,0)	25 (44,6)	
GOLD IV	18 (17,0)	9 (18,0)	9 (16,1)	
FEV ₁ /FVC (%)	52,1 ± 10,7	53,6 ± 10,4	50,8 ± 10,9	0,180
Índice BODE	3,0 ± 1,6	3,4 ± 1,6	2,6 ± 1,5	0,018

IMC: índice de masa corporal, PAD: presión arterial diastólica, PAS: presión arterial sistólica, FVC: capacidad vital forzada; FEV₁: Volumen máximo de aire espirado en el primer segundo; post: postbroncodilatador. Los datos se expresan como (n)% o media □ desviación estándar.

Tabla 2. Valores de los marcadores de estrés oxidativo de la población de estudio según fenotipo.

	Población Estudio n=107	AGUDIZADOR n= 50	NO AGUDIZADOR n=57	p
TBARS (□mol/L)	1,6 ± 1,3	1,3 ± 1,0	1,8 ± 1,5	0,018
LOOh (□mol/L)	10,3 ± 5,8	10,7 ± 7,4	9,9 ± 4,0	0,968
AGEs (RFU)	641,1 ± 202,1	633,1 ± 200,9	648,2 ± 204,7	0,699
AOPPs (□mol/L)	89,2 ± 50,5	86,6 ± 50,7	91,5 ± 50,7	0,620
SHT (□mol/L)	42,1 ± 5,9	41,6 ± 6,4	42,6 ± 5,4	0,355
TAS (mmol/L)	1,64 ± 0,20	1,98 ± 0,87	1,93 ± 0,78	0,846
SOD (UI/ml)	1,6 ± 1,3	1,5 ± 1,4	1,8 ± 1,2	0,091

TBARS: especies reactivas del ácido tiobarbitúrico; LOOH: hidroperóxidos lipídicos; AGEs: productos finales de glicosilación avanzada; AOPPs: productos avanzados de oxidación proteica; SHT: grupos tioles totales; TAS: estado total antioxidante del suero; SOD: actividad superóxido dismutasa. Los datos se expresan como media \pm desviación estándar.

Tabla 3. Análisis univariado de la asociación de los marcadores de estrés oxidativo con el fenotipo agudizador.

	OR (IC 95%)	P
TBARS (\square mol/L)	0,677 (0,452-1,014)	0,058
LOOH (\square mol/L)	1,025 (0,957-1,098)	0,479
AGEs (RFU)	1,000 (0,998-1,002)	0,699
AOPPs (\square mol/L)	0,998 (0,990-1,006)	0,613
SHT (\square mol/L)	0,969 (0,908-1,035)	0,353
TAS (mmol/L)	0,791 (0,080-7,868)	0,842
SOD (UI/ml)	0,838 (0,618-1,137)	0,256

TBARS: especies reactivas del ácido tiobarbitúrico; LOOH: hidroperóxidos lipídicos; AGEs: productos finales de glicosilación avanzada; AOPPs: productos avanzados de oxidación proteica; SHT: grupos tioles totales; TAS: estado total antioxidante del suero; SOD: actividad superóxido dismutasa. Los datos se expresan como odds ratio (intervalo de confianza 95%).

Tabla 4. Valores de estrés oxidativo categorizados por la mediana de edad (65 años) según fenotipo

	≤ 65 años			>65 años		
	AGUDIZADOR n= 29	NO AGUDIZADOR n= 28	p	AGUDIZADOR n= 21	NO AGUDIZADOR n=29	p
TBARS (\square M)	1,502 \pm 1,220	1,663 \pm 1,153	0,321	1,030\pm0,433	2,002\pm1,839	0,014
LOOH (\square mol/L)	9,8 \pm 3,7	9,9 \pm 3,9	0,873	12,0 \pm 10,6	9,9 \pm 4,2	0,898
AGEs (RFU)	613,7 \pm 211,9	645,9 \pm 154,2	0,241	659,9 \pm 186,2	650,6 \pm 246,8	0,510
AOPPs (\square mol/L)	93,7 \pm 62,1	83,7 \pm 46,1	0,649	76,8 \pm 27,1	99,1 \pm 54,6	0,205
SHT (\square mol/L)	43,3 \pm 5,4	44,1 \pm 5,1	0,532	39,3 \pm 7,1	41,2 \pm 5,4	0,279
TAS (mmol/L)	1,6 \pm 0,2	1,6 \pm 0,1	0,626	1,7 \pm 0,2	1,7 \pm 0,2	0,709
SOD (U/mol)	1,5 \pm 1,5	1,7 \pm 1,2	0,199	1,4 \pm 1,2	1,8 \pm 1,3	0,373

TBARS: especies reactivas del ácido tiobarbitúrico; LOOH: hidroperóxidos lipídicos; AGEs: productos finales de glicosilación avanzada; AOPPs: productos avanzados de oxidación proteica; SHT: grupos tioles totales; TAS: estado total antioxidante del suero; SOD: actividad superóxido dismutasa. Los datos se expresan como media \pm desviación estándar.

Tabla 5. Valores de estrés oxidativo categorizados por el sexo según fenotipo.

	Mujeres			Hombres		
	AGUDIZADOR n=12	NO AGUDIZADOR n= 16	p	AGUDIZADOR n=38	NO AGUDIZADOR n=41	p
TBARS (\square M)	1,411 \pm 0,710	1,700 \pm 0,908	0,450	1,270\pm1,071	1,888\pm1,728	0,035
LOOH (\square mol/L)	8,6 \pm 3,4	8,1 \pm 2,5	0,945	11,4 \pm 8,2	10,6 \pm 4,3	0,825
AGEs (RFU)	599,8 \pm 160,8	606,7 \pm 236,4	0,837	643,6 \pm 212,8	664,4 \pm 191,8	0,549
AOPPs (\square mol/L)	60,1 \pm 18,5	74,7 \pm 45,1	0,302	95,0 \pm 54,8	98,1 \pm 51,8	0,887
SHT (\square mol/L)	41,6 \pm 6,2	42,7 \pm 5,3	0,732	41,6 \pm 6,5	42,6 \pm 5,5	0,887
TAS (mmol/L)	1,5\pm0,1	1,6\pm0,1	0,029	1,7 \pm 0,2	1,7 \pm 0,2	0,346

SOD (U/mol)	1,6±1,0	1,7±1,0	0,945	1,4±1,5	1,8±1,4	0,075
-------------	---------	---------	-------	---------	---------	-------

TBARS: especies reactivas del ácido tiobarbitúrico; LOOH: hidroperóxidos lipídicos; AGEs: productos finales de glicosilación avanzada; AOPPs: productos avanzados de oxidación proteica; SHT: grupos tioles totales; TAS: estado total antioxidante del suero; SOD: actividad superóxido dismutasa. Los datos se expresan como media \pm desviación estándar