



EXPRESIÓN LOCAL DE REACTANTES DE FASE AGUDA EN LA ENFERMEDAD PULMONAR OBSTRUCTIVA CRÓNICA

B. Rojano Broz¹, E. Arellano², M. López Porras¹, C. Calero¹, J. Saenz², A. Blanco¹, C. Mora¹, D. Tobar¹, P. Cejudo¹, E. Márquez Martín¹, F. Ortega¹, JL López-Campos¹.

¹Unidad Médico-Quirúrgica de Enfermedades Respiratorias. ²Instituto de Investigación Biomédica. Hospital Universitario Virgen del Rocío. Sevilla.

Estudio financiado por Fundación Neumotur.

Resumen

Objetivo: determinar la expresión de ARNm de proteína-C-reactiva (PCR) y amiloide-A-sérico (AAS) en parénquima pulmonar y tejido bronquial de pacientes EPOC en fase estable. Comparar dicha expresión de ARNm con la de sujetos fumadores sin la enfermedad.

Método: estudio observacional analítico de casos-control. Se incluyeron pacientes EPOC en fase estable (casos) y sujetos fumadores sin la enfermedad (controles) en lista de espera de Cirugía Torácica. A todos los sujetos se les realizó una evaluación clínico-funcional y determinación de la expresión de ARNm de reactantes de fase aguda (RFA) mayores en parénquima pulmonar y tejido bronquial mediante RT-qPCR con análisis de expresión relativa. Se estudió la correlación entre el consumo de tabaco y la expresión de PCR, las diferencias en la expresión de ARNm entre el parénquima y el bronquio y entre casos y controles.

Resultados: se incluyeron 35 pacientes con EPOC y 42 controles. Tanto el parénquima como el bronquio fueron capaces de expresar ARNm de ambos RFA mayores. Se observó una correlación entre el consumo acumulado de tabaco y la secreción de PCR ($r=0,32$, $p=0,007$). Al comparar los casos con los controles, se observó que la distribución de la expresión en el bronquio fue ligeramente superior en los sujetos con EPOC que en los pacientes sin la enfermedad. En el parénquima, sin embargo, observamos el efecto contrario, aunque sin alcanzar la significación estadística.

Conclusión: tanto el parénquima como el bronquio son capaces de sintetizar ambos RFA mayores. El patrón de secreción parecer ser distinto según la localización anatómica.

Palabras clave: enfermedad pulmonar obstructiva crónica, inflamación sistémica, reactantes de fases aguda, proteína C reactiva, amiloide A sérico.

Local expression of acute-phase reactants in chronic obstructive pulmonary disease

Abstract

Objective: to determine the mRNA expression of C-reactive protein (CRP) and serum amyloid-A (SAA) in pulmonary parenchyma and bronchial tissue of COPD patients in the stable phase, and to compare this mRNA expression with that of smokers without the disease.

Method: analytical, observational case-control study. Patients with COPD in the stable phase (cases) and smokers without the disease (controls) on the thoracic surgery waiting list were included in the study. A clinical-functional evaluation was made for all the participants, together with the determination of the mRNA expression of major acute-phase reactants (APR) in pulmonary parenchyma and bronchial tissue by means of RT-qPCR with relative expression analysis. The correlation between tobacco consumption and CRP expression, and the differences in mRNA expression between parenchyma and the bronchus in cases and controls were studied.

Results: there were 35 patients with COPD and 42 controls included. Parenchyma was able to express mRNA of both major APR as much as the bronchus. A correlation between accumulated tobacco consumption and the secretion of CRP was observed ($r=0,32$, $p = 0.007$). When comparing the cases with the controls, it was observed that the distribution of the expression in the bronchus was slightly greater in the subjects with COPD than in the patients without the disease. However, the opposite effect was observed in parenchyma, although without reaching statistical significance.

Conclusions: the parenchyma and the bronchus were equally capable of synthesising both major APR. The secretion pattern seems to be different according to the anatomical location.

Key words: chronic obstructive pulmonary disease, acute systemic inflammation, acute-phase reactants, C-reactive protein, serum amyloid A.

INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas se han descrito diversas repercusiones extratorácicas de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). Aunque la patogenia de estas manifestaciones sistémicas está aún poco clara,

diversos estudios las han relacionado con la presencia de moléculas inflamatorias en suero, describiéndose que podrían tener un papel relevante al contribuir a un estado de inflamación sistémica permanente que podría ser responsable de algunos de estos efectos extrapulmonares^{1,2}.

Recibido: 15 de marzo de 2010. Aceptado: 15 de noviembre de 2010.

Dra. Belén Rojano Broz.
belencanaria@hotmail.com

Dentro de los distintos marcadores inflamatorios sistémicos estudiados, los llamados reactantes de fase aguda (RFA) parecen tener una especial importancia en la inflamación sistémica, debido a su importante papel como nexo fisiológico entre la respuesta inflamatoria local y la sistémica³. Estos RFA constituyen un grupo heterogéneo de proteínas que se sintetizan en el hígado y cuya cantidad en la circulación aumenta rápidamente en presencia de inflamación y de necrosis tisular. Esta liberación de RFA se produce en respuesta a la mediación de citoquinas inflamatorias, entre las que figuran la interleucina-1, la interleucina-6 y el factor de necrosis tumoral α ⁴. Según su capacidad de estimulación, se han descrito dos tipos de RFA: los RFA mayores, proteína C reactiva (PCR) y amiloide A sérico (AAS), cuya concentración en suero aumenta hasta mil veces ante un estímulo y los RFA menores cuya concentración aumenta en menor medida.

El papel de los RFA mayores en la respuesta inflamatoria aguda está parcialmente estudiado y entre sus principales efectos figuran la acción inmunomoduladora⁵, efectos sobre el genoma⁶ y efectos sobre el metabolismo lipídico⁷. Sin embargo, su papel en la respuesta inflamatoria crónica está comenzando a estudiarse. En los últimos años se ha empezado a describir una relación entre la estimulación mantenida de estos RFA y diversas enfermedades crónicas. En la EPOC el papel de la PCR se ha estudiado en una triple vertiente: su relación con la repercusión sistémica de la enfermedad⁸, su papel como marcador pronóstico³ y su posible utilidad como marcador para distinguir una exacerbación infecciosa del resto⁹.

Por otro lado, el AAS ha sido sólo estudiado en relación con las agudizaciones de la EPOC¹⁰. No obstante, debido a su función fisiológica como componente de las lipoproteínas, tendría sentido pensar que pudiera jugar un papel importante como nexo de unión entre la EPOC y algunas de sus manifestaciones sistémicas, especialmente en relación a los eventos cardiovasculares.

Por el momento, la implicación final de los RFA en la patogenia de las manifestaciones sistémicas de la EPOC no ha sido completamente dilucidada, planteándose cuestiones no resueltas sobre su secreción, perpetuación en el tiempo e influencia final en un determinado efecto de la enfermedad en órganos diana distintos del pulmón¹. En este sentido, aunque la hipótesis más aceptada es que los RFA son producidos exclusivamente en el hígado como respuesta a un patrón de citoquinas determinado⁴, es posible que estos reactantes sean producidos localmente en otros

tejidos, de manera análoga a como ocurre en otras enfermedades crónicas como la artritis reumatoide¹¹ o en la placa de ateroma¹².

Por tanto el objetivo del presente trabajo fue evaluar si el tejido pulmonar es capaz de sintetizar RFA¹³ y en caso de que así sea, comparar dicha producción entre las distintas localizaciones anatómicas y las diferencias entre pacientes con EPOC comparados con pacientes ex-fumadores que no padecen la enfermedad.

MATERIAL Y MÉTODO

Se llevó a cabo un estudio observacional analítico de caso-control, en el que se compararon los niveles de distintos RFA en muestras quirúrgicas de tejido de pacientes fumadores con EPOC en fase estable frente a pacientes fumadores sin EPOC. El estudio contó con la aprobación del Comité Ético del Hospital Universitario Virgen del Rocío, observándose las normas de la Declaración de Helsinki para estudios con seres humanos y se obtuvo consentimiento informado por escrito de cada participante previo a la inclusión en el estudio.

