



Universitat
de les Illes Balears

Departamento de Biología y Ciencias de la Salud

TESIS DOCTORAL
2015

**BASES GENÉTICAS DE LA ENFERMEDAD
PULMONAR OBSTRUCTIVA CRÓNICA**

Volumen II

David Blanquer Escribano (*doctorando*)

Licenciado en Medicina.
Médico Especialista en Neumología

Programa de Doctorado: MEDICINA Y CIENCIAS BÁSICAS



Universitat
de les Illes Balears

Departamento de Biología y Ciencias de la Salud

TESIS DOCTORAL

**BASES GENÉTICAS DE LA ENFERMEDAD
PULMONAR OBSTRUCTIVA CRÓNICA.**

Presentada por:

DAVID BLANQUER ESCRIBANO

Licenciado en Medicina

Médico Especialista en Neumología

Dirigida por:

Prof. Dr. D. DANIEL BACHILLER PÉREZ

Ponente:

Prof. Dr. D. JOSEP TUR MARÍ

Para Dr. por la Universitat de les Illes Balears



Universitat de les Illes Balears

Yo,

Dr. Daniel Bachiller Pérez, del Programa de Desarrollo y Regeneración de la Fundación Caubet-CIMERA (Centro Internacional de Medicina Respiratoria Avanzada) de las Islas Baleares, del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

DECLARO:

Que la tesis doctoral que lleva por título “Bases genéticas de la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica”, presentada por David Blanquer Escribano para la obtención del título de doctor, ha sido dirigida bajo mi supervisión y que cumple con los requisitos necesarios para optar al título de Doctor Internacional.

Y para que quede constancia de ello firmo este documento.

Firma

Palma de Mallorca, 11 de octubre de 2015

ÍNDICE VOLUMEN II

ESTUDIO PILOTO DE “LAS VÍAS MOLECULARES DE EXPRESIÓN GÉNICA DIFERENCIAL DE MUESTRAS CONSECUTIVAS DE 2005 y 2006 DE TEJIDO PULMONAR DEL BIOBANCO DE TEJIDO PULMONAR DEL HOSPITAL DE SON DURETA”.....	11
Introducción	13
HIPÓTESIS DE TRABAJO	17
OBJETIVOS	23
MATERIALES Y MÉTODOS	27
1. Diseño del estudio	29
1.1. Tipo de diseño.....	29
1.1.1. Subestudio clínico-epidemiológico-radio-anatomopatológico de representatividad de los pacientes EPOC del Biobanco de Tejido Pulmonar del Hospital de Son Dureta con muestras evaluadas para expresión génica diferencial.....	29
1.1.2. Subestudio de expresión génica diferencial “gen a gen” y por “grupos de genes” de vías moleculares de las muestras de tejido pulmonar de los pacientes EPOC y de sus fenotipos incluidas en el Biobanco de Tejido Pulmonar del Hospital de Son Dureta entre 2005 y 2006.....	30
1.2. Lugares de ejecución.....	31
1.3. Recursos humanos.....	34
1.4. Financiación.....	35
2. Metodología	36
2.1. Materiales.....	36
2.1.1. Inicio del Biobanco de Tejido Pulmonar del Hospital Son Dureta y bases de una futura Red Nacional de Biobancos de Tejido Pulmonar.....	36
2.1.2. Sujetos del estudio. Criterios de inclusión y exclusión.....	36
2.1.2.1. Criterios de inclusión en quirófano para la toma de muestras para el almacenamiento en el biobanco y posterior estudio.....	36
2.1.2.2. Criterios de exclusión.....	37
2.1.3. Protocolos de procesado de muestras de Cirugía Torácica para almacenamiento en el Biobanco de Tejido Pulmonar y posteriores estudios genéticos y anatomopatológicos.....	37
2.1.4. Extracción del ADN e hibridación con chips de ADN complementario del genoma humano con sondas marcadas con fluorescencia (microarrays Agilent Affimetrix®).....	38
2.1.5. Análisis bioestadístico informatizado de los resultados.....	38
2.1.6. Interpretación de la plausibilidad biológica de los resultados, clasificación etiopatogénica de las vías sobreexpresadas y correlación fenotípica.....	39
2.1.7. Procesado de muestras para su estudio estructural histológico.....	39
2.1.8. Bases de datos clínico-radiológico-funcionales.....	40
2.1.8.1. Obtención prospectiva de las variables de las bases de datos clínico-radiológico- funcionales para la caracterización fenotípica de los grupos.....	40
2.1.8.2. Definiciones de grupos y caracterización de fenotipos pulmonares y sistémicos.....	41
2.2. Análisis estadístico de los resultados.....	46
2.3. Análisis de la plausibilidad biológica de los resultados.....	46
RESULTADOS	47
1. Almacenamiento de tejido pulmonar e inclusión de pacientes en el estudio	49
2. Selección de las muestras con cantidad y calidad preservadas de ADN para la realización de las hibridaciones en Madrid	49
3. Descripción de la población (2) del biobanco con ADN enviado de tejido pulmonar para expresión génica diferencial	50

3.1 Descripción epidemiológica general.....	50
3.2 Diagnósticos oncológicos.....	57
3.3 Características de los grupos EPOC y no EPOC comparados.....	59
3.4 Características de los grupos de fenotipos pulmonares según TAC e historia tabáquica.....	64
4. Descripción de una población control EPOC (1COPD) de consultas externas del Hospital de Manacor.....	65
5. Análisis comparativo epidemiológico de los pacientes EPOC del biobanco (1COPD) y los de consultas externas de Neumología (2COPD).....	73
6. Resultados del análisis principal del estudio: Análisis comparativo bioinformático ROAST de la expresión génica diferencial del tejido pulmonar los pacientes EPOC respecto a los no EPOC	77
6.1. Análisis de la expresión génica diferencial por “grupos de genes” de vías moleculares.....	77
6.2. Análisis de la expresión génica “gen a gen”.....	86
7. Resultados del análisis de la expresión génica diferencial entre fenotipos pulmonares.....	96
7.1. Fenotipos según espirometría e historia tabáquica	96
7.2. Enfisema vs. no enfisema.....	98
7.3. Valoración de otros fenotipos pulmonares.....	99
8. Valoración sobre la posibilidad del análisis de la expresión génica diferencial de los fenotipos sistémicos.....	101
9. Expresión génica diferencial del tejido pulmonar según edad y sexo y valoración de posibles interacciones con la expresión génica diferencial de los Grupos EPOC y no EPOC.....	102
10. Análisis de la plausibilidad biológica de los resultados.....	103
DISCUSIÓN.....	117
1. Consideraciones generales.....	119
1.1. Conclusiones de los estudios previos de asociación (linkeage).....	119
a. Plausibilidad biológica de los resultados de genes candidatos en estudios de asociación.....	119
1.3. Estudio de los fenotipos de la EPOC.....	120
1.4. Necesidad de las redes de biobancos de tejido pulmonar.....	120
2. Limitaciones de nuestro estudio piloto de expresión génica diferencial de los pacientes EPOC en comparación con los otros grandes estudios GWAS.....	121
3. Interpretación de los resultados.....	122
4. Limitaciones del estudio.....	124
5. Puntos favorables diferenciales del estudio.....	124
6. Interpretación de los resultados de la expresión génica de los fenotipos comparados	125
6.1. En los fenotipos pulmonares de la EPOC.....	125
6.2. En los fenotipos sistémicos de la EPOC.....	128
7. Consideraciones para futuros estudios de fenotipado.....	132
8. Importancia de las vías moleculares expresadas diferencialmente en la patogenia de la EPOC.....	137
9. Características de los pacientes EPOC del Biobanco de Tejido Pulmonar del Hospital de Son Dureta.....	138
10. Interpretación de posibles sesgos.....	139
11. Apreciaciones para futuros estudios.....	139
CONCLUSIONES.....	141

**ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE
LAS VÍAS MOLECULARES
IMPLICADAS EN LA PATOGÉNESIS DE LA
EPOC**

INTRODUCCIÓN

La fisiopatología de una enfermedad tan heterogénea como la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC) no es del todo conocida. Investigaciones actuales y futuras marcarán pronto una revolución en este campo mediante la correlación de estudios de asociación amplia de genoma – genome wide association studies (GWAS), estudios de inmunofluorescencia de genes con expresión diferencial en tejido pulmonar (IF), redes de biobancos de tejido pulmonar (RBTP), citometría de flujo y nanotecnología (NT). Se ha generado gran debate en relación con cuáles puedan ser los fenotipos clínicos de la EPOC, los subgrupos con características específicas con resultados clínicos diferenciales y/o con necesidades de tratamientos especiales. Sin embargo, todavía existe una ingente labor por realizar en cuanto a la traducción de esos fenotipos en endotipos, es decir, subgrupos con características específicas con la misma expresión génica diferencial con implicación en determinadas vías etiopatogénicas moleculares.

Nosotros realizamos un estudio de asociación amplia de genoma (genome-wide association study: GWAS) comparando la expresión génica diferencial del ADN complementario (DNAC) de los pacientes con EPOC respecto a los pacientes sin EPOC, a partir del ADN preservado y extraído del tejido pulmonar de las primeras 100 muestras consecutivas obtenidas para el Biobanco de Tejido Pulmonar del Hospital de Son Dureta de Palma de Mallorca (España) en 2005 y 2006, y agrupamos las diferentes vías etiopatogénicas expresadas diferencialmente tratando de correlacionarlas con los conocimientos fisiopatológicos existentes de la EPOC.

Como objetivo secundario, intentamos correlacionar también dichas vías etiopatogénicas sobreexpresadas con las características clínicas, de función pulmonar, radiológicas (TAC) e histológicas (biópsicas) recogidas sistemáticamente en nuestra base de datos del biobanco con la intención de agruparlas en diferentes endotipos.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

Ante la tendencia (futurible entonces) de proliferación actual de biobancos de tejido pulmonar y de redes de biobancos, creímos conveniente hacer una valoración en nuestro Biobanco de Tejido Pulmonar del Hospital de Son Dureta entre 2005 y 2006, sobre qué rango de pacientes EPOC representaban los escindidos de tejido pulmonar por Cirugía Torácica, y evaluar con unas bases de datos amplias y mediante estudio genómico, en un estudio piloto, si podría ser un modelo fiable para estudiar la expresión génica diferencial de la EPOC y de sus fenotipos, y qué sesgos deberíamos tener en cuenta aprovechando al máximo los datos preoperatorios, anamnesis general y exámenes rutinarios prequirúrgicos.

Suponíamos que los pacientes consecutivos EPOC del biobanco tributarios de cirugía iban a ser fundamentalmente oncológicos, por lo que no podíamos descartar sesgos de expresión génica diferencial por la neoplasia de base, pese a que se analizaba tejido pulmonar de la zona sobrante no afectada por la neoplasia.

A su vez, creíamos que representarían un abanico de pacientes con obstrucción más ligera y menos graves que los habituales de nuestra consulta neumológica especializada hospitalaria, al ser tributarios de operabilidad quirúrgica por criterios funcionales pulmonares preservados, comorbilidad estable no grave, y de riesgo/beneficio quirúrgico posterior; y que sus neoplasias de base estarían localizadas, dado el cumplimiento de criterios de reseabilidad quirúrgica también.

No nos esperábamos que fuera a haber diferencias significativas a priori en la distribución por edades y sexo entre los grupos EPOC y control no EPOC, ni que pudieran tener transcendencia sobre la expresión génica diferencial en el tejido pulmonar.

En los resultados de expresión génica diferencial nos esperábamos encontrar expresión diferencial con asociación débil de algunos genes que podrían agruparse en determinadas vías moleculares preponderantes, que podrían ser comunes y, en algunos casos, representar posibles dianas terapéuticas o puntos de partida ("screening") para estudios futuros sobre la patogenia de la EPOC.

Nos esperábamos tener problemas en el estudio fenotípico que predeciblemente se podrían en un futuro subsanar teniendo en cuenta los posibles sesgos, con un fenotipado escrupuloso dirigido con posibles marcadores y nuevas herramientas tecnológicas, y con la formación de redes de biobancos de tejido pulmonar para aumentar el tamaño muestral.

Dado el tamaño muestral reducido, esperábamos tener dificultades para demostrar poder de significancia estadística en asociaciones diferenciales de subgrupos fenotípicos. Además, ante la ausencia de consenso sobre los fenotipos pulmonares y sistémicos de la EPOC, y la falta entonces en 2005 de marcadores o pruebas estándares objetivas consensuadas universales para su definición, se preveía que excepto en los fenotipos espirométricos y de historia tabáquica, sería difícil

definirlos a partir de unos datos y pruebas preoperatorios rutinarios, no dirigidos específicamente a un descarte exhaustivo de los mismos.

Así mismo sesgos como la neoplasia de base y/o tratamientos concomitantes previos con quimio o radioterapia en algunos casos podrían interferir haciendo poco valorables algunos fenotipos sistémicos como la caquexia, y dificultando la interpretación de posible expresión génica diferencial sobre angiogénesis y neovascularización.

Las **hipótesis nulas** (H0) que pretendimos refutar en el estudio piloto con muestras de tejido pulmonar de los pacientes del Biobanco de Tejido Pulmonar del Hospital de Son Dureta, fueron las siguientes:

1. Los pacientes **EPOC** de las muestras consecutivas del Biobanco de Tejido Pulmonar del Hospital de Son Dureta analizadas para valorar su expresión génica diferencial no presentan **diferencias** significativas **epidemiológicas**, ni **clínico-radiológicas** en comparación con: a) el grupo de comparación de control **no EPOC** de muestras analizadas para expresión génica diferencial, o b) un grupo de 21 pacientes consecutivos **EPOC de la consulta neumológica** habitual de un hospital comarcal como el Hospital de Manacor.
2. Las muestras consecutivas de tejido pulmonar de los pacientes **EPOC** analizadas del Biobanco de Tejido Pulmonar del Hospital de Manacor no presentan **expresión génica diferencial** significativa, ni por “**grupos de genes**” clasificados en vías moleculares, ni por comparaciones “**gen a gen**”, con respecto a las consecutivas de los pacientes **no EPOC** analizadas del mismo.
3. Las muestras consecutivas de tejido pulmonar de los pacientes con fenotipo **enfisema pulmonar** diagnosticado por **TAC** del Biobanco de Tejido Pulmonar del Hospital de Son Dureta no muestran **expresión génica diferencial** significativa, ni en las comparaciones por “**grupos de genes**” según vías moleculares, ni en las comparaciones “**gen a gen**”, respecto a los pacientes **sin enfisema**.
4. Las muestras de tejido pulmonar del Biobanco de Tejido Pulmonar del Hospital de Son Dureta **de fenotipos combinados según espirometría e historia tabáquica (EPOC fumador activo, EPOC exfumador, no EPOC fumador activo, no EPOC exfumador y no EPOC nunca fumador)** no presentan **expresión génica diferencial** entre sí.

Probablemente la expresión génica diferencial de otros fenotipos pulmonares o sistémicos de la EPOC no podrá ser valorada adecuadamente de forma fiable, lo que urgirá plantear para estudios

futuros la necesidad de abordar específicamente cuestionarios específicos para documentar prospectivamente criterios diagnósticos consensuados en la entrevista y valoración preoperatoria de los pacientes de biobancos, y pruebas tecnológicas o marcadores objetivos unívocos estandarizados para un estudio universal de los mismos.

OBJETIVOS

OBJETIVOS DEL ESTUDIO y del TRABAJO DOCTORAL:

1. Creación y puesta en marcha del **Biobanco de Tejido Pulmonar del Hospital de Son Dureta de Palma de Mallorca**, con adaptación de protocolos y bases de datos, recogida y almacenamiento de muestras (años 2005 y 2006).
2. Conformación y puesta en marcha de las **páginas web y bases de funcionamiento de la futura Red Nacional de Biobancos de Tejido Pulmonar de la Red Respira** con la empresa bioinformática Noray Bio (año 2006).
3. **Estudio epidemiológico, clínico y funcional sobre las características de los pacientes con EPOC de las muestras obtenidas del Biobanco de Tejido Pulmonar Hospital de Son Dureta** en 2005 y 2006 para su estudio piloto de su expresión diferencial génica y de vías moleculares, así como valoración del espectro de los pacientes EPOC del Biobanco en comparación con los EPOC habituales de Consultas Externas de Neumología que valoramos habitualmente en un Hospital Comarcal como el Hospital de Manacor.
4. **Estudio piloto de la expresión diferencial génica y de vías moleculares de las muestras de los pacientes EPOC** obtenidas del Biobanco de Tejido Pulmonar del Hospital de Son Dureta en 2005 y 2006.
5. **Estudio piloto de la expresión diferencial génica y de vías moleculares de las muestras de pacientes con distintos fenotipos de EPOC** (enfisema, bronquitis crónica, EPOC asmático, EPOC fumadores activos, EPOC exfumadores, no EPOC fumadores activos, no EPOC exfumadores y no EPOC nunca fumadores, y de EPOC con fenotipos de afectación sistémica cardiovascular, autoinmune, con inmunosupresión, anemia o poliglobulia) y valoración de sesgos y dificultades para el estudio de los fenotipos a partir de las muestras de tejido pulmonar del biobanco en aras a correcciones futuras para la red de biobancos de tejido pulmonar.

MATERIALES y MÉTODOS

1. Diseño del estudio:

1.1. Tipo de diseño:

1.1. Subestudio clínico-epidemiológico-radio-anatomopatológico de representatividad de los pacientes EPOC del Biobanco de Tejido Pulmonar del Hospital de Son Dureta con muestras evaluadas para expresión génica diferencial:

Se ha llevado a cabo un estudio **observacional transversal**, para determinar las características epidemiológicas, clínicas, de historia tabáquica, radiológicas, anatomopatológicas, de función pulmonar y de riesgos sistémicos de afectación cardiovascular, metabólica, de autoinmunidad e inmunosupresión de la población estudiada, los **pacientes consecutivos** que aportaban muestras de tejido pulmonar al **Biobanco de Tejido Pulmonar del Hospital de Son Dureta** entre **2005 y 2006**. Se han comparado transversalmente en la susodicha población dichas características entre los pacientes con **EPOC** y los pacientes **sin EPOC**, definido éste por exposición previa acumulada tabáquica (dosis acumulada total (DAT)) de al menos 30 paquetes-año y espirométricamente por cociente postbroncodilatador FEV1/FVC < 0.7, según las guías GOLD, y sin afectación preponderante pulmonar por otras enfermedades concomitantes, a excepción de neoplasias pulmonares localizadas, motivo en muchos casos de la intervención quirúrgica.