Se incluyeron a los pacientes que ingresaron de forma programada en nuestra unidad para la realización de una intervención reglada de resección pulmonar (lobectomía o neumonectomía) por una neoplasia de pulmón. Para su inclusión se requirió que los pacientes estuvieran estables clínicamente y que fueran capaces de completar los cuestionarios del estudio.

Aquellos pacientes que padecieran alguna enfermedad concomitante crónica o inflamatoria que pueda estar asociada en la elevación de los RFA, aparición de algún evento isquémico agudo de cualquier naturaleza en los seis meses previos, disponer de ventilación mecánica domiciliaria, insuficiencia cardíaca congestiva, insuficiencia renal terminal o cirrosis hepática fueron excluidos. Además, se excluyeron aquellos pacientes que habían recibido quimioterapia o radioterapia sobre el tórax y aquellos casos en los que el tiempo de extracción de la pieza quirúrgica fue superior a dos horas.

Para la asignación de cada paciente a su grupo se recogió la espirometría del estudio preoperatorio. El diagnóstico de EPOC se realizó según la normativa internacional GOLD 2009¹⁴ y la normativa nacional SEPAR 2009¹⁵, exigiéndose una exposición prolongada a inhalantes de riesgo (consumo acumulado de tabaco >10 paquetes-año) y tener una espirometría con una obstrucción crónica al flujo aéreo con un cociente

entre el volumen espiratorio máximo en el primer segundo (FEV_1) y la capacidad vital forzada (FVC) menor de 0,7 realizada en fase estable y que no fuera completamente reversible tras el test broncodilatador.

Antes de la intervención se realizó una evaluación clínica, recogiendo de cada sujeto edad, sexo, evaluación del estado nutricional, consumo acumulado de tabaco, estabilidad clínica en los meses previos, grado de disnea, comorbilidades y tratamiento médico habitual recogido en principio activo y dosis habitual, expresándose la dosis de corticoides inhalados en $\mu\text{g}/\text{día}$ de fluticasona o equivalente. El día de la intervención se recogió el estadiaje TNM del tumor, el tipo de resección practicada y la medicación que recibía previa a la intervención.

Extracción de muestra quirúrgica

Durante la intervención quirúrgica se recogió el tiempo desde la apertura del plano cutáneo hasta la obtención de la pieza para garantizar que no se superaban las dos horas. Una vez extraída la pieza quirúrgica, se procedió a seleccionar una porción de parénquima pulmonar macroscópicamente normal y que estuviera lo más alejada posible de la lesión que había motivado la intervención. Posteriormente se extrajo una sección de bronquio subsegmentario, lo más alejada posible de la lesión que había motivado la intervención y separada del plano de resección quirúrgica. Esta separación se realizó en el mismo quirófano en una mesita auxiliar y estéril. Tras obtener las muestras, el resto de la pieza anatómica siguió el tratamiento habitual según protocolo del hospital acorde al caso clínico del paciente.

Extracción de ARN de las muestras de tejido. Se llevó a cabo mediante la técnica relativa de RT-qPCR que incluye 3 fases consecutivas: extracción del RNA, retrotranscripción a cDNA y amplificación del gen. La extracción del RNA se realizó en fresco empleando el kit comercial RNeasy Mini Kit (Qiagen, EEUU), según las instrucciones del fabricante. La retrotranscripción a cDNA se realizó con el kit SuperScript II. Finalmente, la amplificación del gen se realizó mediante la reacción en cadena de las polimerasa en tiempo real. Se determinó la expresión de la PCR y el AAS de manera relativa comparando su valor con la expresión constitutiva de β -actina como control de la reacción, según el método $2^{-\Delta\text{Ct}}$ ¹⁶. De esta manera se obtiene la diferencia entre ambas expresiones genéticas (ΔCt).

Métodos de medición

Cuestionarios. El grado de disnea se evaluó mediante la escala modificada de la Medical Research Council (mMRC). En dicha escala se evalúa el grado de disnea del paciente según una escala de entre 0 y 4, donde 4 representa el máximo grado de disnea¹⁷. El cálculo del consumo acumulado en paq-año se obtuvo calculando el cociente entre el número de cigarrillos al día entre 20 y multiplicando el resultado por el número de años fumando esa cantidad. Para valorar la comorbilidad asociada del sujeto se empleó el índice de comorbilidad-edad de Charlson¹⁸. Se trata de un índice sencillo y fácil de aplicar empleado en trabajos previos con pacientes con EPOC¹⁹ que recoge una serie de factores de comorbilidad, permitiendo calcular la probabilidad de supervivencia según una combinación entre edad y dichos factores.

Pruebas de función respiratoria. Todos los sujetos incluidos en el estudio tenían espirometría forzada basal y con test de broncodilatación a los 15 minutos de dos dosis de salbutamol inhalada con cámara de nebulización (200 μg). La técnica se realizó según las recomendaciones de la Sociedad Española de Neumología (SEPAR)²⁰ usando un espirómetro de tipo neumotacógrafo Masterlab (Erich Jaeger GHBH, Würzburg, Alemania).

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el paquete estadístico Statistical Package for Social Sciences (SPSS) versión 16.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, EE.UU.). Para describir las variables cualitativas se emplearon las frecuencias absolutas y relativas. Las variables cuantitativas se describieron mediante la media y la desviación estándar. Los estudios inferenciales se realizaron con test no paramétricos. Para el estudio de las variables cualitativas se empleó el test de la χ^2 o el test exacto de Fisher según procediera. El estudio de las variables cuantitativas como la expresión de RNA se realizó con el test de Mann-Whitney en caso de las comparaciones entre EPOC y no EPOC. Las comparaciones entre la expresión de bronquio y parénquima se realizó con el test de Wilcoxon. Los estudios de correlación se realizaron calculando el coeficiente de correlación de Spearman. El nivel de significación se estableció en 0,05.

RESULTADOS

Descripción de la muestra

La muestra se compuso de 77 sujetos, de los cuales 35 cumplían los criterios diagnósticos de EPOC. Las características de los pacientes incluidos están resumidas en la tabla 1. La muestra de pacientes con EPOC estaba compuesta por 9 (25,7%) pacientes en estadio GOLD 1, 23 (65,7%) en estadio GOLD 2 y 3 pacientes (8,6%) en estadio GOLD 3. La mayoría de los pacientes (33 casos, 94,3%) no referían haber sufrido una agudización que hubiera precisado atención por

un servicio de urgencias en el último año; tan solo hubo un caso que manifestó haber tenido una agudización y otro caso con dos agudizaciones. En relación con el tratamiento, seis pacientes (17,6%) estaban recibiendo tratamiento con una combinación de corticoides inhalados y un β 2-agonistas de acción prolongada, cuatro con salmeterol-fluticasona y dos con formoterol-budesonida, con una dosis de 666 ± 288 μ gr/día de fluticasona o equivalente. Doce (35,3%) pacientes estaban en tratamiento con tiotropio. La cirugía de resección pulmonar se realizó en todos los casos por neoplasia de pulmón primaria. Las interven-

Tabla 1. Descripción de la muestra.

Variable	Global (n = 77)	EPOC (n = 35)	No EPOC (n = 42)	Valor p*
Edad (años)	65 \pm 8,7	67 \pm 6	62 \pm 9	0,017
Hombres	65 (84,4%)	34 (97,1%)	32 (73,8%)	0,004
Fumador activo	9 (11,7%)	2 (5,7%)	7 (16,7%)	0,004
Paquetes-año	52,2 \pm 36,5	69 \pm 35	38 \pm 31	<0,001
Charlson-edad	4,1 \pm 2	5 \pm 2,6	3,4 \pm 1,7	<0,001
Disnea (MRC)	0,6 \pm 0,6	0,8 \pm 0,6	0,4 \pm 0,4	0,001
IMC (Kg/m ²)	27 \pm 6,2	26,7 \pm 7,9	27,3 \pm 4,3	NS
FVC (%)	101 \pm 83	88,4 \pm 18,6	112,2 \pm 110	NS
FEV ₁ (%)	79,8 \pm 18,8	67,9 \pm 15,5	90,1 \pm 15,1	< 0,001
PCR (ng/l)	15,4 \pm 24,9	23,5 \pm 32,4	9 \pm 14,7	0,039
AAS (ng/l)	47,2 \pm 182,2	86,5 \pm 270	16,8 \pm 47,1	NS