Y también, de la misma manera, entre distintos **fenotipos** objetivados por TAC torácico, función pulmonar e historia tabáquica: **enfisema** y **no enfisema**, **nunca fumador** (never smoker: NS), **exfumador no EPOC** (non COPD –“healthy?” exsmoker: HX ó HES), **fumador activo no EPOC** (non COPD –“healthy?” active smoker: HS), **EPOC exfumador** (COPD exsmoker: cX ó CES), y **EPOC fumador activo** (COPD smoker: cS ó CS).

Además, se han comparado estas características de dichos pacientes EPOC que aportaron entre 2005 y 2006 muestras de tejido pulmonar al Biobanco del Hospital de Son Dureta de Palma de Mallorca, a su vez enviadas para estudio de expresión génica diferencial en 2008, con las de **21 pacientes EPOC consecutivos** que acudieron a **Consultas Externas de Neumología** del Hospital de Manacor en 2013.

Se evaluaron, así mismo, nuestras bases de datos exhaustivas del biobanco a partir de la información preoperatoria de los pacientes disponible, para valorar si eran adecuadas para el estudio de los fenotipos de la EPOC, o si se precisaría de cuestionarios y/o pruebas específicas extraordinarias añadidas a los protocolos preoperatorios habituales para su filiación correcta, en aras a tener en cuenta su abordaje específico en una futura red de biobancos.

Del mismo modo, se analizaron posibles sesgos epidemio-radio-clínico-funcional-oncológicos en los pacientes consecutivos de los grupos EPOC y no EPOC con muestras enviadas del biobanco, especialmente en cuanto edad, sexo y diagnósticos oncológicos de base; y del grupo de pacientes consecutivos EPOC del biobanco con ADN enviado para análisis de su expresión génica diferencial en comparación con el susodicho grupo de pacientes EPOC consecutivos de Consultas Externas de Neumología del Hospital de Manacor.

1.2. Subestudio de expresión génica diferencial, “gen a gen” y por “grupos de genes” de vías moleculares, de las muestras de tejido pulmonar de los pacientes EPOC y de sus fenotipos incluidas en el Biobanco de Tejido Pulmonar del Hospital de Son Dureta entre 2005 y 2006:

Se ha realizado un **estudio de asociación amplia de genoma (genome-wide association study:GWAS)** tras la extracción del ADN de las muestras de tejido pulmonar consecutivas de 2005 y 2006 del Biobanco de Tejido Pulmonar del Hospital de Son Dureta y su hibridación en sondas marcadas con fluoresceína sobre chips de **microarrays de ADN complementario del Genoma Humano Completo**, comparando la **expresión génica diferencial “gen a gen” y por “grupos de genes”** constitutivos de vías moleculares entre las muestras de los pacientes **EPOC y no EPOC**, y de los **fenotipos** anteriormente expuestos: **enfisema y no enfisema, nunca fumador** (never smoker: NS), **exfumador no EPOC** (non COPD –“healthy?” exsmoker: HX), **fumador activo no EPOC** (non COPD –“healthy?” active smoker: HS), **EPOC exfumador** (COPD exsmoker: cX), y **EPOC fumador activo** (COPD smoker: cS).

Se valoraron, así mismo, interacciones de los posibles sesgos previamente analizados (edad, sexo, diagnósticos oncológicos) en la expresión génica diferencial del tejido pulmonar.

2. Lugares de ejecución:

- Hospital Universitario Son Dureta:
 - Servicio de Cirugía Torácica (habitaciones de Planta y quirófano).
 - Servicio de Neumología (Gabinete de Neumología).
 - Servicio de Archivos Clínicos.
 - Servicio de Mantenimiento.
 - Servicio de Radiología.
 - Servicio de Microbiología.
 - Servicio de Anatomía Patológica.
- Hospital Son Llàtzer:
 - Servicio de Neumología (historia clínica computerizada, imágenes digitalizadas y pruebas de función respiratoria del Gabinete de Neumología).
- Hospital de Manacor:
 - Servicio de Neumología (historia clínica computerizada, imágenes digitalizadas, pruebas de función respiratoria del Gabinete de Neumología).
 - Servicio de Anatomía Patológica (tinciones de hematoxilina-eosina).
- Institut Universitari d'Investigació en Ciències de la Salut (IUNICS). Illes Balears.
- Unidad de Desarrollo y Regeneración. Fundación Caubet-CIMERA. Complejo Hospitalario del Hospital de Joan March (Bunyola). Illes Balears.
- Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC) del Instituto de Salud Carlos III de Madrid.
- Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO) del Instituto de Salud Carlos III de Madrid.
- Plataforma de Ensayos Clínicos y Apoyo Metodológico. Instituto de Investigación Sanitaria de Palma (IdISPa). Fundació d'Investigació Sanitària de les Illes Balears (FISIB).
- Animalario de la Universitat de les Illes Balears.

La recogida consecutiva de los datos clínico-epidemiológico-radio-anatomopatológicos y funcionales respiratorios de los pacientes consecutivos se intentó hacer de forma prospectiva, a partir de los datos de la Historia Clínica y entrevista personal, en las habitaciones de ingreso de los pacientes de

Cirugía Torácica del Hospital de Son Dureta de Palma de Mallorca, como la única unidad de Cirugía Torácica en el ámbito de la Salud Pública de las Islas Baleares y por tanto Unidad de Referencia de las Islas. Se realizó entrevista personal a los pacientes y firma del consentimiento informado el día previo a su intervención.

Se repasaron así mismo, a posteriori, una a una, las historias clínicas completas de archivo y radiografías de los pacientes, solicitadas al **Servicio de Archivos Clínicos del Hospital de Son Dureta de Palma de Mallorca**, sito en el sótano del **edificio Materno-Infantil**, dado que las historias clínicas no estaban computerizadas en el hospital.

Se solicitaron a posteriori al **Servicio de Radiología del Hospital de Son Dureta**, sito en la Planta 0 del edificio principal, todas las imágenes radiológicas y de TACs, y sus respectivos informes, de los pacientes, tanto en formato digital como en placa. Se realizó así mismo la revisión de todas ellas de nuevo por 2 radiólogos especializados en tórax.

Se solicitaron a posteriori todas las pruebas de función respiratoria, tras acudir a los **Gabinetes de Neumología** y extraer todos los datos guardados en los espirómetros de los **hospitales de Son Dureta, de Son Llàtzer y del Hospital de Manacor**.

Se consultaron las bases de datos de todas las muestras microbiológicas de los pacientes en el **Servicio de Microbiología del Hospital de Son Dureta**, sito en el Edificio de Consultas Externas del hospital.

Se consultaron a posteriori en todos los pacientes los informes definitivos del **Servicio de Anatomía Patológica del Hospital de Son Dureta**, sito también en el Edificio de Consultas Externas del hospital.

Además se consultaron y corroboraron a posteriori los **datos computerizados de las historias clínicas**, con sus imágenes radiológicas y TACs torácicos digitalizados en los otros 2 hospitales de la isla de Mallorca (**Hospital de Son Llàtzer y de Manacor**) que disponían de programas computerizados de Gestión Unificada de la Información de la Historia Clínica (por ejemplo: Gesdohc en el Hospital de Manacor).

El nitrógeno líquido fue aportado por el **Servicio de Mantenimiento** a partir de los depósitos situados junto al parking del Edificio Materno-infantil del Hospital de Son Dureta y el hielo fresco obtenido en el Edificio de la IUNICs (Institut Universitari de Investigació en Ciències de la Salut) del hospital.

La recogida de las muestras pulmonares la realizaba in situ en los **quirófanos** donde tenían lugar las intervenciones de Cirugía Torácica, en la 3ª Planta Ala E del Hospital de Son Dureta de Palma de Mallorca, aportados en mano por los cirujanos torácicos.

Procesaba inmediatamente las muestras en el **Edificio de la IUNICs (Institut Universitari de Investigació en Ciències de la Salut) del Hospital de Son Dureta**, donde también se almacenaban los tejidos en los congeladores a -80°C que habilitamos específicamente para las muestras del Biobanco de Tejido Pulmonar.

La homogeneización del tejido con polytron y las extracciones del ADN, su congelación y los análisis de cantidad y calidad del ADN los realizaba, igualmente en el **Edificio de la IUNICs (Institut Universitari de Investigació en Ciències de la Salut) del Hospital de Son Dureta**.

Preparaba igualmente parte del tejido embebido en OCT (optimal cutting temperature) para su congelación y estudio histopatológico posterior también en el **Edificio de la IUNICs (Institut Universitari de Investigació en Ciències de la Salut) del Hospital de Son Dureta**.

Los cortes histológicos extendidos en fresco sobre porta para tinciones de hematoxilina-eosina los realizaba con el microtomo sito inicialmente en el **Edificio de la IUNICs (Institut Universitari de Investigació en Ciències de la Salut) del Hospital de Son Dureta** y posteriormente en el laboratorio de la **Unidad de Desarrollo y Regeneración Celular de la 2ª Planta del Edificio de la Fundación Caubet-CIMERA del Complejo Hospitalario de Joan March de Bunyola**.

Las tinciones de **hematoxilina-eosina** se realizaron en el **Servicio de Anatomía Patológica del Hospital de Manacor**.

La preparación previa de los protocolos del Biobanco de Tejido Pulmonar del Hospital de Son Dureta la realizamos del mismo modo en el **Edificio de la IUNICs (Institut Universitari de Investigació en Ciències de la Salut) del Hospital de Son Dureta** a partir de tejido pulmonar de los ratones transgénicos que manteníamos en el **Animalario** de que disponía el Dr. Daniel Bachiller en el edificio adscrito de la **Universitat de les Illes Balears (UIB)**.

La hibridación del ADN extraído con sondas marcadas con fluoresceína sobre chips de microarrays del Genoma Humano Completo usando técnicas de scaneado de Agilent Affimetrix se realizó en el Centro Nacional de Investigaciones

2. Recursos Humanos

- Cirujanos y Personal de Enfermería de **Cirugía Torácica** del Hospital Universitario Son Dureta de Palma de Mallorca: nos proporcionaban las muestras de tejido pulmonar en quirófano (en especial los Dres. Ángel Carvajal y Juan Antonio Torrecilla).
- Personal del Servicio de **Mantenimiento** del Hospital Universitario de Son Dureta de Palma de Mallorca: nos proporcionaban el nitrógeno líquido (en especial Biel Oliver).
- Equipo de la Unidad de **Desarrollo y Regeneración Celular** de la **Fundación Caubet-CIMERA**, sita al Complejo Hospitalario de Joan March (Bunyola) a cargo del Dr. Daniel Bachiller: confección de los protocolos de laboratorio del biobanco, apoyo y asesoramiento en su puesta en práctica, y mantenimiento del animalario (en especial Meritxel Arqué y Noemi Garcies Artigues; y también Víctor Asensio y María Torrojo).
- Personal del **Servicio de Anatomía Patológica del Hospital de Manacor** (tinciones de hematoxilina-eosina).
- Equipo y personal del grupo de investigación del Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (**CNIC**) del Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) de Madrid, a cargo de la Dra. Ana Dopazo González: realización de la hibridación de nuestras muestras de ADN con sondas marcadas sobre chips de microarrays del genoma humano con scan Agilent Affimetrix.
- Equipo y personal del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (**CNIO**) del Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) de Madrid, a cargo del Dr. Ramón Díaz-Uriarte: bioestadística informática para valorar resultados de expresión génica diferencial de los microarrays.
- PhD. Aina María Yáñez. Plataforma de Ensayos Clínicos y Apoyo Metodológico. Instituto de Investigación Sanitaria de Palma (IdISPa). Fundació d'Investigació Sanitària de les Illes Balears (FISIB).
- Personal del **Animalario** de la Universitat de les Illes Balears (UIB).

1.4. Financiación:

Este estudio ha sido financiado con:

- Beca del Hospital Universitario de Son Dureta (2005).
- Beca de la Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica (SEPAR) (2006).

El Hospital Universitario de Son Dureta autorizó nuestro uso de nitrógeno líquido para fines de investigación y nos proporcionó congeladores para su utilización en el almacenamiento de las muestras de tejido pulmonar del Biobanco de Tejido Pulmonar de Son Dureta; así mismo, se nos dispensó inicialmente material fungible y un espacio en los laboratorios del Institut Universitari d'Investigacions en Ciències de la Salut (IUNICS) para poder hacer la homogeneización del tejido y extracción y cuantificación del ADN extraído.

La Unidad de Desarrollo y Regeneración Celular de la Fundación Caubet-CIMERA aportaba el criotomo donde realizamos la congelación de muestras en OCT y los cortes a posteriori para extensión en fresco sobre porta para tinciones de hematoxilina-eosina; y a su vez, los congeladores y material fungible para su almacenamiento.

Con fondos adscritos al Servicio de Neumología se contrató a la empresa bioinformática Noray-Bio para que trabajara con nosotros, plasmando informáticamente nuestra conformación de las páginas web y las bases de funcionamiento de una futura Plataforma de Red Nacional de Biobancos de Tejido Pulmonar .

La Universitat de les Illes Balears (UIB) dotó espacio en su Animalario para que pudiéramos allí disponer de los ratones transgénicos del Dr. Daniel Bachiller.

El laboratorio del grupo de investigación de la Dra. Ana Dopazo González del Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC) realizó las hibridaciones genómicas sobre microarrays de genoma en Agilent ® con la financiación de la beca SEPAR.

El equipo del Dr. Ramón Díaz-Uriarte utilizando las herramientas y los equipos bioinformáticos del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO) realizó el análisis bioestadístico de los resultados de expresión diferencial genómica.

2. Metodología

2.1. Materiales y documentación previa.

2.1.1. Inicio del Biobanco de Tejido Pulmonar del Hospital Son Dureta y bases de una futura Red Nacional de Biobancos de Tejido Pulmonar.

En 2005, empezamos el Biobanco de Tejido Pulmonar del Hospital de Son Dureta en Palma de Mallorca (España), y las páginas web, bases de datos, estructura y las bases para la organización y funcionamiento de la entonces futura Red Nacional Española de Biobancos de Tejido Pulmonar, actualmente llamada Plataforma Red de Biobancos de Tejido Pulmonar Ciberes-Respira. Pusimos en marcha sus módulos y protocolos para: la toma y conservación de las muestras, su codificación, identificación y localización, la gestión y mantenimiento de las alícuotas, los protocolos de trabajo, la información y accesos abiertos jerarquizados para usuarios y trabajadores de los diferentes nodos, de comunicación inter e intranodal, con los usuarios y los investigadores, de localización y envío de muestras de tejido específicas de los diferentes nodos de la red de biobancos que fueran solicitadas por investigadores con necesidades de investigación específicas, y de los informes.

2.1.2. Sujetos del estudio. Criterios de inclusión y exclusión.

2.1.2.1 Criterios de inclusión en quirófano para la toma de muestras para el almacenamiento en el biobanco y posterior estudio.

Los **criterios de inclusión** fueron: aquellos pacientes consecutivos intervenidos por Cirugía Torácica con resección pulmonar que accedieron tras su firma del consentimiento informado a su inclusión en el Biobanco de Tejido Pulmonar y en el estudio.

Los pacientes con neoplasias pulmonares para poder ser intervenidos por Cirugía Torácica debían de pasar previamente los filtrados de resecabilidad y de operabilidad, y el visto bueno de la valoración preanestésica.

La **resecabilidad** se valoraba previamente a la intervención según estadiaje protocolizado de extensión de la afectación neoplásica pulmonar con Tomografía Axial Computerizada (TAC) toracoabdominal alta, Tomografía de Emisión de Protones (PET) de cuerpo entero, fibrobroncoscopia, punción de adenopatías por ecobroncoscopia (EBUS=endobronchial ultrasound bronchoscopy) o mediastinoscopia. Los criterios de resecabilidad se restringían a aquellos casos de neoplasias pulmonares localizadas (estadios I y II) con intención quirúrgica supuestamente curativa, y casos localmente avanzados o con afectación ganglionar con respuesta reductora tras quimio o radioterapia preadjuvante a la cirugía (estadios IIA y IIIB). Así mismo, se indicaba también la intervención en caso de metástasis únicas pulmonares de cáncer de colon.

La **operabilidad** (riesgo/beneficio) se evaluaba previamente a la intervención mediante la valoración del estado general, el grado de estabilidad y control de comorbilidades, y las pruebas de función respiratoria (PFR) completas preoperatorias en reposo. Generalmente si el volumen forzado en el primer segundo (FEV1) ó la difusión de monóxido de carbono (DLCO) era menor del 60% del valor teórico de referencia, entonces se realizaba, respectivamente, bien el cálculo del FEV1 postoperatorio estimado tras lobectomía (resección de un lóbulo) o neumonectomía (resección del pulmón entero), según la intervención que se esperara realizar, o bien cálculos del consumo de oxígeno (VO₂) tras prueba de esfuerzo con cicloergometría, tras optimización del tratamiento broncodilatador de base y rehabilitación respiratoria si precisara. Ello filtraba a los pacientes EPOC incluidos, siendo de grado más ligero moderado, y a los enfisemas, teniendo mayor capacidad de difusión de monóxido de carbono (DLCO).

2.1.2.2. Criterios de exclusión.

No se obtuvo tejido de intervenciones de Cirugía Torácica por otros motivos, como simpatectomía, inserción de tubo de drenaje pleural, decorticación o pleurodesis, sin necesidad añadida de exéresis de tejido pulmonar.