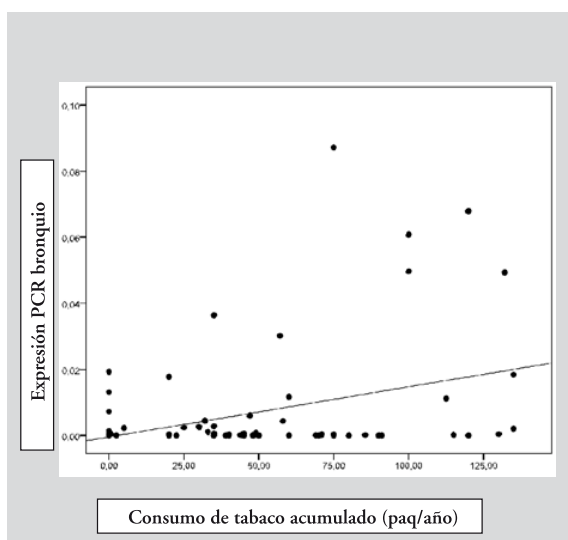


Figura 1. Correlación entre la expresión de PCR en tejido bronquial y el consumo acumulado en paquetes-año.

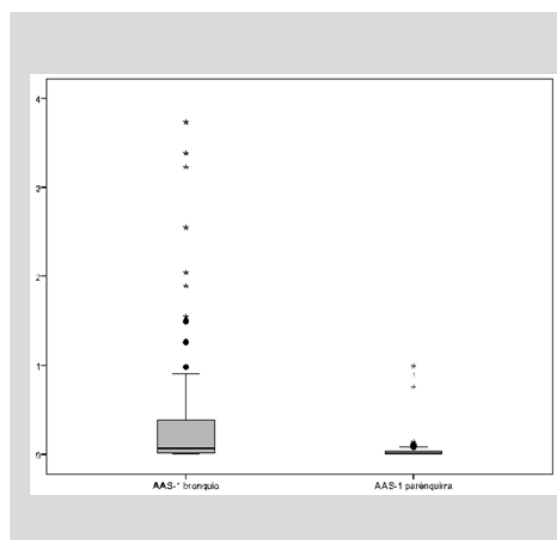


Figura 2. Expresión de RNA mensajero de RFA entre tejido bronquial y parénquima pulmonar. Cohorte global.

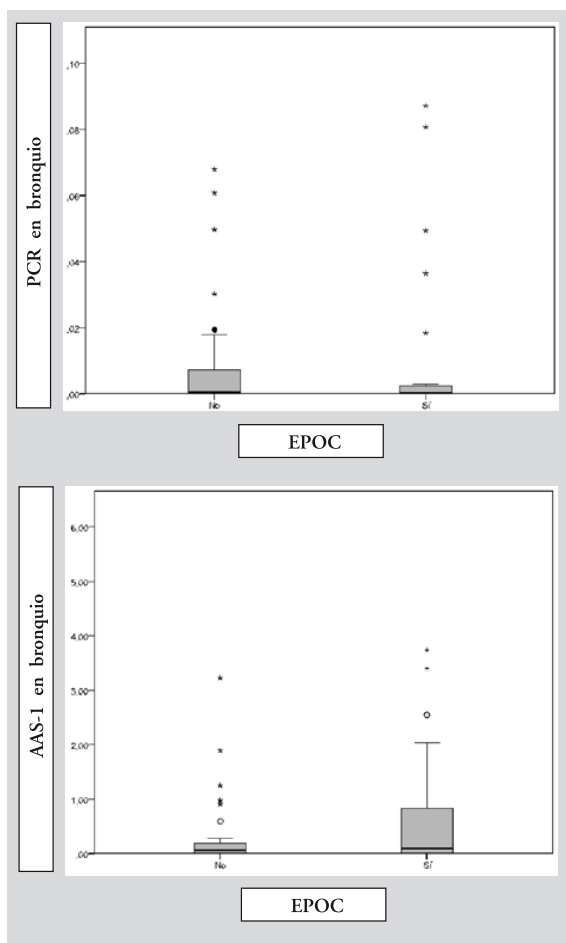


Figura 3. Expresión de RNA mensajero en tejido bronquial de RFA mayores comparando EPOC con no EPOC.

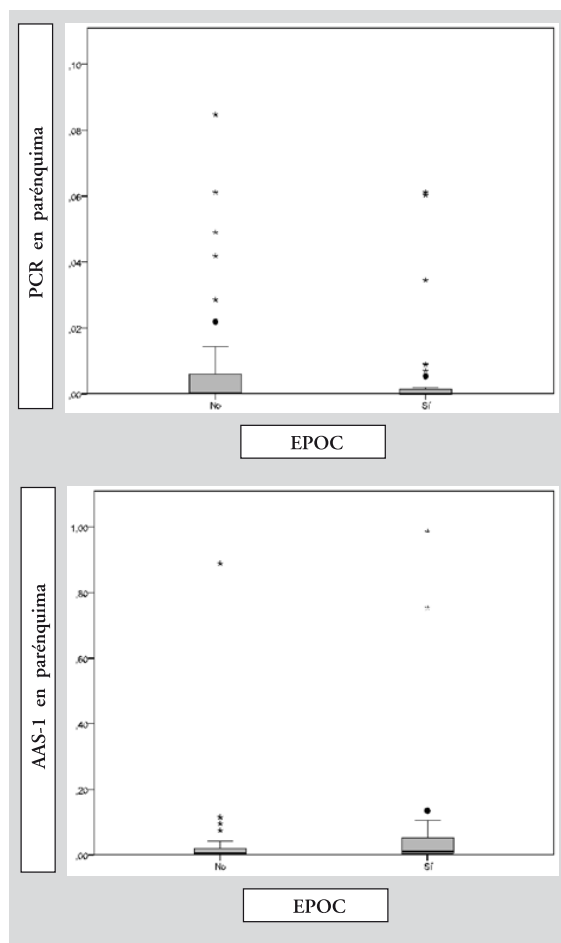


Figura 4. Expresión de RNA mensajero en parénquima pulmonar de RFA mayores, comparando EPOC con no EPOC.

ciones fueron 5 (6,5%) neumectomías, 70 (90,9%) lobectomías y 2 (2,6%) resecciones atípicas. En 43 (55,8%) casos la intervención se realizó en el lado derecho, mientras que 34 (44,2%) casos la cirugía fue de lado izquierdo.

Expresión de tisular de RFA mayores

Al analizar la expresión de RNA mensajero de PCR y SAA en tejido bronquial y parénquima pulmonar, observamos que ambos tejidos sintetizan dichas moléculas. No encontramos una diferente expresión entre los RFA y la toma de corticoides inhalados, la edad o el sexo. Respecto al consumo acumulado en paquetes-año, encontramos una correlación significativa con la expresión de PCR en el tejido bronquial ($r = 0,32$; $p = 0,007$; figura 1). En la muestra global, la expresión de ambos RFA en el tejido bronquial y el parénquima

pulmonar presentaban diferencias significativas para AAS-1 ($p < 0,001$; figura 2).

Comparación entre casos y controles

El estudio de la distribución de la expresión de RFA mayores en tejido entre pacientes con EPOC y los sujetos sin la enfermedad está reflejada en las figuras 3 y 4. La distribución de la expresión en el bronquio fue superior en los sujetos con EPOC que en los pacientes sin la enfermedad (figura 3). En el parénquima, sin embargo, observamos el efecto contrario, con un aumento en la síntesis de RFA en el parénquima de los pacientes sin EPOC (figura 4). Aunque estas diferencias no alcanzaron la significación estadística, presentan una tendencia interesante que podría estar indicando una asociación al aumentar el tamaño de la muestra.

DISCUSIÓN

El presente trabajo aporta nueva información preliminar sobre la procedencia de la inflamación sistémica en la EPOC. Nuestros resultados podrían ser de utilidad en el conocimiento de la patogénesis de la enfermedad y sus repercusiones sistémicas. Aunque existen estudios previos que analizan la expresión de la inflamación de la pequeña vía aérea de forma local con una metodología similar²¹, estos trabajos no han determinado la expresión local de mediadores inflamatorios inespecíficos como son los RFA. Que sepamos el presente trabajo es el primer trabajo que analiza la producción local de estos mediadores inflamatorios en pacientes con EPOC frente a fumadores sanos.