Otros criterios de exclusión para el estudio, que no para el almacenamiento de muestras en el biobanco, incluían también a aquellos pacientes con otras patologías respiratorias preponderantes: neumopatías intersticiales, lesiones posttuberculosas o bronquiectasias extensas. Y, a su vez se excluyeron a los pacientes con infección activa.

2.1.3. Protocolos de procesado de muestras de Cirugía Torácica para almacenamiento en el Biobanco de Tejido Pulmonar y posteriores estudios genéticos y anatomopatológicos.

Desarrollamos los protocolos de recogida de muestras del tejido sobrante no neoplásico de los pacientes intervenidos mediante lobectomía, neumonectomía, resección pulmonar segmentaria o biopsias pulmonares por Cirugía Torácica, de su almacenamiento en el biobanco de tejido

pulmonar para posteriores estudios genéticos y anatomopatológicos, y las bases de datos y páginas web para la recogida de datos clínicos, de función pulmonar, de imagen del TAC torácico y las características anatomopatológicas significativas, así como de la localización de las muestras del biobanco. Ved capítulo correspondiente de protocolos.

Brevemente: las muestras de tejido pulmonar escindidas por cirugía fueron inmediatamente cortadas en 2 partes. 1 pieza fue depositada inmediatamente en una caja con nitrógeno líquido a -80°C para posteriores estudios genéticos. La segunda pieza se transportó en fresco con hielo, embebiéndola en OCT (optimal cutting temperature) y almacenándola congelada en OCT para posteriores estudios anatomopatológicos. Para ello, el tejido congelado se cortaba en criotomo y extendía sobre porta-objetos, que posteriormente se congelaban de nuevo para su procesado a posteriori para tinciones con hematoxilina-eosina.

2.1.4. Extracción del ADN e hibridación con chips de ADN complementario del genoma humano con sondas marcadas con fluorescencia (microarrays Agilent ®).

Las muestras de tejido pulmonar de los 100 primeros pacientes consecutivos del biobanco se licuaron triturándolas con polytron y se procesaron para la extracción del ADN siguiendo los protocolos de disrupción y homogenización de tejido pulmonar congelado con polytron con QIAGEN RNEASY TM y de precipitación en isopropanol para el aislamiento de ADN a partir de colas de ratón. La calidad y cantidad del ADN extraído fue valorada por espectrofotometría. Ved los protocolos en el capítulo de anexos correspondiente. Dichos protocolos requirieron cuatro meses de adaptación, desarrollo, entrenamiento y sistematización previos de las técnicas, y validación utilizando previamente pulmones de ratón.

67 de las 100 primeras muestras de tejido pulmonar humano que presentaron ADN preservado de calidad, se volvieron a almacenar a -80°C , y se enviaron por courier congeladas a Madrid, al Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO) del Instituto de Investigaciones Científicas Carlos III (ISCCIII), donde se realizó un nuevo control de calidad del ADN recibido y se realizó la hibridación con sondas de ADN complementario marcadas con fluorescencia en microchips del genoma humano completo para la valoración de la expresión génica diferencial en 65 muestras de pacientes con EPOC (25) respecto a las de los controles no EPOC (40), usando microarrays de Agilent ®.

2.1.5. Análisis bioestadístico informatizado de los resultados.

El análisis bioestadístico informático “gen a gen” y de “grupos de genes” de vías moleculares expresadas diferencialmente se realizó en el Centro Nacional de Investigaciones Cardiológicas (CNIC) del Instituto de Investigaciones Científicas Carlos III (ISCCIII) en Madrid (Dr. Ramón Díaz Uriarte). Más abajo, en el apartado 2.2 también de materiales y métodos, se explica el

método de rotación de genes (ROAST) utilizado (485) , y las clasificaciones de grupos de genes según vías moleculares.

Nuestro principal objetivo fue detectar las vías moleculares expresadas diferencialmente en los pacientes con EPOC del biobanco y agruparlas de acuerdo con mecanismos fisiopatológicos con importancia contrastada. Se intentó valorar también expresión diferencial de los fenotipos EPOC anteriormente descritos (enfisema-no enfisema; nunca fumadores (HNS=healthy never smokers); no EPOC exfumadores (HX ó HES="healthy" exsmokers); fumadores activos no EPOC (HS); EPOC exfumadores (cX ó CES=COPD exsmokers); EPOC fumadores activos (CS=COPD current smokers).

Se evaluaron posibles interacciones de sesgos de edad y sexo en la expresión génica diferencial del tejido pulmonar.

Se realizó, así mismo, estadística básica sobre las variables de las bases de datos del biobanco de los 65 pacientes con muestras analizadas para expresión génica diferencial de cada uno de los grupos de interés: EPOC, no EPOC, enfisema, nunca fumadores no EPOC, exfumadores no EPOC, fumadores activos no EPOC, EPOC exfumadores y EPOC fumadores activos; y de los 21 pacientes EPOC consecutivos de Consultas Externas del Hospital de Manacor.

2.1.6. Interpretación de la plausibilidad biológica de los resultados, clasificación etiopatogénica de las vías sobreexpresadas y correlación fenotípica.

Se revisó la bibliografía en Pub-Med y Medline relacionada con estudios de asociación de genoma (linkage y genome-wide association studies: GWAS), de secuenciación génica y de vías moleculares etiopatogénicas en EPOC, y estudios de replicación y estructurales celulares e histológicos de expresión génica diferencial marcada con inmunofluorescencia.

Los genes expresados diferencialmente fueron clasificados en vías moleculares, y las vías moleculares expresadas diferencialmente se agruparon de acuerdo con sus mecanismos funcionales fisiopatogénicos.

Como objetivo secundario correlacionamos los resultados de expresión génica diferencial y de vías moleculares con los datos anatomopatológicos, clínicos, radiológicos de la Tomografía Computerizada (TC) y de las pruebas de función pulmonar en reposo.

2.1.7. Procesado de muestras para su estudio estructural histológico.

Mientras tanto, las otras partes de las muestras de tejido pulmonar escindido y congelado tras su imbibición en OCT fueron cortadas usando el microtomo, y o bien extendidas en fresco sobre portaobjetos de cristal para tinción con hematoxilina-eosina. Se buscaron específicamente

características histológicas fenotípicas concretas como enfisema y bronquiectasias, tras su análisis en microscopía óptica confocal.

2.1.8. Bases de datos clínico-radiológico-funcionales.

2.1.8.1. Obtención prospectiva de las variables de las bases de datos clínico-radiológico- funcionales para la caracterización fenotípica de los grupos.

Los datos clínicos, radiológicos de las imágenes de Tomografía Axial Computerizada (TAC) torácica y funcionales respiratorios de las pruebas de función respiratoria (PFR) en reposo, fueron obtenidos de forma prospectiva de las historias clínicas de los pacientes y de entrevista clínica directa dirigida.

Los TACs torácicos fueron revisados por 2 radiólogos independientes especializados en tórax, buscando patrones específicos de fenotipos pulmonares: enfisema (y su tipo), bronquiectasias, engrosamiento bronquial, afectación intersticial y otras características radiológicas asociadas.

Las bases de datos clínicas que creamos incluían un abanico exhaustivo de datos recopilados: epidemiológicos (edad, sexo, raza, trabajo, historia familiar); antropomórficos (altura, peso, índice de masa corporal (IMC); la localización anatómica de la muestra de tejido pulmonar obtenida; el número de identificación y de localización de almacenamiento en el biobanco; el diagnóstico anatomopatológico y extensión del cáncer o de la principal enfermedad no neoplásica que había indicado la intervención (cáncer de pulmón o colon con metástasis pulmonar única); historia de consumo tabáquico (fumador activo, exfumador, años exfumador, nunca fumador, dosis fumada en paquetes-año); fenotipos pulmonares de EPOC (enfisema -centrilobular, panlobar o paraseptal; ocasionalmente deficiencia de alfa-1 antitripsina; bronquitis crónica; bronquiectasias; fenotipo mixto asma-EPOC (ACOS: astma-COPD overlap syndrome)); “fenotipo exacerbador” - número de exacerbaciones en el último año; bronquiolitis; atrapamiento aéreo-hiperinsuflación); microbiológicos (colonización bronquial y últimos cultivos de esputo); otras comorbilidades respiratorias (lesiones posttuberculosas, neumonía, asma, neumopatía intersticial, obesidad-hipoventilación, síndrome de las apneas-hipopneas del sueño, neuromusculares y enfermedades extrapulmonares restrictivas, embolia pulmonar, hipertensión pulmonar, y otras); otras comorbilidades (rinosinusitis, reflujo gastroesofágico, cardiovasculares - hipertensión arterial, diabetes mellitus, hipercolesterolemia, eventos embólicos (infarto agudo de miocardio, angina de pecho, ictus, isquemia periférica, enfermedad tromboembólica venosa), arritmias, insuficiencia cardíaca - fracción de eyección, y comorbilidad autoinmune; e índices (riesgo cardiovascular y Framingham, autoinmunidad, inmunodeficiencia, y comorbilidad y dependencia (Charlson y Barthel)).

Se documentaron los tratamientos activos de los pacientes por grupos de medicamentos.

Se transcribieron los datos de las pruebas de función respiratoria en reposo preoperatorios, mayoritariamente con pletismografía y ocasionalmente con helio: cociente postbroncodilatador entre el volumen espiratorio forzada en el primer segundo y la capacidad vital forzada (FEV1/FVC); el volumen espiratorio forzado en el primer segundo (FEV1); la capacidad vital forzada (CVF); la prueba broncodilatadora; la capacidad pulmonar total (CPT); volumen residual (VR); el cociente entre el volumen residual y la capacidad pulmonar total (VR/CPT); difusión del dióxido de carbono ajustado por la hemoglobina (DLCOsb); y el cociente entre la DLCO y el volumen alveolar (KCO). Las ecuaciones y fórmulas para calcular el porcentaje de los valores de referencia de Roca (Barcelona) para la población española fueron usadas en la mayoría de los casos.

Los datos de laboratorio recogidos fueron: gasometría arterial aire ambiente en reposo (pH, presión arterial parcial de oxígeno (PaO₂), presión arterial parcial de dióxido de carbono (PaCO₂), bicarbonato (HCO₃), acidosis, hipercapnia, poliglobulia ya anemia.

2.1.8.2. Definiciones de grupos y caracterización de fenotipos pulmonares y sistémicos.

EPOC se definió de acuerdo con los siguientes criterios GOLD como obstrucción crónica y poco reversible al flujo aéreo definida por un cociente postbroncodilatador FEV1/FVC > 70% en una paciente previamente expuesto al humo de tabaco (> 20 paquetes-año), habiendo excluido otras enfermedades pulmonares predominantes (asma, lesiones posttuberculosas, neuropatías intersticiales, bronquiectasias difusas o fibrosis quística).

Los **fenotipos pulmonares de la EPOC** se definieron de la manera siguiente:

- Enfisema pulmonar:

Se define clásicamente en términos anatomopatológicos como la dilatación anormal y permanente de los espacios aéreos distales a los bronquios terminales, asociada a destrucción de la pared alveolar, con o sin fibrosis manifiesta (482).

El enfisema se puede diagnosticar por TAC torácico (preferiblemente de alta definición), al observarse áreas de parénquima pulmonar de baja atenuación, por lo general sin paredes visibles.

El acino pulmonar se define anatomopatológicamente como la unidad estructural pulmonar distal a un bronquiolo terminal que funcionalmente se especializa en el intercambio gaseoso y que contiene bronquiolos respiratorios, conductos alveolares y alveolos. En el TAC no se pueden diferenciar, pero sí los lobulillos pulmonares secundarios,

como unidades radiológicas básicas, que están compuestos de entre 5 y 25 acinos, y permiten diagnosticar y clasificar el enfisema.

Atendiendo a su distribución se subagruparon los casos de enfisema en:

- según su afectación preponderante en el acino pulmonar:
 - centrolobulillar o centroacinar: afectación preponderante de la parte proximal del acino.
 - panlobulillar o panacinar: afectación de todo el acino.
 - paraseptal: afectación de la parte distal del acino, en ocasiones subpleural.

- según su distribución en el pulmón:
 - difuso
 - localizado

Se diagnosticó enfisema pulmonar tanto radiológicamente por TAC torácico como anatomopatológicamente por visión al microscopio confocal de la histología de las biopsias de las muestras de tejido pulmonar.

Se correlacionaron los datos con los resultados de las pruebas funcionales respiratorias en reposo.

- **Bronquitis crónica:**

Se definió clínicamente como la persistencia de expectoración crónica durante al menos 3 meses al año durante 2 años consecutivos.

Se sospechó radiológicamente también por engrosamiento de la pared bronquial en el TAC torácico.

- **Bronquiectasias:**

Se definen anatomopatológicamente como la dilatación crónica y no reversible bronquial, generalmente por causas postinfecciosas, obstructivas, inflamatorias o congénitas.

Se definieron por TAC torácico (483), al observarse:

- engrosamiento de la pared y diámetro bronquiales, ya sea en cortes
 - longitudinales con “líneas de tranvía”: con líneas paralelas que no se estrechan.

- transversales con el “signo de la sortija”: diámetro transversal bronquial mayor que el de la arteria bronquial adyacente.
- tapones de moco.
- falta de afilamiento distal bronquial hacia la periferia: líneas bronquiales con moco en su interior en <1 mm de la pleura visceral.

Se clasificaron por TAC torácico en:

- Según su forma:
 - cilíndricas.
 - racemosas.
 - varicosas.
 - quísticas.
 -
- Según su distribución:
 - difusas.
 - localizadas
- **Asma-EPOC (asthma-COPD overlap syndrome: ACOS)**

EPOC con prueba broncodilatadora positiva e historia previa de asma, rinitis alérgica o atopia; hiperinsuflación pulmonar (atrapamiento aéreo en radiografías de tórax y pruebas de función respiratoria – aumento del volumen residual (VR), del cociente volumen residual y capacidad pulmonar total (RV/CPT) y de la capacidad pulmonar total (CPT)); colonización bronquial (3 muestras de cultivos de esputo con crecimiento de microorganismos potencialmente patógenos separados entre ellos 2 meses) (484).

Los **fenotipos sistémicos de EPOC** se definieron de acuerdo con índices y resultados de laboratorio:

- Fenotipo sistémico de **riesgo cardiovascular**.
- Fenotipo sistémico de **autoinmunidad**.
- Fenotipo sistémico de **inmunosupresión**.
- Fenotipo sistémico de **comorbilidad**: Índice de Charlson.
- Fenotipo sistémico de **dependencia**: Índice de Barthel.
- Fenotipo sistémico de **anemia**: Hemoglobina <12 g/dl
- Fenotipo sistémico de **poliglobulia**: Hemoglobina > 16 g/dl.

En nuestro caso optamos por la realización de escalas de puntuación (scores) para la valoración de **riesgo cardiovascular, metabólico, autoinmune y de inmunosupresión**, arbitrarias y no validadas:

a.- **riesgo cardiovascular**: se puntuaron con:

- 1 punto cada uno: los siguientes factores de riesgo cardiovascular: hipertensión arterial, diabetes mellitus, dislipemia, obesidad grados I y II, exfumador o taquicardia supraventricular paroxística tratada, EPOC u otras enfermedades crónicas inflamatorias, síndrome de las apneas-hipopneas del sueño (SAHS) en tratamiento con ventilación crónica con presión positiva continua en la vía aérea (cPAP) nocturna.
- 2 puntos cada uno: hipertensión arterial con falta de respuesta o mal control pese al tratamiento, signos de arteriosclerosis como calcificación del botón aórtico o de la aorta torácica o abdominal en la radiografía o TAC, o hipertensión arterial con afectación no embólica ni isquémica de órganos diana como miocardiopatía hipertensiva, retinopatía hipertensiva o nefroangioesclerosis; y del mismo modo, diabetes mellitus con mal control o afectación de órganos diana como retinopatía diabética, nefropatía diabética o vasculopatía diabética, arritmia cardioembolígena anticoagulada (flúter o fibrilación auricular), taquicardia supraventricular paroxística no tratada o valvulopatía leve o moderada (tanto insuficiencia como estenosis, mitral o aórtica), episodios de pericarditis o endocarditis, síndrome de las apneas-hipopneas del sueño (SAHS) no tratada con hipoxemia intermitente nocturna significativa, colonización bacteriana (incluyendo la colonización bronquial), enfermedades autoinmunes, obesidad de grado premórbido.
- 3 puntos cada uno: complicaciones de afectaciones de órganos diana por hipertensión arterial (nefroangioesclerosis prediálisis, edema de retina), complicaciones cardioembólicas isquémicas (angina de pecho o infarto agudo de miocardio, isquemia cerebral por enfermedad cerebrovascular o isquemia arterial periférica tratadas o revascularizadas), enfermedad tromboembólica venosa (trombosis venosa profunda en extremidades inferiores, tromboembolismo pulmonar tratadas), hemorrágica cerebral o aneurisma tratadas, o complicaciones de afectación de órganos diana por diabetes mellitus (úlceras vasculares, nefropatía diabética con síndrome nafrótico o hemorragia retiniana), bradiarritmias que precisan marcapasos con marcapasos, o taquicardias supraventriculares de reentrada tratadas con ablación o arritmias con indicación de desfibrilador autoinducible (DAI) tratadas con DAI, obesidad mórbida tratada.
- 4 puntos cada uno: complicaciones avanzadas de afectaciones de órganos diana por hipertensión o diabetes (nefroangiosclerosis o nefropatía diabética en diálisis, amputaciones), cardiopatía isquémica no revascularizada o complicada, o eventos

embolígenos no tratados de forma aguda o sin tratamiento crónico posterior, bradicardias que precisan marcapasos no tratadas con marcapasos, arritmias sin tratamiento, roturas aneurismáticas, obesidad mórbida no tratada.

b.- riesgo metabólico: se puntuaron con:

- 1 punto cada uno: diabetes mellitus, dislipemia, hiperuricemia u obesidad de grados I ó II en tratamiento con control adecuado.
- 2 puntos cada uno: diabetes mellitus, dislipemia, hiperuricemia u obesidad de grados I ó II en tratamiento con mal control.
- 3 puntos cada uno: diabetes mellitus, dislipemia, hiperuricemia u obesidad de grado III (premórbida) en tratamiento con mal control y complicaciones menores, u obesidad mórbida tratada con cirugía bariátrica de reducción gástrica.
- 4 puntos cada uno: diabetes mellitus, dislipemia, hiperuricemia u obesidad de grado IV (mórbida) en tratamiento con mal control o complicaciones mayores.

c.- riesgo de autoinmunidad: se puntuaron con:

- 1 punto para cualquier enfermedad de origen autoinmune reflejada en la historia clínica incluyendo psoriasis, artritis reumatoide, tiroiditis, o anticuerpos de autoinmunidad en analíticas de inmunología reumática.

d.- riesgo de inmunosupresión: se puntuaron con:

- 1 punto para exfumador o exenolismo.
- 2 puntos para fumador activo, hábito enólico activo o drogodependencia.
- 3 puntos para episodios infecciosos activos, colonización bronquial, o estados de inmunosupresión (tratamientos inmunosupresores o corticoideos crónicos o repetidos, antibióticos 3 ó más al año, inmuno deficiencias (VIH, déficit de producción de inmunoglobulinas o de subgrupos de Ig Gs, etc), neoplasias, tratamientos quimioterápicos o radioterápicos, factores de riesgo de broncoaspiración o afectación del aclaramiento mucociliar o fuerza de la tos, alteraciones de barreras epiteliales.

Se nos restringió el acceso a más muestras de tejido pulmonar después de los 100 primeros pacientes debido a cambio de manos en el control del biobanco de tejido pulmonar y red de biobancos que habíamos iniciado.

2.2. Análisis estadístico de los resultados.

Las comparaciones de la expresión diferencial génica y de vías moleculares se realizaron inicialmente entre el ADN de las muestras de tejido pulmonar de pacientes EPOC y pacientes no EPOC, y después también entre: hombres y mujeres; fumadores activos y exfumadores y nunca fumadores; y enfisemas y no enfisemas.

Se realizó en el Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO) del Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) de Madrid (Dr. Ramón) el **análisis estadístico bioinformático ROAST (“rotation gene set test for complex microarray experiments”)** (485) por grupos de genes (“gene sets”) clasificados en vías moleculares utilizando la colección “C2” conservadora de genes (**“curated gene sets”**) de bases de datos de vías moleculares publicadas online en la web (486), publicaciones de Pub Med y conocimientos de expertos, de la versión 5 de las bases de datos de firmas moleculares (“molecular signature database version 5: **MSigDB v05**”) de la página web de análisis de grupos de genes enriquecidos (**“Gene Sets Enrichment Analysis: GSEA”**) del **Broad Institute**. (<http://www.broadinstitute.org/gsea/msigdb/index.jsp>).

Se utilizaron como “media 50” estadística 30000 rotaciones, siguiendo las recomendaciones de la discusión de la publicación arriba mencionada, la página de ayuda de mroast y los comentarios de G. Smyth (uno de los coautores de dicha publicación). Aunque en algunas comparaciones (como la de enfisemas contra no enfisemas) se llegaron a utilizar hasta 100000 rotaciones, a pesar de que prácticamente no se observaban grandes diferencias entre realizar 10000, 20000, 30000 ó 100000 rotaciones.

2.3. Análisis de la plausibilidad biológica de los resultados.

Se compararon los resultados con los de otros estudios GWAS y de asociación (linkage) realizados en EPOC, con las publicaciones en Pub Med sobre las vías moleculares expresadas diferencialmente en los pacientes EPOC intentando darles explicación fisiopatogénica de acuerdo con los conocimientos adquiridos sobre las mismas en EPOC.

RESULTADOS

1. Almacenamiento de tejido pulmonar e inclusión de pacientes en el estudio.

Inicialmente almacenamos prospectivamente muestras de tejido pulmonar del Banco de Tejido Pulmonar de los 100 primeros pacientes consecutivos, las cuales se obtuvieron de quirófano de pacientes referidos para lobectomía, neumonectomía, resección parcial pulmonar o biopsias pulmonares, y se realizó el filtrado por criterios de inclusión y exclusión.

Las muestras de tejido pulmonar de aquellos pacientes con predominio de otras enfermedades pulmonares (asma, bronquiectasias difusas, neumopatías intersticiales, o lesiones posttuberculosas pulmonares difusas) fueron almacenadas en el biobanco de tejido pulmonar, pero excluidas para el subsiguiente procesamiento para nuestras investigaciones de expresión génica y de estructura histológica.

Entre los pacientes excluidos finalmente a posteriori por su diagnóstico anatomopatológico final tuvimos también: vasculitis de Wegener (1), tuberculosis (1), sarcoidosis (2), y otras neumopatías intersticiales (2).

Las muestras de 87 de los 100 primeros pacientes del biobanco se procesaron tras cumplir los criterios de inclusión clínico-radiológico-anatomopatológicos descritos y tras firmar el consentimiento informado.

2. Selección de las muestras con cantidad y calidad preservadas de ADN para la realización de las hibridaciones en Madrid.

De ellas, sólo 67 muestras de pacientes cumplieron criterios de calidad y cantidad preservada de ADN tras su extracción, y fueron enviadas finalmente a Madrid vía courier para los estudios de expresión génica. Después de un segundo control de la calidad y cantidad preservada de ADN en Madrid de las muestras recibidas previo a la realización de los microarrays de expresión génica diferencial, quedaron sólo 65 muestras tributarias de la realización de hibridación génica en los chips de microarrays de Agilent®.

3. Descripción de la población del biobanco (2) con ADN enviado de tejido pulmonar para expresión génica diferencial.

2.4. Descripción epidemiológica general.

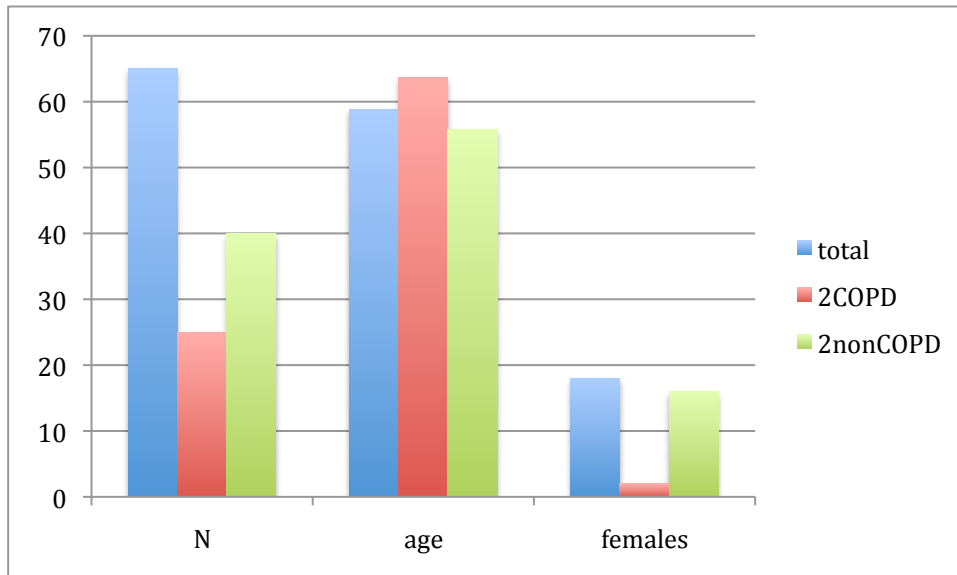
Las principales características epidemiológicas de los pacientes de dichas muestras pueden resumirse del siguiente modo: 65 pacientes totales, mayoritariamente hombres (48 (72,31%) hombres; 18 (27,69%) mujeres); mayoritariamente de edades medias avanzadas (58,82±13,14 años de edad (X±SD)); nunca fumadores (16 (24%)); exfumadores (21(32%)); fumadores activos (29 (44%)); con años exfumadores (4.88±8.82); y dosis acumulada total de tabaco (DAT) de 34.11±24.90 paquetes-año fumados. Su función pulmonar estaba afectada mayoritariamente sólo con obstrucción o trastorno de difusión del monóxido de carbono de grados ligero o moderado, para poder ser candidatos a la intervención por Cirugía Torácica: cociente FEV1/FVC postbroncodilatación medio de 75.14±12.41%, FEV1 medio de 82.18±21.19% y FEV1 postbroncodilatador medio de 89.44±21.25%; DLCO medio de 76.84±19.27%, y KCO medio de 87.13±20.72%.

Tabla 5. Comparación del N° de pacientes, edad y % de mujeres de los pacientes del biobanco EPOC y no EPOC con muestras enviadas a análisis de expresión génica diferencial.

	N (% del total)	Edad (X±SD en años)	Mujeres (% total y grupo)
Total	65	58,82±13,14	18 (27,69%)
EPOC (2COPD)	25 (38,46%)	63,64±8,40	2 (3,08 y 8%)
No EPOC (2nonCOPD)	40 (61,34%)	55,8±14,84	16 (24,62 y 40%)

De los 65 pacientes con muestras hibridadas para su estudio génico diferencial, 40 eran no EPOC (61.34%) y 25 eran EPOC (38.46%).

Fig 46. N° de pacientes, edades medias y n° de mujeres del total de pacientes del biobanco con muestras enviadas para análisis de expresión génica diferencial, y de los EPOC y no EPOC de entre éstos.



N = n° de pacientes; age: edad (años); females: mujeres; 2nonCOPD y 2COPD: pacientes no EPOC y EPOC con muestras enviadas para su análisis de expresión génica diferencial

Observamos que entre las muestras consecutivas del biobanco enviadas para el análisis de expresión génica diferencial había más pacientes no EPOC, que eran discretamente más jóvenes, y presentaban un mayor número y porcentaje de mujeres en comparación con los pacientes EPOC del biobanco.

Tabla 7. Comparación del nº de pacientes, edad y sexo entre los distintos fenotipos de combinación de función pulmonar espirométrica e historia tabáquica de los pacientes con muestras del Biobanco de Tejido Pulmonar almacenadas en 2005 y 2006 y enviadas para su análisis de expresión génica diferencial en 2008.

	N pacientes (% total y grupo)	Edad (años) X±SD	Mujeres (% total y grupo)
Nunca fumadores no EPOC (2HNS)	16 (24,62 y 40%)	50,75±17,33	12 (18,46 y 30%)
Exfumadores No EPOC (2HES)	8 (12,31 y 20%)	52,13±8,45	0 (0%)
Fumadores activos no EPOC (2HS)	16 (24,62 y 40%)	57,69±15,03	4 (6.15 y 16%)
EPOC exfumadores (2CES)	14 (24,62 y 56%)	65,21±14,59	0 (0%)
EPOC fumadores (2CS)	11 (16,92 y 44%)	61,64±15,27	2 (3,08 y 8%)

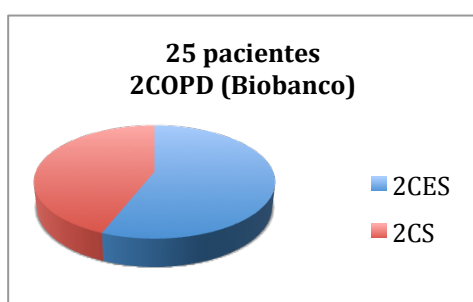


Fig 47. Las dos terceras partes de los pacientes con EPOC eran exfumadores; y el otro tercio restante, fumadores activos.

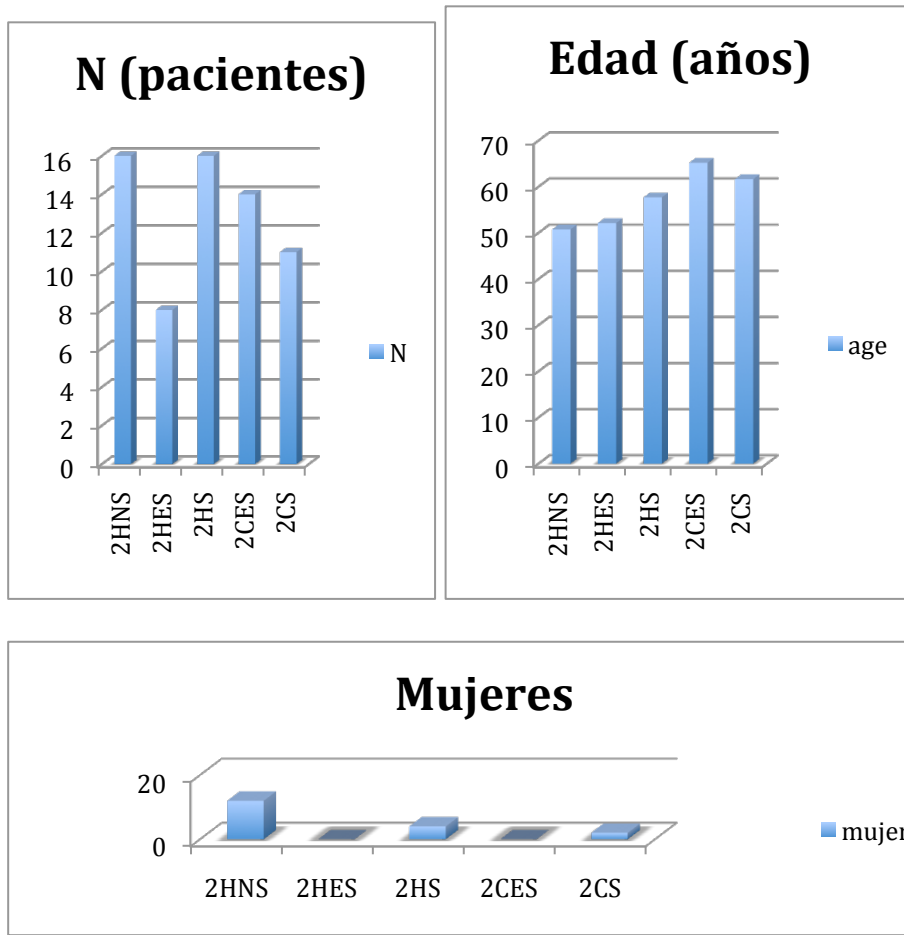


Fig 48. N° de pacientes, edad y n° de mujeres repartidos según fenotipos de hábito tabáquico combinados con espirometría en los pacientes con muestras del biobanco enviadas para expresión génica diferencial.

En cuanto a la distribución según hábito tabáquico, predominaban en número los controles no fumadores y fumadores activos sin EPOC, siendo menores entre éstos los exfumadores, mientras que en los EPOC del biobanco con muestras enviadas para su análisis de expresión génica diferencial tenían un mayor número de exfumadores que de fumadores activos.

En cuanto a la edad era discretamente mayor en los grupos con EPOC y dentro de los pacientes sin EPOC, entre los fumadores activos.

Las mujeres estaban desigualmente repartidas, presentando mayor número el grupo control no EPOC, y dentro de éste en el subgrupo nunca fumador. Las 2 mujeres EPOC valoradas eran todas ellas fumadoras activas.

Tabla 8. Comparación de n^o de pacientes, edad y sexo entre los distintos niveles de gravedad según grado de obstrucción GOLD dentro del grupo de fumadores no EPOC (2GOLD0) y EPOC (2GOLD1;2GOLD2;2GOLD3;2GOLD4) del biobanco con muestras enviadas para análisis de expresión génica diferencial.

	N pacientes (% total y EPOC)	Edad (X±SD años)	Mujeres (% total y grupo)
EPOC GOLD0 (2COPD0)	24 (36,92%)	59,17±11,61	4 (6,15 y 16,67%)
EPOC GOLD1 (2COPD1)	8 (12,3 y 32%)	66,38±6,37	0 (0%)
EPOC GOLD2 (2COPD2)	12 (18,46 y 48%)	62,08±9,11	2 (5 y 17,67 %)
EPOC GOLD3 (2COPD3)	4 (6,15 y 16%)	68,5±7,05	0 (0%)
EPOC GOLD4 (2COPD4)	1 (1,53 y 4%)	66±0	0 (0%)

EPOC GOLD 0 (exfumadores y fumadores no EPOC en riesgo de EPOC); EPOC (pFEV1/FVC <0.7) con pFEV1 >80% (GOLD1 ó 2COPD1); con pFEV1 50-80% (GOLD2 ó 2COPD2); con pFEV1 30-50% (GOLD 3 ó 2COPD3); y con pFEV1 <30% u oxigenoterapia domiciliaria (GOLD 4 ó 2COPD4). Edad calculada en años de media ± desviación estándar. Porcentajes (%) calculados sobre el total de 65 pacientes con muestras enviadas para expresión génica diferencial y sobre los pacientes de los grupos respectivos (sobre los 24 EPOC GOLD 0 “en riesgo”; y los GOLD 1, 2, 3 y 4 sobre los 25 EPOC).

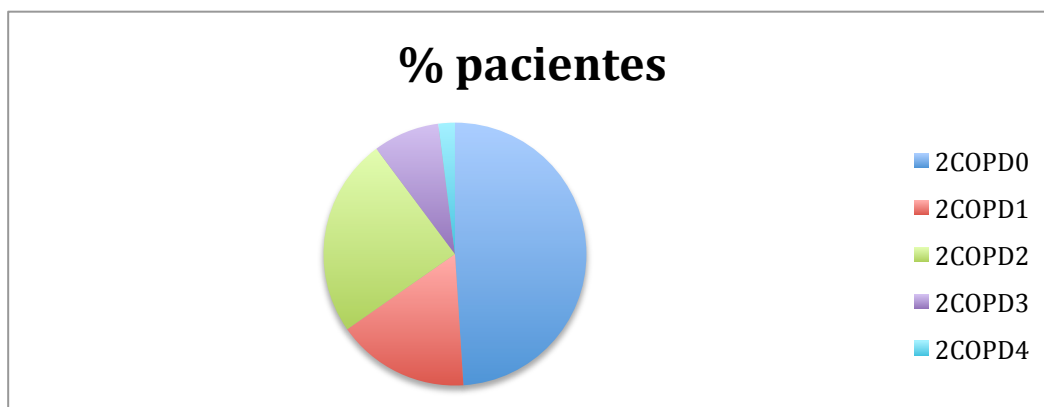


Fig 49. Proporción de pacientes según gravedad de la obstrucción por estadio GOLD (2COPD1,2,3,4).