Según estudios previos existe una correlación entre los niveles séricos de PCR y la rápida progresión de la enfermedad. Estos trabajos indican que habría una relación entre la concentración sérica de PCR con la disminución del FEV₁ en pacientes con EPOC, de forma que a mayor concentración de PCR más rápido será el empeoramiento del FEV₁²². En este sentido, hubiera sido interesante incluir en el estudio a pacientes en fases muy avanzadas de la enfermedad para poder analizar la expresión local de los RFA en estos casos. Sin embargo, debido a la imposibilidad para incluir pacientes en estadio IV de la enfermedad por estar limitada la cirugía, no se han podido obtener resultados de este subgrupo de pacientes. Es posible que pacientes con una enfermedad más severa tengan un patrón de secreción distinto y pudieran obtenerse mayores diferencias en los estudios inferenciales.

El AAS ha sido estudiado como marcador de inflamación en las exacerbaciones de pacientes con EPOC¹⁰. Sin embargo, no hay estudios sobre la expresión de dicho RFA en pacientes estables, por lo que estos hallazgos podrían abrir una nueva vertiente en el estudio de la patogénesis de la inflamación sistémica de la enfermedad. En relación con el AAS, aunque algún estudio previo ha analizado el valor del mismo como marcador tumoral en pacientes con cáncer de pulmón²³, el papel de este mediador en la EPOC no ha sido estudiado en profundidad. Aún así, todos los sujetos incluidos en este trabajo estaban afectados de cáncer, de modo que nuestros resultados no estarían explicados por la existencia de la enfermedad neoplásica de base y habría que buscar una respuesta a este patrón de síntesis del AAS.

La falta de relación entre la expresión de los RFA y la dosis de corticoides inhalados es interesante. La relación entre corticoides inhalados y expresión sis-

témica de PCR es un tema de actual controversia. Inicialmente un grupo canadiense demostró que la toma de corticoides inhalados estaba relacionada con la concentración sérica de PCR²⁴, sugiriéndose que el depósito pulmonar de estos fármacos contribuiría a una menor secreción. Sin embargo, posteriormente, ese mismo grupo en un estudio más amplio y con un diseño más elaborado concluía que esto parecía no ser así, de manera que el depósito pulmonar de corticoides no influiría en la secreción de RFA²⁵. Según los datos de nuestro trabajo, la dosis de corticoides no está relacionada con la secreción de estas moléculas inflamatorias, contribuyendo a corroborar los últimos datos publicados en este sentido.

Nuestros resultados sugieren que existe un patrón de secreción distinto en función de la localización anatómica. Este diferente patrón de secreción es interesante y podría ser útil para intentar dilucidar la aportación de la afectación de cada compartimento anatómico en la enfermedad. En este sentido, el distinto fenotipo de la enfermedad (bronquial o enfisematoso) podría estar influyendo nuestros resultados. En el presente estudio no hemos valorado la importancia de este componente de enfisema. En futuros trabajos será necesario hacer una valoración del componente de enfisema para poder realizar una adecuada interpretación de los resultados.

En conclusión, el presente trabajo aporta información novedosa que indica que el tejido pulmonar es capaz de sintetizar RFA cuya secreción puede estar relacionada con variables relacionadas con la EPOC. Es probable que este origen local de un marcador sistémico tenga repercusiones clínicas que deberán ser dilucidadas en futuros trabajos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Pinto-Plata VM, Mullerova H, Toso JF, Feudjo-Tepie M, Soriano JB, Vessey RS, Celli BR. C-reactive protein in patients with COPD, control smokers and non-smokers. *Thorax* 2006; 61(1): 23-28.
2. Dahl M, Vestbo J, Lange P, Bojesen SE, Tybjaerg-Hansen A, Nordestgaard BG. C-reactive protein as a predictor of prognosis in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 175(3): 250-255.
3. Gabay C, Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med* 1999; 340(6): 448-54.
4. Steel DM, Whitehead AS. The major acute phase reactants: C-reactive protein, serum amyloid P component