Se aprecia una distribución de pacientes con predominio de EPOC GOLD 0 “no EPOC en riesgo”: fumadores y exfumadores no EPOC en riesgo de desarrollar EPOC. Y entre los EPOC de los estadios GOLD de obstrucción más leve (1 y 2), debido a estrictos criterios de operabilidad para poder ser intervenidos.

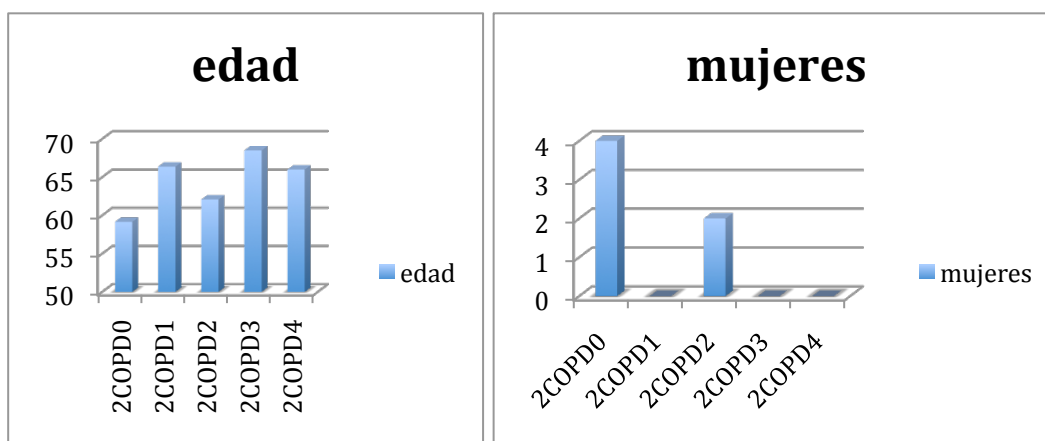


Fig 50. Edad y nº de mujeres repartidos según estadio de obstrucción GOLD (2COPD1,2,3,4) en los pacientes del biobanco con muestras enviadas para expresión génica diferencial.

La distribución por edades mostraba que eran discretamente más avanzadas en los pacientes EPOC con obstrucción más grave GOLD 3 y 4 y también en GOLD 1 en comparación con la de los pacientes con GOLD 2 ó los controles sin EPOC.

Las mujeres estaban desigualmente repartidas, estando representadas mayoritariamente en el grupo nunca fumador no EPOC, y después en el de EPOC GOLD 0 (2COPD0) “de riesgo”, es decir el grupo no EPOC con fumadores y exfumadores “en riesgo” de desarrollar EPOC.

Las 2 mujeres con EPOC con muestras enviadas para el análisis de expresión génica diferencial presentaban todas ellas obstrucción moderada (GOLD 2 ó 2COPD2).

Tabla 9. Distribución de la cantidad de tabaco fumada (dosis de tabaco acumulada total= DAT en paquetes año) entre los pacientes con EPOC y sin EPOC del biobanco con muestras enviadas para análisis de su expresión génica diferencial.

	DAT (paquetes-año) X±SD
Total	34,42±25,11
EPOC (2COPD)	50,83±14,92
No EPOC (2nonCOPD)	29,33±25,21

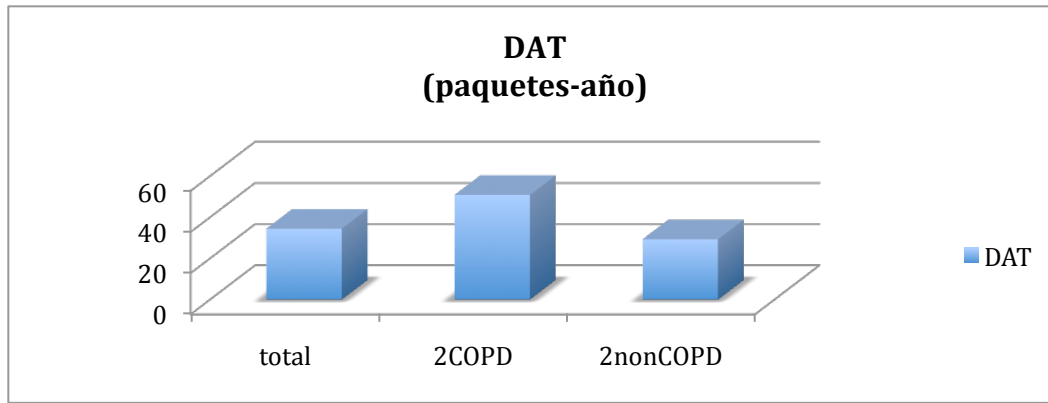


Fig 51. Dosis acumulada total de tabaco fumado (paquetes-año) comparada entre pacientes EPOC y no EPOC del biobanco con muestras enviadas para expresión génica diferencial

	DAT (paquetes-año)
EPOC GOLD 0 (2COPD0)	41,26 ± 19,18
EPOC GOLD 1 (2COPD1)	45,71 ± 11,34
EPOC GOLD 2 (2COPD2)	51,25 ± 15,24
EPOC GOLD 3 (2COPD3)	56,25 ± 21,65
EPOC GOLD 4 (2COPD4)	60 ± 0

Tabla 10. Dosis acumulada total de tabaco fumado según estadio de obstrucción GOLD (2COPD1,2,3,4) de los pacientes del biobanco con muestras enviadas para expresión diferencial génica.

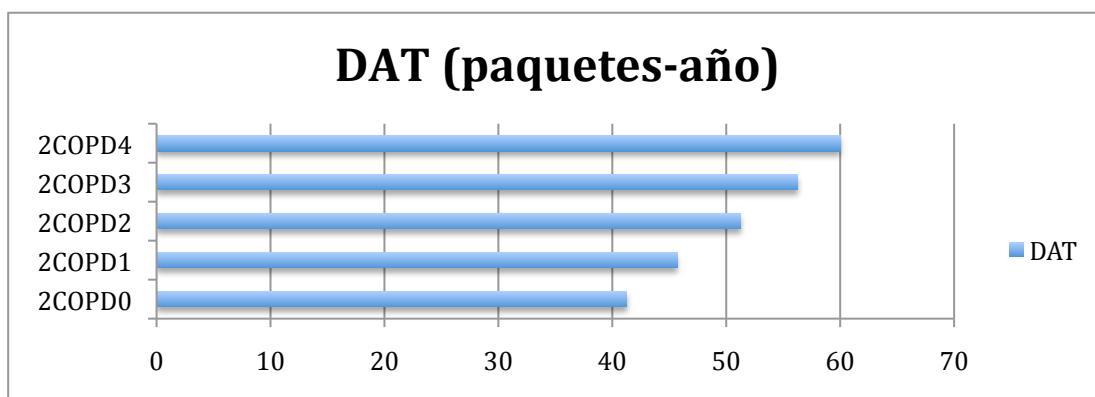


Fig 52. Dosis acumulada total de tabaco fumado según grado de obstrucción GOLD (2COPD1,2,3,4) en los pacientes del biobanco con muestras enviadas para expresión génica diferencial.

La cantidad de tabaco fumada calculada según dosis acumulada total en paquetes-año (años fumados x paquetes fumados al día) era mayor en el grupo de EPOC y aumentaba con el grado GOLD de obstrucción y con la edad.

Tabla 11. Medias y desviaciones estándar de dosis acumuladas totales de tabaco fumadas según fenotipos combinados de hábito tabáquico y espirometría de los pacientes del biobanco con muestras enviadas para expresión génica diferencial.

	DAT (paquetes-año) X±SD
Nunca fumadores no EPOC (HNS)	0±0
Exfumadores no EPOC (HES)	29,87±10,07
Fumadores No EPOC (HS)	47,33±19,82
EPOC exfumadores (CES)	53,62±18,6
EPOC fumadores (CS)	47,55±13,83

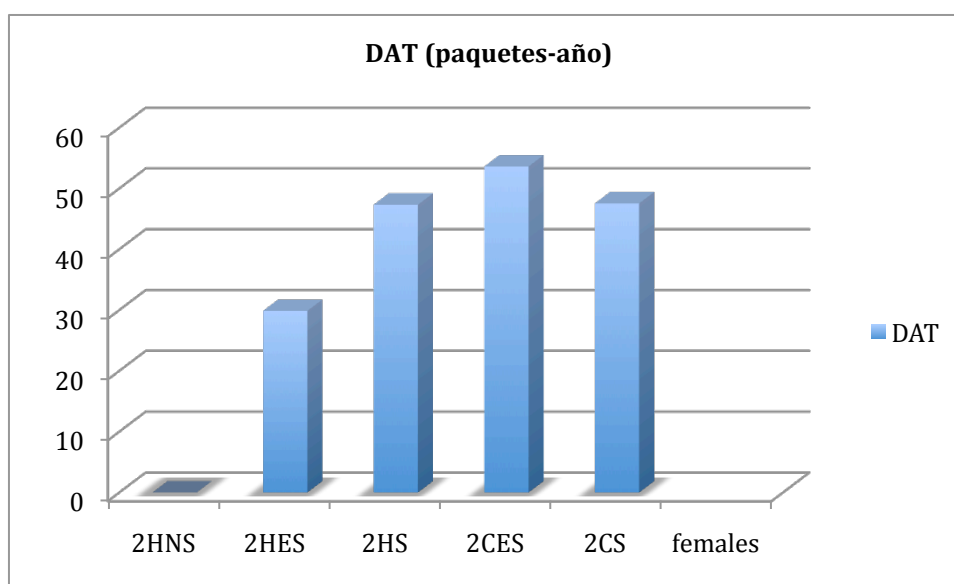


Fig 53. Dosis acumulada total de tabaco fumada según fenotipos combinados de hábito tabáquico y espirometría de los pacientes del biobanco con muestras enviadas para expresión génica diferencial.

La dosis acumulada total de tabaco fumado era mayor en el grupo EPOC, pero era similar entre los fumadores activos EPOC y no EPOC.

3.1 Diagnósticos oncológicos.

Los diagnósticos más frecuentes de indicación de la cirugía fueron oncológicos (63 (95%)): tanto malignos (58 (92%)), ya fueran tumores primarios pulmonares (49 (77%)) como adenocarcinoma pulmonar (IADK) (22 (38%)), carcinoma de células escamosas de pulmón (LSCC) (22 (38%)), carcinoma de células microcíticas de pulmón (MLC) (2 (3%)), mesotelioma (3 (5%)), o metástasis pulmonares (12 (21%)) de: colon (9 (75%)), tanto adenocarcinoma (IcADK) (8

(88.9%)), como carcinoma de células escamosas (lcca) (1 (1.1)), de adenocarcinoma de mama (lmADK) (1 (8.3%)), de leiomiosarcoma (1 (8.3%)), y de carcinoma de células renales (1 (8.3%)), o benignos que raramente malignizan como el tumor carcinoide de pulmón (3). Pero también lesiones no malignas: cuerpos extraños (2).

El estadio del cáncer fue en la mayoría de los casos localizado en los tumores primarios de pulmón después del estudio de extensión para la indicación de operabilidad: I(19) y II, pero también había casos de tumores no localizados con respuesta a la coadyuvancia con otros tratamientos previos como la quimio y la radioterapia: III y IV. No obstante, eran mayoritariamente extendidos ya, por definición, en las resecciones de metástasis pulmonares de tumores primarios de otros órganos (principalmente de colon): IV.

En el grupo no EPOC había más pacientes con metástasis de tumores primarios extrapulmonares (9) que en el grupo de EPOC, especialmente carcinomas de colon (7): 6 adenos y 1 carcinoma de células escamosas, pero también leiomiosarcoma (1) y carcinoma de células renales (1).

Hubo también en el grupo de no EPOCs más cánceres de pulmón localizados en estadios I (14) y II u otros diagnósticos no malignos (3 tumores carcinoides pulmonares y 2 cuerpos extraños); mientras que en el grupo de EPOC había más tumores primarios de pulmón, y generalmente más casos de tumores avanzadamente localizados, predominando los estadios II y III. Sin embargo, y pese a que existía una proporción relevante mayor de tumores metastáticos extrapulmonares en el grupo de no EPOC, predominaban en él los tumores primarios de pulmón (22): 10 carcinomas de células escamosas de pulmón (LSCC), 9 adenocarcinomas de pulmón (IADK) y 3 mesoteliomas (MTL).

3.3. Características de los grupos EPOC y no EPOC del biobanco comparados

Tabla 12 . Grado de obstrucción según FEV1 y FEV1 postbroncodilatador (pFEV1)

	FEV1 X _± SD (% valor referencia)	pFEV1 X _± SD (% valor referencia)
Total	82,16 _± 21,17	89,44 _± 21,25
EPOC (2COPD)	66,6 _± 16,87	71,75 _± 17,13
No EPOC (2nonCOPD)	92,54 _± 17,44	98,28 _± 17,93

Fig 54. Comparación de grado de obstrucción (media de FEV1) entre los pacientes EPOC y no EPOC del biobanco con muestras enviadas para expresión génica diferencial.

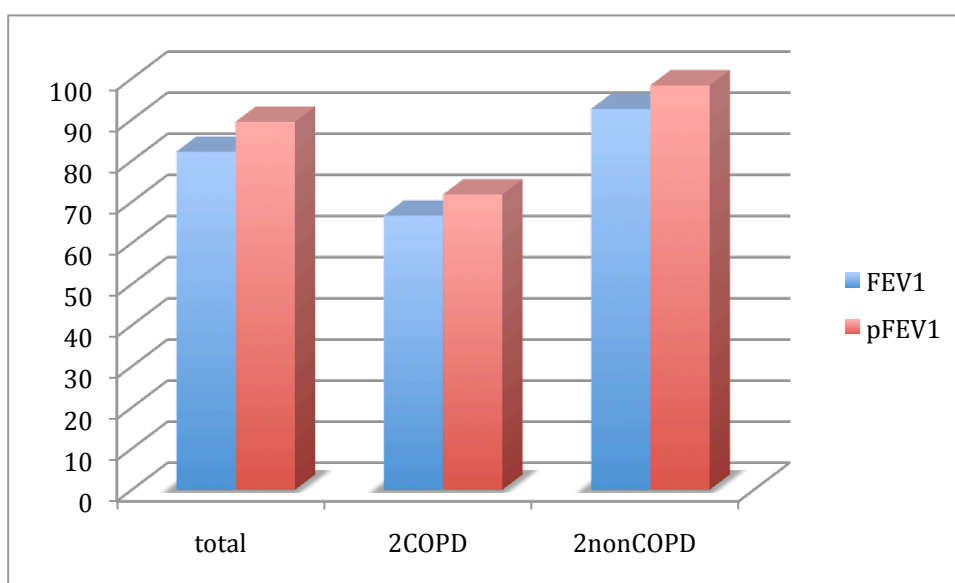


Fig 55 . Grado de obstrucción según FEV1 y FEV1 postbroncodilatador en los pacientes con muestras enviadas para expresión génica diferencial.

El grado de obstrucción según el FEV1 y el FEV1 postbroncodilatador era más marcado en el grupo EPOC, aunque de un grado ligero-moderado, dados los criterios estrictos de operabilidad.

Tabla 13 . Distribución de la prueba broncodilatadora positiva entre EPOC y no EPOC.

	PBD+
Total	1
EPOC (2COPD)	1
No EPOC (2nonCOPD)	0

PBD: prueba broncodilatadora

Llama la atención los escasos casos con prueba broncodilatadora positiva en nuestro estudio.

Tabla 14 . Distribución del grado de obstrucción según FEV1 y FEV1 postbroncodilatador en relación con los fenotipos combinados de función pulmonar e historia de hábito de consumo tabáquico.

	FEV1 X_±SD (% valor referencia)	pFEV1 X_±SD (% valor referencia)
Nunca fumadores no EPOC (HNS)	95,91 _± 19,5	101,5 _± 88,89
Exfumadores no EPOC (HES)	88,2 _± 18,3	108 _± 10
Fumadores no EPOC (HS)	90,41 _± 21,56	91,56 _± 27,02
EPOC exfumadores (CES)	66,25 _± 21,76	66,67 _± 26,29
EPOC fumadores (CS)	67 _± 19,58	66,84 _± 25

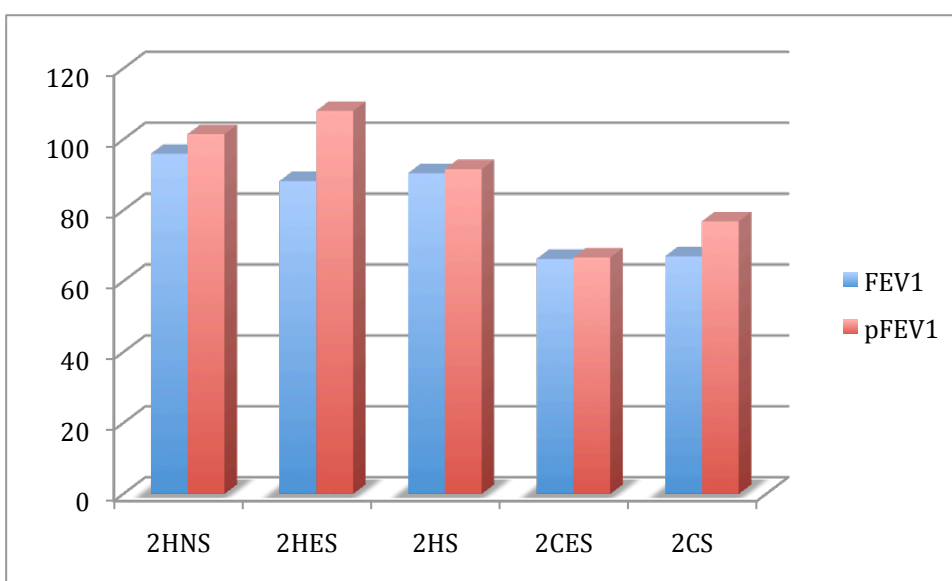


Fig 56. Grado de obstrucción según FEV1 y FEV1 postbroncodilatador de los distintos fenotipos combinados de hábito tabáquico y espirometría en los pacientes del biobanco con muestras enviadas para expresión génica diferencial.

Tabla 15 . Distribución del grado de obstrucción según FEV1 y FEV1 postbroncodilatador en los distintos estadios GOLD.

	FEV1 X_±SD (% valor referencia)	pFEV1 X_±SD (% valor referencia)
EPOC GOLD 0 (2COPD0)	90,41 _± 13,49	91,56 _± 15,14
EPOC GOLD1 (2COPD1)	85 _± 5,2	86,6 _± 2,41
EPOC GOLD 2 (2COPD2)	64,77 _± 9,28	66,33 _± 6,02
EPOC GOLD 3 (2COPD3)	45,07 _± 4,31	-
EPOC GOLD 4 (2COPD4)	30 _± 0	30 _± 0

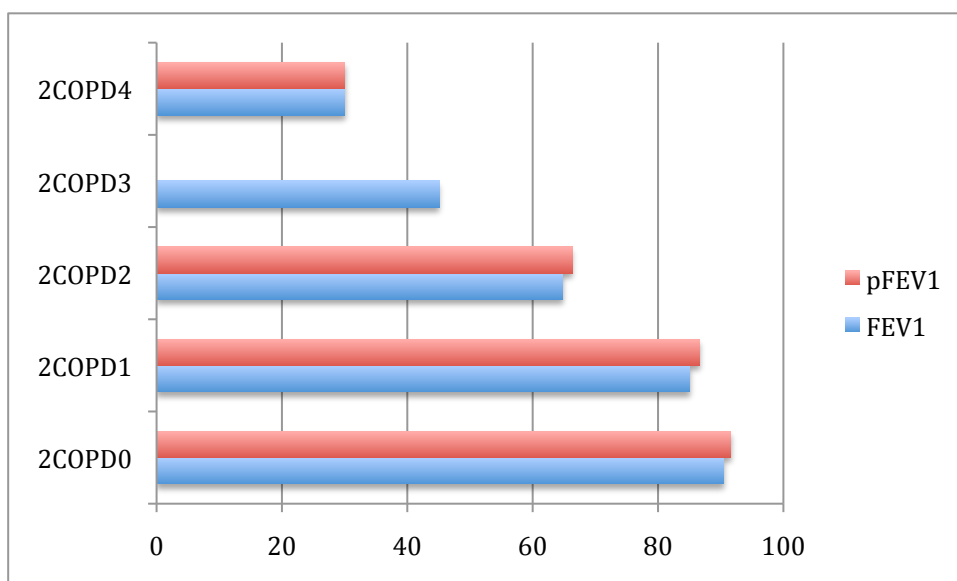


Fig 57. Grado de obstrucción medidos por los valores medios de FEV1 y FEV1 postbroncodilatador de los pacientes distribuidos por estadios GOLD (COPD1,2,3,4) con muestras enviadas para expresión génica diferencial.

Tabla 16. Difusión de monóxido de carbono entre los pacientes EPOC y no EPOC del Biobanco de Tejido Pulmonar del Hospital de Son Dureta con muestras enviadas para expresión génica diferencial.

	DLCO (% valor de referencia)	KCO (% valor de referencia)
Total	76,84±19,27	87,14±20,72
EPOC (2COPD)	71,04±23,16	86,33±23,16
No EPOC (2nonCOPD)	79,84±16,83	87,6±20,03

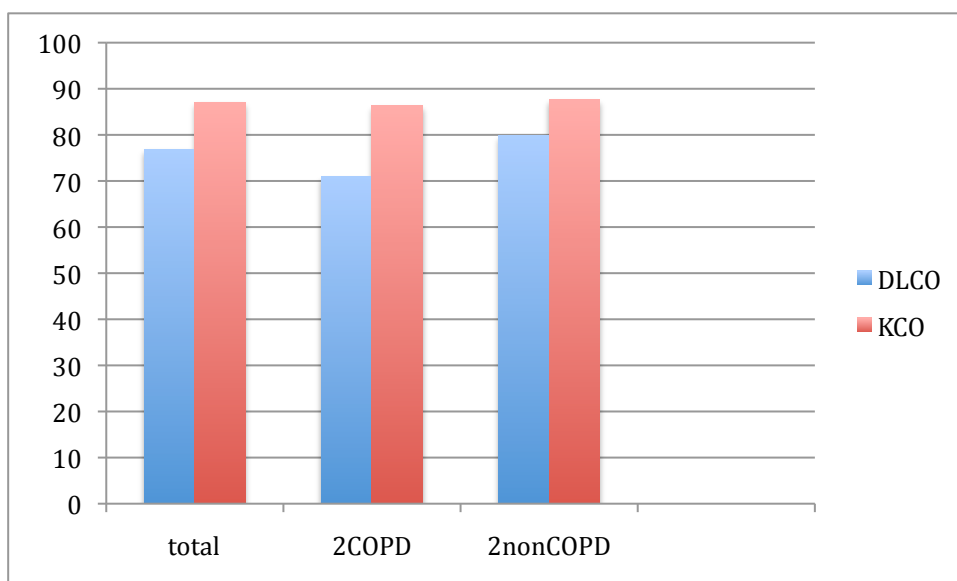


Fig 58. Comparación de la capacidad de difusión de CO media (% medido del valor teórico) entre pacientes EPOC, no EPOC y totales del biobanco con muestras enviadas para expresión génica diferencial.

La capacidad de difusión de CO era menor en los pacientes EPOC, aunque la KCO no presentaba grandes diferencias respecto a los no EPOC. No se evaluó la causa. Había algunos pacientes del grupo control con resecciones de metástasis únicas pulmonares que abordaban una 2ª intervención de resección pulmonar de también por recidiva de metástasis única pulmonar, o que habían recibido quimioterapia previamente (en uno y otro grupo).

Tabla 17. Distribución de la capacidad de difusión de CO (DLCO y KCO) según el grado de obstrucción GOLD.

	DLCO (% valor de referencia)	KCO (% valor de referencia)
EPOC GOLD 0 (2COPD0)	79,81±19,26	92,06±22,92
EPOC GOLD 1 (2COPD1)	67,33±23,03	68,25±8,42
EPOC GOLD 2 (2COPD2)	80±22,87	94,75±20,96
EPOC GOLD 3 (2COPD3)	65,2±12,02	99,43±24,41
EPOC GOLD 4 (2COPD4)	28±0	52±0

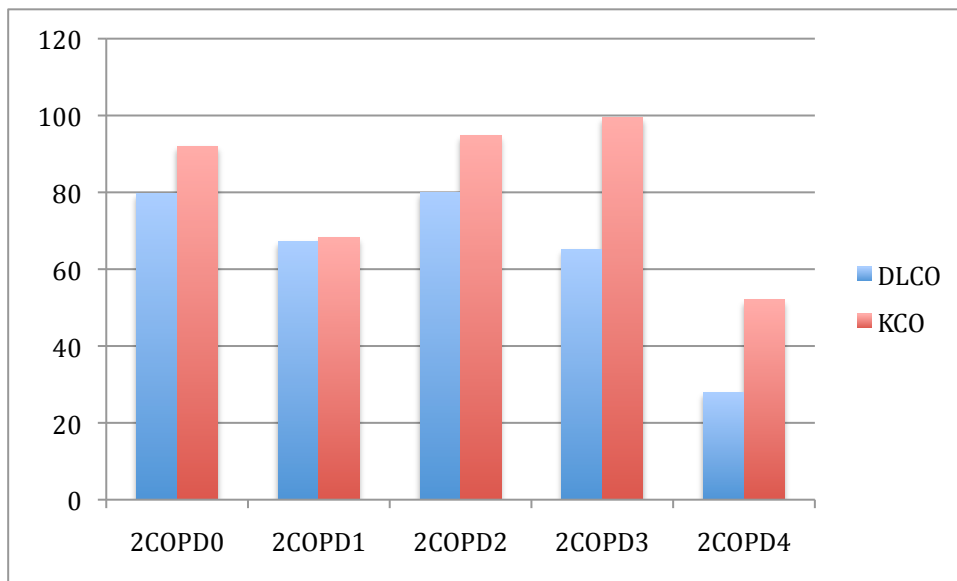


Fig 59. Comparación de valores medios de capacidad de difusión de monóxido de carbono (DLCO y KCO medidos en % de valor teórico) según estadios de obstrucción GOLD (2COPD1,2,3,4) de los pacientes del biobanco con muestras enviadas para expresión génica diferencial.

Había una correlación entre el grado de obstrucción GOLD y la capacidad de difusión de CO a partir del rango de EPOC moderado-grave (GOLD 2, 3 y 4), como en otros estudios con enfisemas más graves. No obstante, la disminución de la DLCO mayor en GOLD 1 que en GOLD 2, se explicaba por varios casos de enfisema con una afectación mayor del parénquima distal que de la pequeña vía aérea, que causaban obstrucción bronquial extremadamente ligera en cierta desproporción con el grado y extensión de enfisemas de grado ligero-moderado.

Pese a criterios estrictos de operabilidad que evitaban que los enfisemas más graves llegaran a cirugía, excepcionalmente había casos con resección en cuña paliativa pese a contraindicación funcional de una lobectomía o neumonectomía.

3.4 Características de los grupos de fenotipos pulmonares según TAC e historia tabáquica

Tabla 18. Difusión de CO (DLCO) entre los enfisemas y no enfisemas.

	DLCO X±SD (% valor de referencia)
Enfisema no EPOC (2EmphnonCOPD)	91,83±14,34
No EPOC (2nonCOPD)	79,84±16,83
No enfisema (2nonEmph)	77,17±16,74
Total	76,84±19,27
Enfisema (2Emph)	73,85±27,71
EPOC (2COPD)	71,04±23,16
Enfisema EPOC (COPDEmph)	66,14±29,2

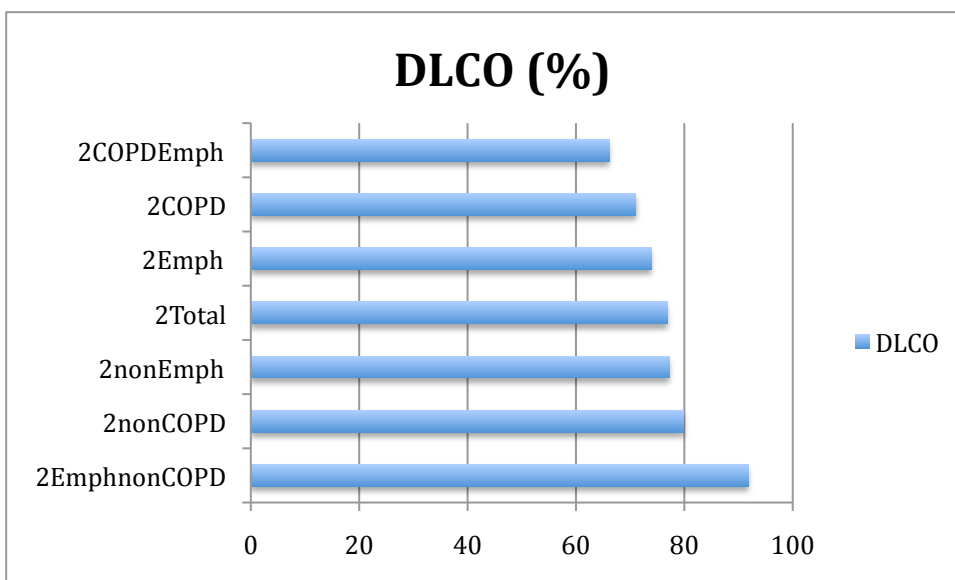


Fig 60. Comparación de valores medios de DLCO medida en % del valor teórico en los pacientes con EPOC, sin EPOC y con enfisema.

Observamos que la difusión de CO se ve más afectada en enfisemas con EPOC, aunque no en grado grave (DLCO>60%) al ser éste uno de los criterios funcionales de operabilidad que excluye los enfisemas más graves.

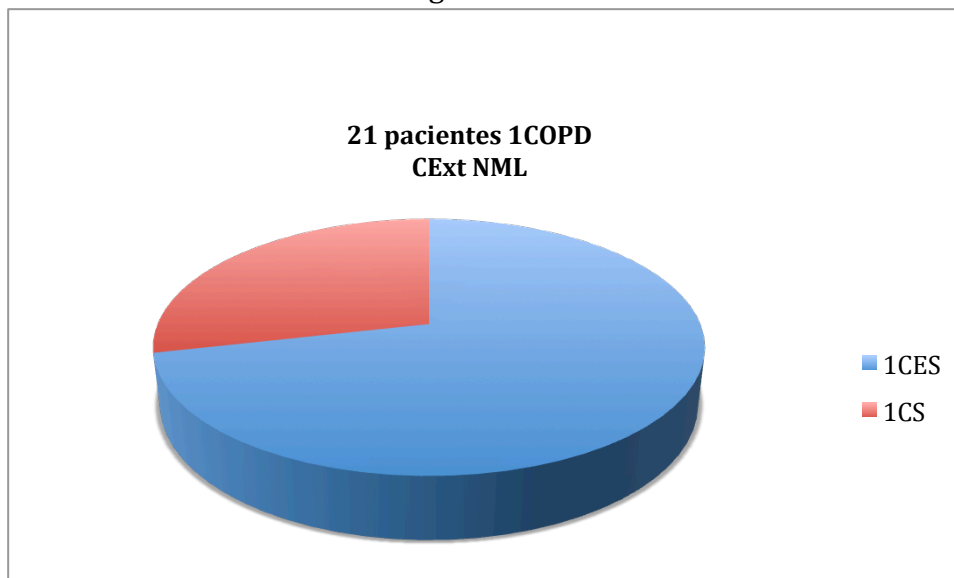
Llama la atención la escasa alteración de la difusión de CO en los casos de enfisema sin EPOC, pues éste era más leve, inicial, menos extenso, y centroacinar con afectación exclusiva de lóbulos superiores.

4. Descripción de una población control EPOC (1COPD) de consultas externas del Hospital de Manacor

Tabla 19. Descripción del nº de pacientes, edad y mujeres en la población de 21 EPOC consecutivos de Consultas Externas del Hospital de Manacor en marzo de 2013.

	N pacientes (% total)	Edad (años) $\bar{X} \pm SD$	Mujeres (% total y grupo)
EPOC total (1COPD)	21	68,8 \pm 10,83	2 (9,52%)
EPOC exfumadores (1CES)	15 (71,42%)	73,27 \pm 9,12	1 (4,76 y 6,67%)
EPOC fumadores (1CS)	6 (28,57%)	57,67 \pm 5,24	1 (4,76 y 1,17%)

Fig 61. Proporción de pacientes fumadores y exfumadores entre los 21 EPOC de consultas externas de Neumología.



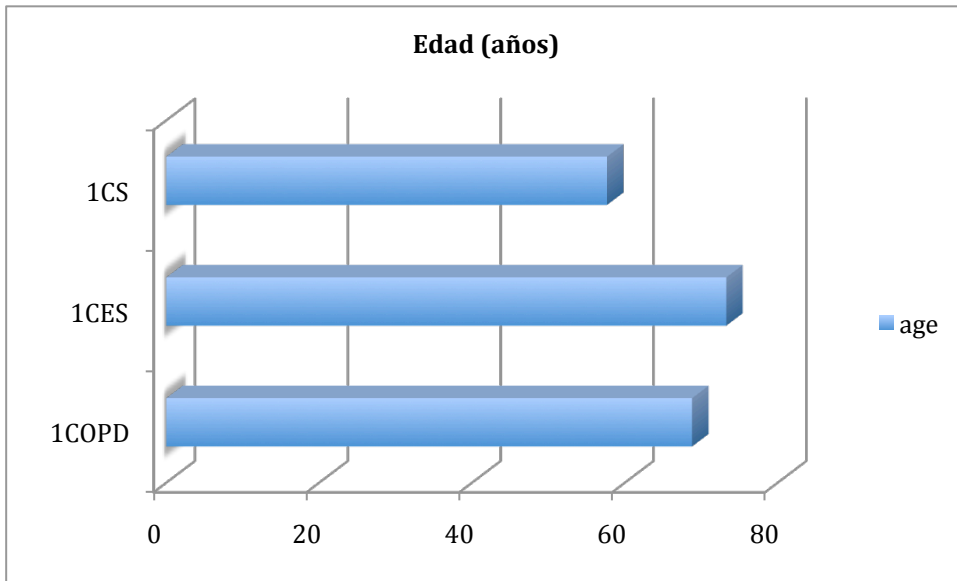
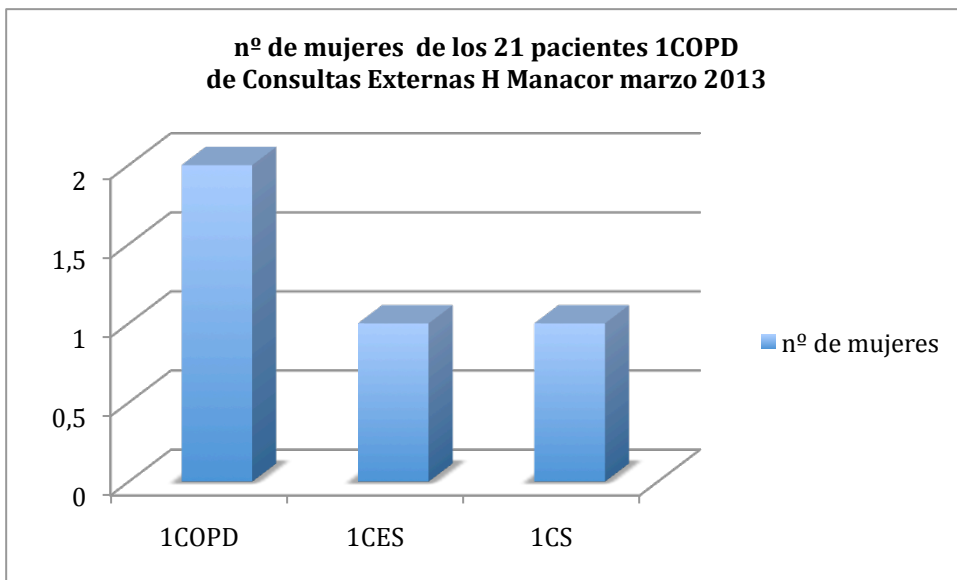


Fig 62. Edad media comparada de los 21 pacientes EPOC fumadores activos y exfumadores de consultas externas de Neumología del Hospital de Manacor.