- and serum amyloid A protein. *Immunol Today* 1994; 15(2): 81-8.
5. Zouki C, Beauchamp M, Baron C, Filep JG. Prevention of in vitro neutrophil adhesion to endothelial cells through shedding of L-selectin by C-reactive protein and peptides derived from C-reactive protein. *J Clin Invest* 1997; 100: 522-529.
 6. Robey FA, Jones KD, Tanaka T, Liu TY. Binding of C-reactive protein to chromatin and nucleosome core particles. A possible physiological role of C-reactive protein. *J Biol Chem* 1984; 259(11): 7311-6.
 7. Banka CL, Yuan T, de Beer MC, Kindy M, Curtiss LK, de Beer FC. Serum amyloid A (SAA): influence on HDL-mediated cellular cholesterol efflux. *J Lipid Res* 1995; 36: 1058-65.
 8. Gan WQ, Man SF, Senthilselvan A, Sin DD. Association between chronic obstructive pulmonary disease and systemic inflammation: a systematic review and a meta-analysis. *Thorax* 2004; 59(7): 574-580.
 9. Weis N, Almdal T. C-reactive protein--can it be used as a marker of infection in patients with exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease? *Eur J Intern Med* 2006; 17(2): 88-91
 10. Bozinovski S, Hutchinson A, Thompson M, Macgregor L, Black J, Giannakis E, Karlsson AS, Silvestrini R, Smallwood D, Vlahos R, Irving LB, Anderson GP. Serum amyloid a is a biomarker of acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 177(3): 269-78.
 11. Brinckerhoff CE, Mitchell TI, Karmilowicz MJ, Kluebeckerman B, Benson MD. Autocrine induction of collagenase by serum amyloid A-like and beta 2-microglobulin-like proteins. *Science* 1989; 243(4891): 655-657.
 12. Malle E, De Beer FC. Human serum amyloid A (SAA) protein: a prominent acute-phase reactant for clinical practice. *Eur J Clin Invest* 1996; 26(6): 427-435.
 13. Said SI. The lung as a metabolic organ. *N Engl J Med* 1968; 279(24): 1330-1334.
 14. Guía de práctica clínica de diagnóstico y tratamiento de la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica. SEPAR-ALAT, 2009. www.separ.es
 15. Guía de práctica clínica de diagnóstico y tratamiento de la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica. SEPAR-ALAT, 2009. www.separ.es
 16. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* 2008; 3(6): 1101-8.
 17. Fletcher CM, Elmes PC, Fairbairn AS, Wood CH. The significance of respiratory symptoms and the diagnosis of chronic bronchitis in a working population. *Br Med J* 1959; 2(5147): 257-266.
 18. Charlson M, Szatrowski TP, Peterson J, Gold J. Validation of a combined comorbidity index. *J Clin Epidemiol* 1994; 47(11): 1245-1251.
 19. de Torres JP, Pinto-Plata V, Casanova C, Mullerova H, Córdoba-Lanús E, Muros de Fuentes M, Aguirre-Jaime A, Celli BR. C-reactive protein levels and survival in patients with moderate to very severe COPD. *Chest* 2008; 133(6): 1336-43.
 20. Manual SEPAR de procedimientos Vol. 3. Barcelona: Ed Doyma, 1987.
 21. Hogg JC, Chu F, Utokaparch S, Woods R, Elliott WM, Buzatu L, et al. The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2004; 350(26): 2645-53.
 22. Higashimoto Y, Iwata T, Okada M, Satoh H, Fukuda K, Tohda Y. Serum biomarkers as predictors of lung function decline in chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Med* 2009; 103(8): 1231-8.
 23. Khan N, Cromer CJ, Campa M, Patz EF Jr. Clinical utility of serum amyloid A and macrophage migration inhibitory factor as serum biomarkers for the detection of nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer* 2004; 101(2): 379-84.
 24. Sin DD, Lacy P, York E, Man SF. Effects of fluticasone on systemic markers of inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 170(7): 760-5.
 25. Sin DD, Man SF, Marciniuk DD, Ford G, FitzGerald M, Wong E, York E, Mainra RR, Ramesh W, Melenka LS, Wilde E, Cowie RL, Williams D, Gan WQ, Rousseau R; ABC (Advair, Biomarkers in COPD) Investigators. The effects of fluticasone with or without salmeterol on systemic biomarkers of inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 177(11): 1207-14.