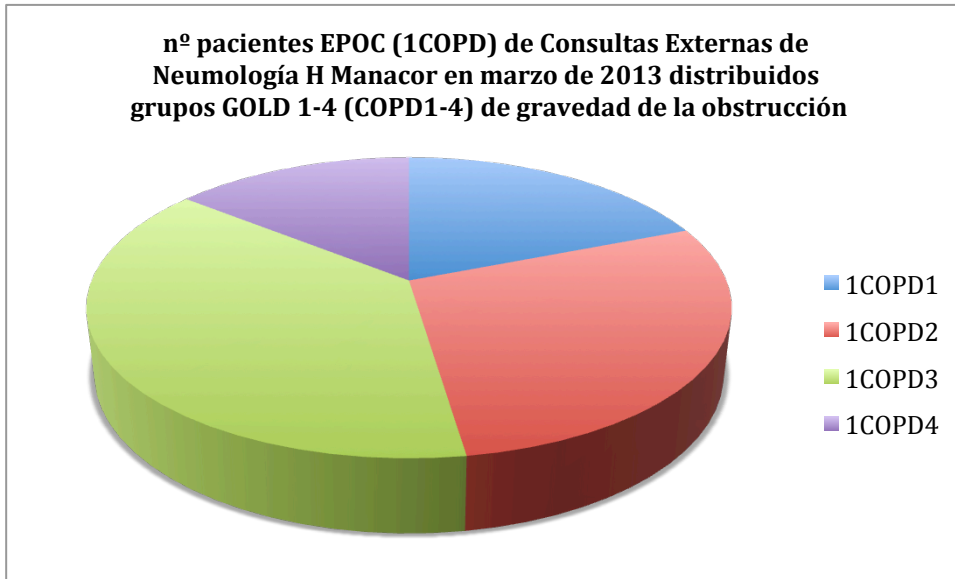
Se ve que los EPOC exfumadores de Consultas Externas tienen más edad, motivo por lo cual estaban más concienciados sobre la necesidad del abandono del hábito tabáquico, además de que eran pacientes con más sintomatología respiratoria.

Fig 63. Nº de mujeres repartidos entre los 21 EPOC fumadores y exfumadores de consultas externas.



Del mismo modo que ocurría entre los pacientes EPOC del biobanco (2005-2006) con muestras enviadas para el análisis de la expresión génica diferencial, los pacientes EPOC de Consultas Externas de Neumología del Hospital de Manacor también comprendían un escaso nº de mujeres.

Fig 64. Proporción de pacientes según estadio de obstrucción GOLD (1COPD1,2,3,4) en los EPOC de consultas externas.



Vemos como los pacientes EPOC de Consultas Externas de Neumología del Hospital de Manacor presentaban en más de la mitad de los casos obstrucción del flujo aéreo en la vía aérea de grado grave (GOLD ó 1COPD3) o muy grave (GOLD ó COPD4). No obstante, el predominio eran de EPOC moderados-graves GOLD 2-3 en más de las 2/3 partes de los casos, con predominio de EPOC grave (GOLD3 ó 1COPD3), con más de la 1/3 parte de los pacientes, sobre los moderados (GOLD 2 ó 1COPD2) que representaban algo más de la 1/4 parte. El número de pacientes con un mayor grado de obstrucción es también mayor en comparación con el de los EPOC del biobanco de tejido pulmonar 2005-2006.

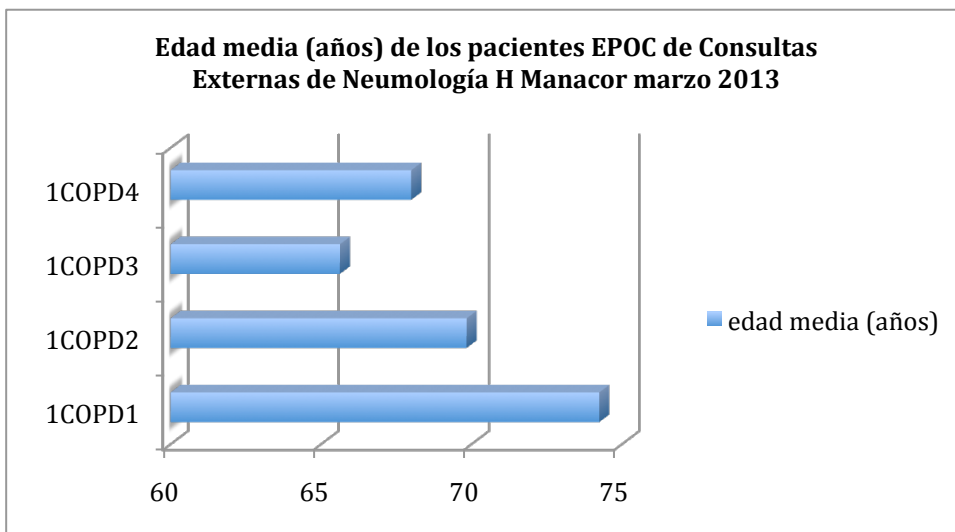


Fig 65. Edad media de los pacientes EPOC de consultas externas distribuidos según estadio de obstrucción GOLD (1COPD1,2,3,4).

Observamos que la media de edad de los pacientes EPOC de Consultas Externas de Neumología era mayor entre los pacientes con EPOC ligero (GOLD 1 ó 1COPD1), presentando un porcentaje no desdeñable de pacientes con EPOC con obstrucción más grave de inicio precoz, que no se veían representados de la misma manera entre los EPOC del biobanco 2005-2006 con muestras enviadas para su análisis.

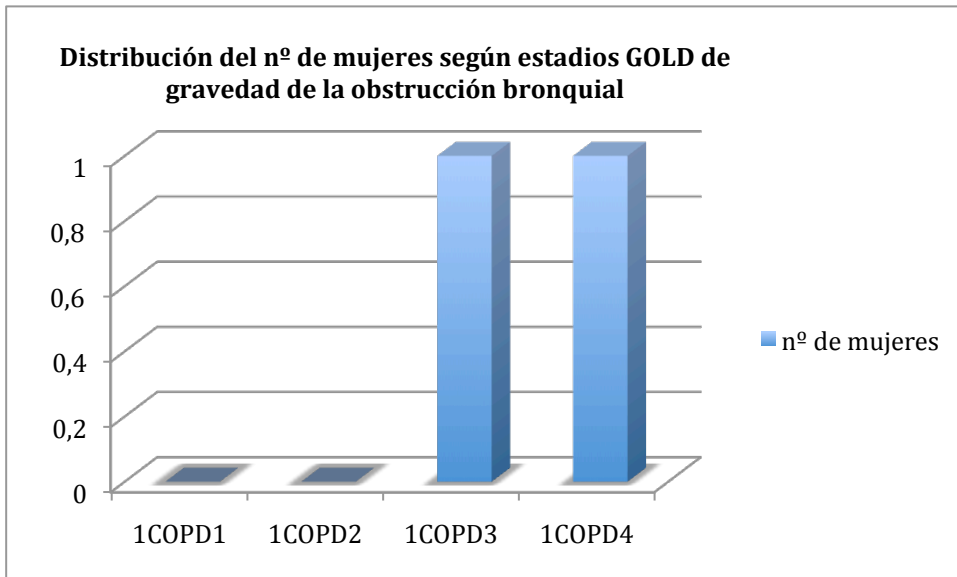


Fig 66. Distribución del nº de mujeres según estadios GOLD de gravedad.

Vemos que las escasas mujeres EPOC que acudían a consultas presentaban todas ellas, las 2, obstrucción de grado grave o muy grave (GOLD3-4 ó 1COPD3-4).

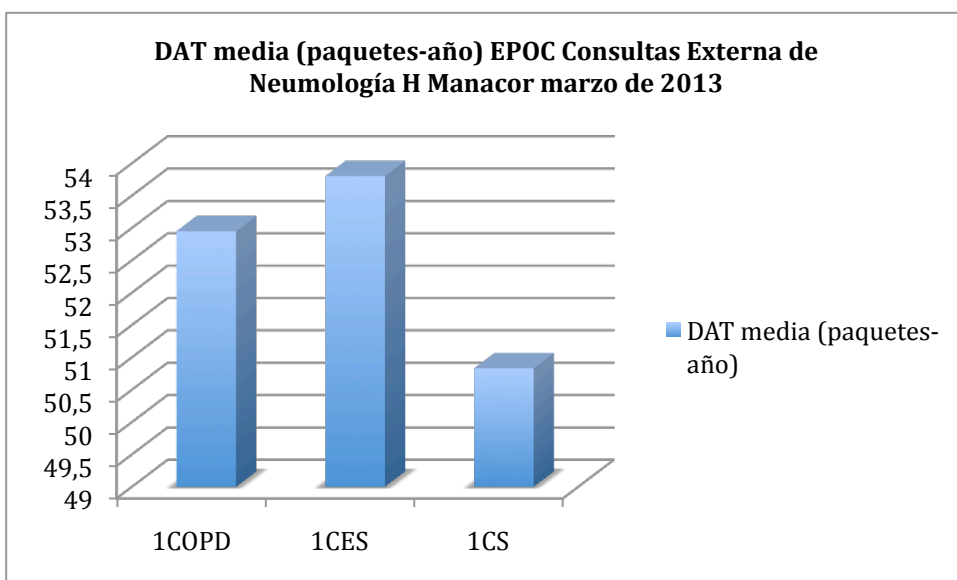


Fig 67. DAT media grupos hábito tabáquico EPOC de consultas externas.

Los pacientes EPOC exfumadores de consultas tenían una mayor dosis acumulada total fumada que los EPOC fumadores activos de consultas.

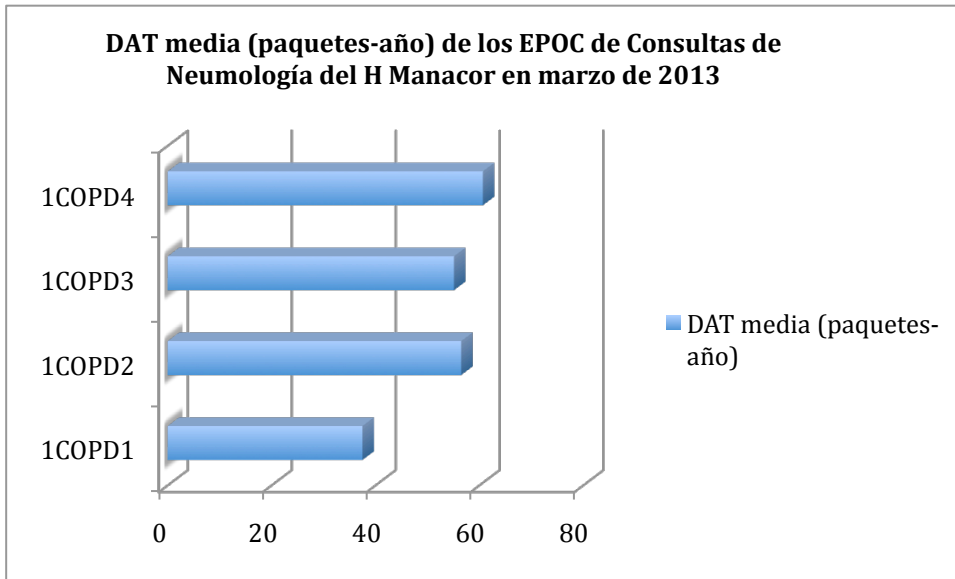


Fig 68. DAT media por grupos GOLD de los EPOC de consultas.

Observábamos una cierta correlación entre la dosis acumulada fumada total y el grado de obstrucción EPOC, aunque también había EPOC moderados con alta exposición tabáquica.

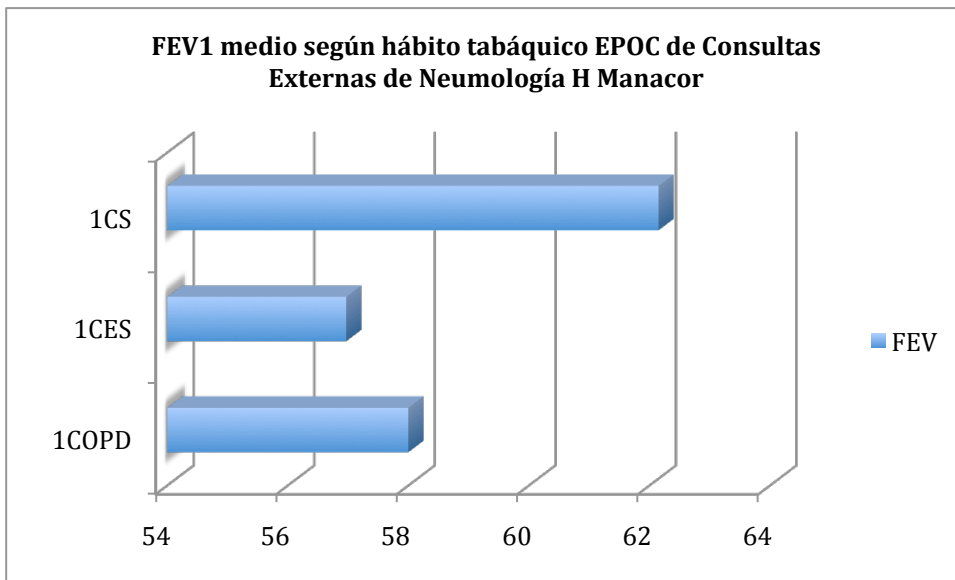


Fig. 68 bis. Los pacientes EPOC que seguían fumando de Consultas Externas presentaban menor obstrucción al flujo aéreo que los EPOC exfumadores.

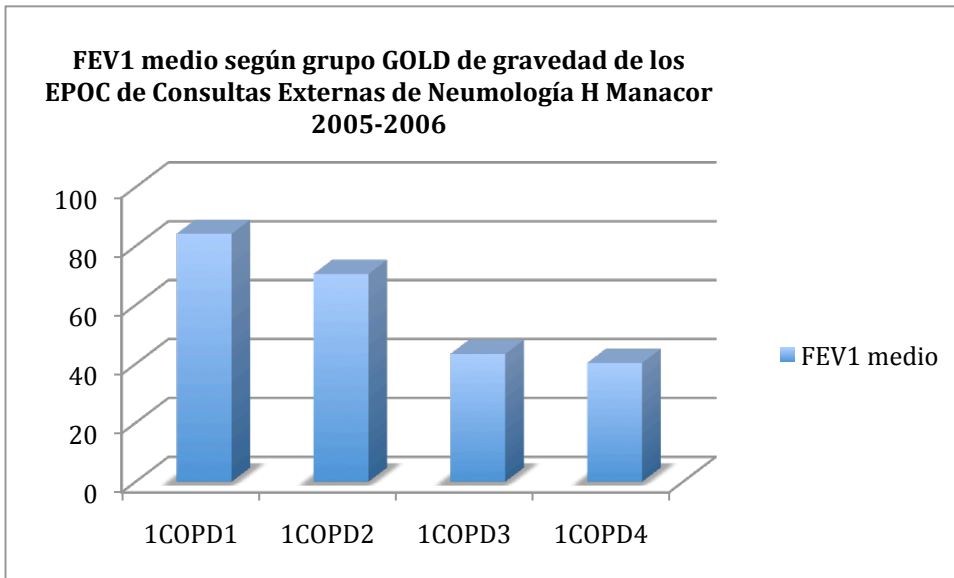


Fig 69. FEV1 medio por estadios GOLD de EPOC de consultas.

Como corresponde, existía correlación entre el grado de gravedad de la obstrucción GOLD y el FEV1 medio medido.

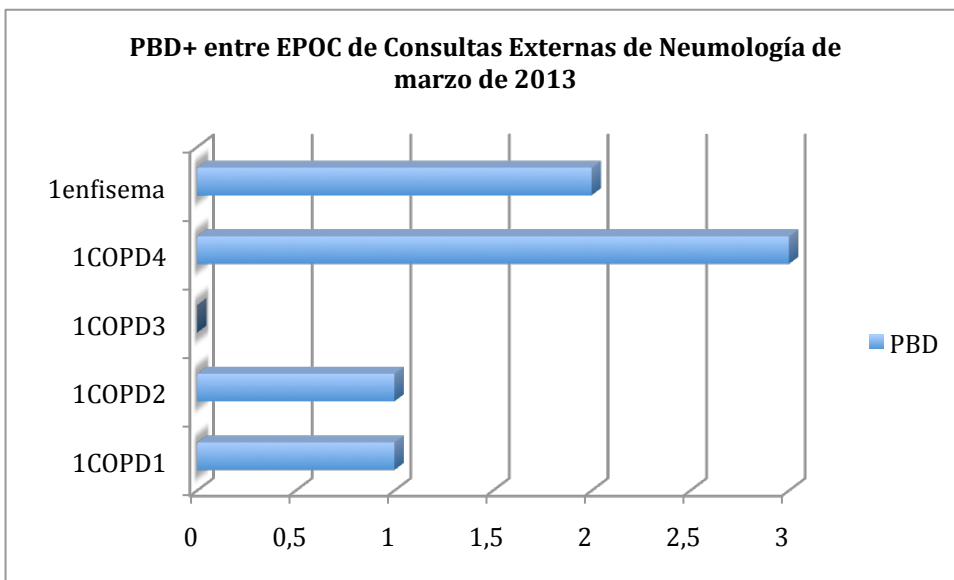


Fig 70. Nº pacientes con prueba broncodilatadora positiva entre estadios GOLD de EPOCs de consultas.

De los 7 (33,33%) pacientes EPOC de consultas con prueba broncodilatadora positiva 3 (la mayoría) eran de grado muy grave y 2 presentaban enfisema asociado.

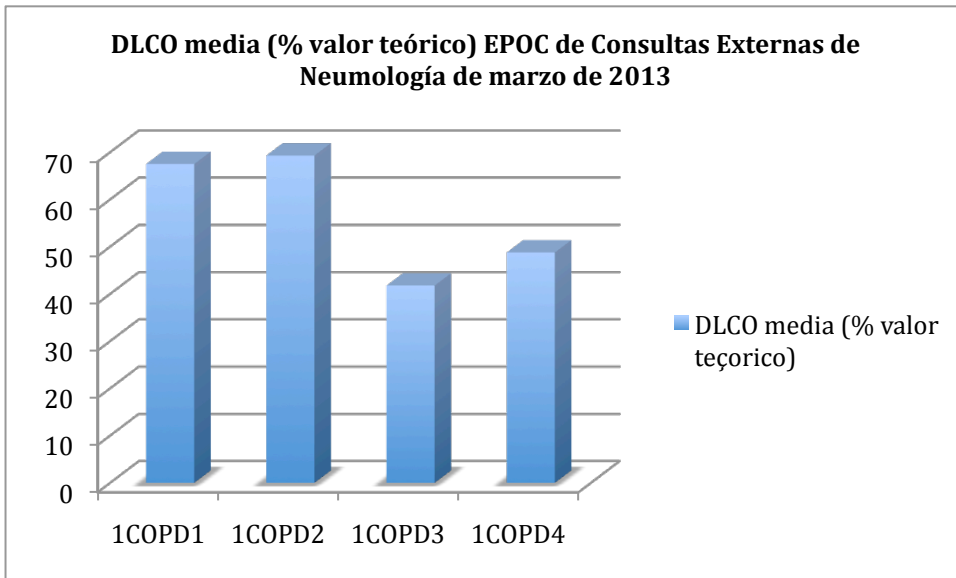


Fig 71. DLCO media estadios GOLD de pacientes EPOC de consultas.

No se observaba correlación entre el grado de obstrucción GOLD de los pacientes EPOC de consultas y la difusión alveolares de monóxido de carbono.

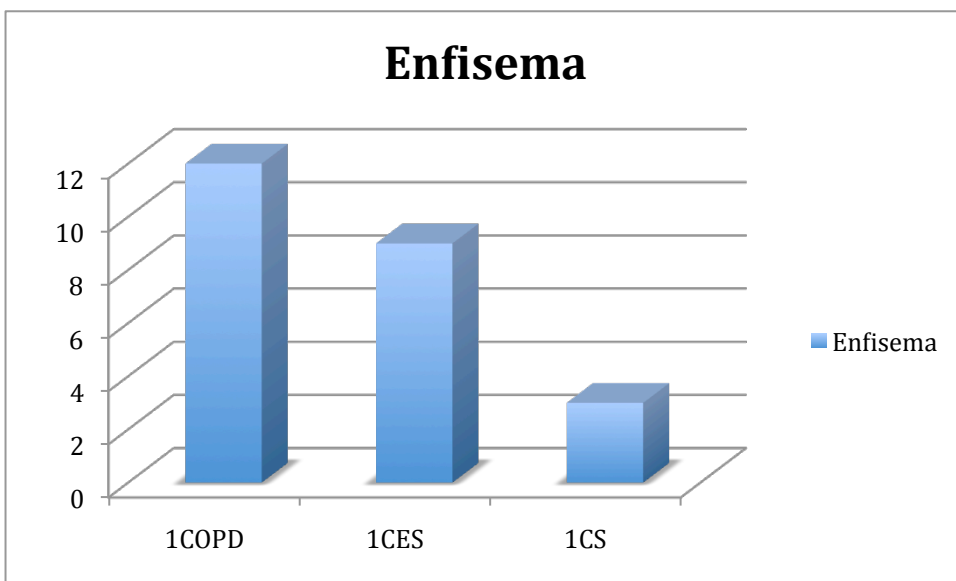


Fig 72. Distribución del N^o de pacientes con enfisema entre EPOC fumadores y exfumadores y total.

Había más casos de enfisema en los EPOC de consultas entre los exfumadores que entre los fumadores activos, probablemente en relación con la mayor dosis acumulada total de tabaco expuesta previamente.

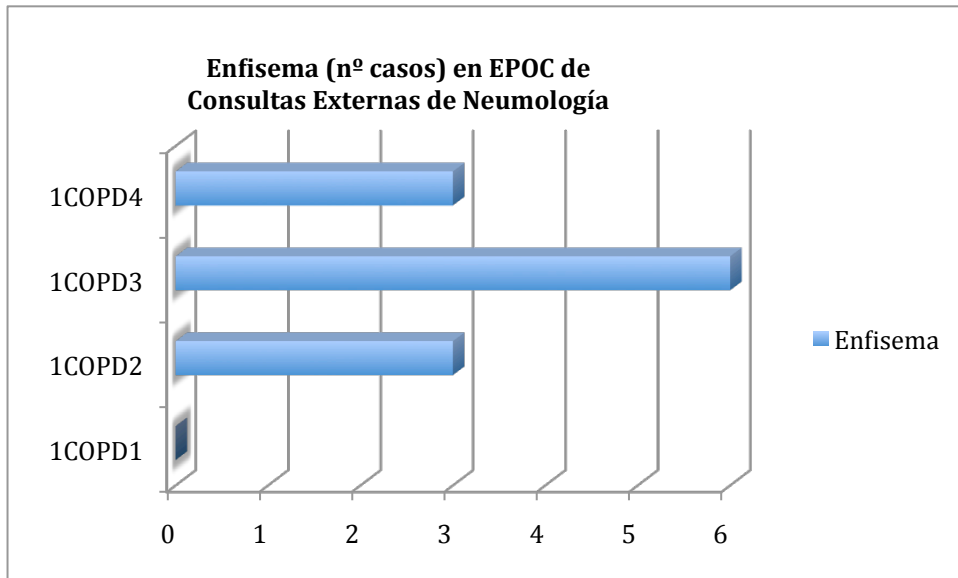


Fig 73. Distribución de casos de enfisema entre estadios GOLD de pacientes EPOC de consultas.

Los pacientes con enfisema de consultas externas solían presentar un grado de obstrucción mayor al flujo aéreo, siendo predominantemente GOLD3.

5. Análisis comparativo epidemiológico de los pacientes EPOC del biobanco (1COPD) y los de consultas externas de Neumología (2COPD)

Fig 74. Comparación de proporción de pacientes exfumadores y fumadores en los EPOC de consultas y del biobanco.

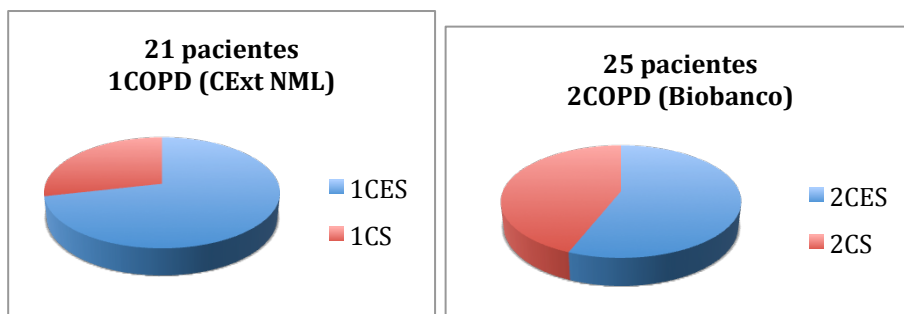
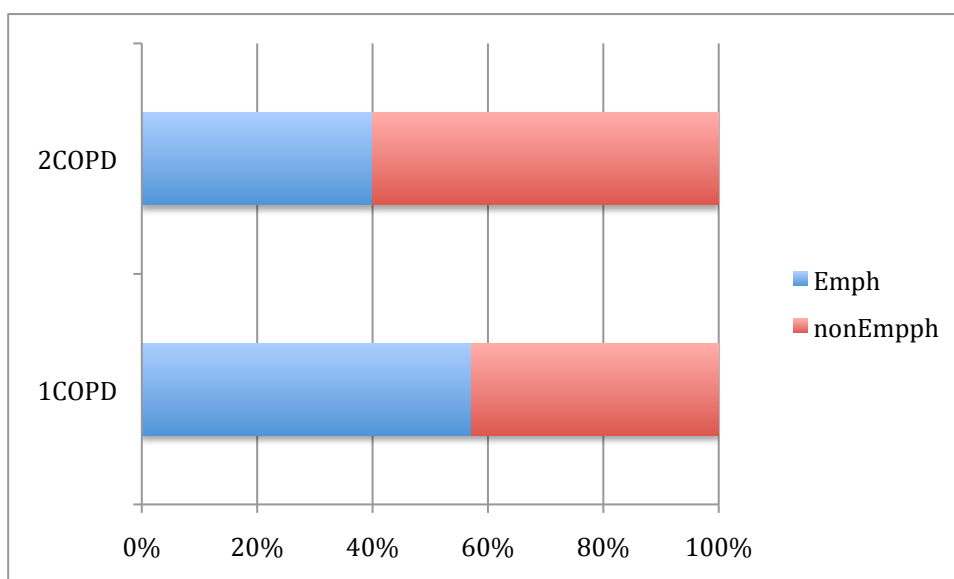


Tabla 20. Comparación de la distribución de casos de enfisema entre los casos con EPOC de consultas y del biobanco.

	Enfisema (nº casos y % total)	No enfisema (nº casos y % total)
1EPOC (1COPD)	12 (57,14%)	9 (42,86%)
2EPOC (2COPD)	10 (40%)	15 (60%)

Fig 75. Proporción de enfisemas entre EPOCs de consultas y del biobanco.



Vemos que existía una proporción algo mayor de casos de enfisema entre los pacientes EPOC consecutivos que acudían habitualmente a Consultas Externas de Neumología (1COPD) que entre los EPOC del biobanco con muestras enviadas para análisis de expresión génica, lo cual se podría atribuir a que los pacientes EPOC de Consultas Externas eran más graves y tenían mayor grado de obstrucción, síntomas, comorbilidad, y extensión y gravedad del enfisema, debido a

criterios estrictos de operabilidad para valoración del riesgo-beneficio quirúrgico que excluían a los EPOC y enfisemas más graves.

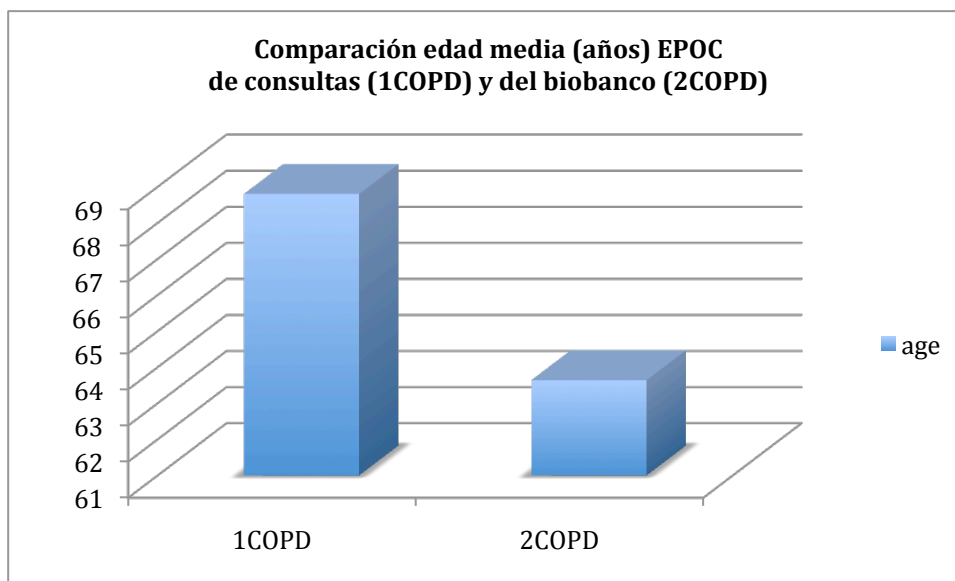


Fig 76. Comparación de edad media entre EPOC de consultas y del biobanco.

La edad de los pacientes EPOC de Consultas Externas de Neumología era algo mayor que la de los EPOC del biobanco con muestras enviadas para análisis de expresión génica diferencial.

Había el mismo número de mujeres (2) entre los EPOC de consultas (9,52%) que entre los EPOC con muestras enviadas del biobanco (8%) y una dosis acumulada total media similar: 52.95 paquetes-año en los EPOC de consultas y de 50.83 paquetes-año entre los EPOC del biobanco con muestras enviadas para hibridación.

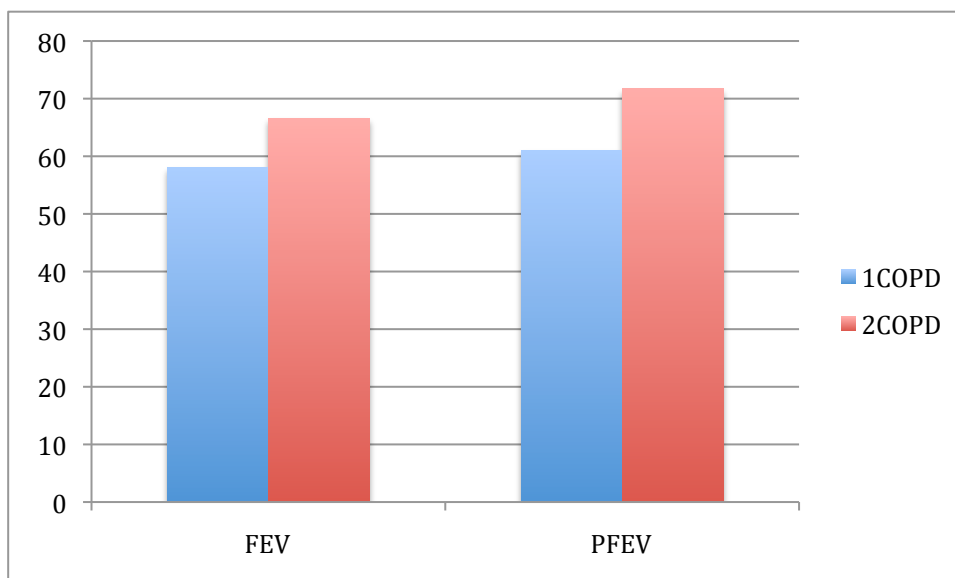


Fig 77. Comparación % de FEV1 pre y postbroncodilatador medio de los EPOC de consultas y del biobanco.

El volumen forzado en el primer segundo tanto pre como postbroncodilatador era menor en los pacientes EPOC de consulta que en los EPOC con muestras enviadas del biobanco, sugiriendo que el grupo del biobanco presentaba un menor grado de obstrucción al flujo aéreo, posiblemente por criterios de operabilidad estrictos.

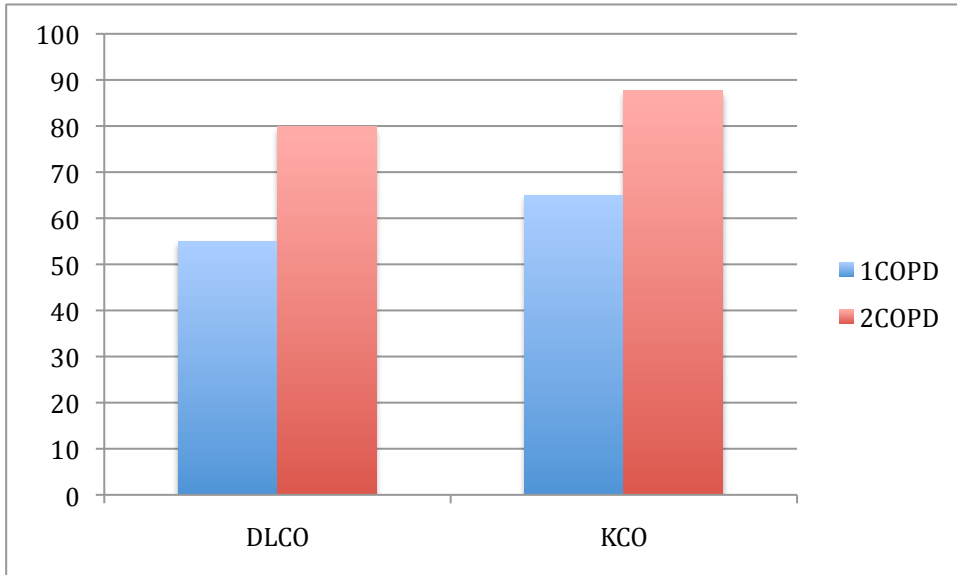


Fig 78. Comparación del % de DLCO y KCO de los EPOC de consultas y del biobanco.

Los pacientes EPOC del biobanco con muestras enviadas presentaban menor alteración de la difusión de monóxido de carbono que los EPOC de consultas, sugiriendo un filtro por criterios de operabilidad.

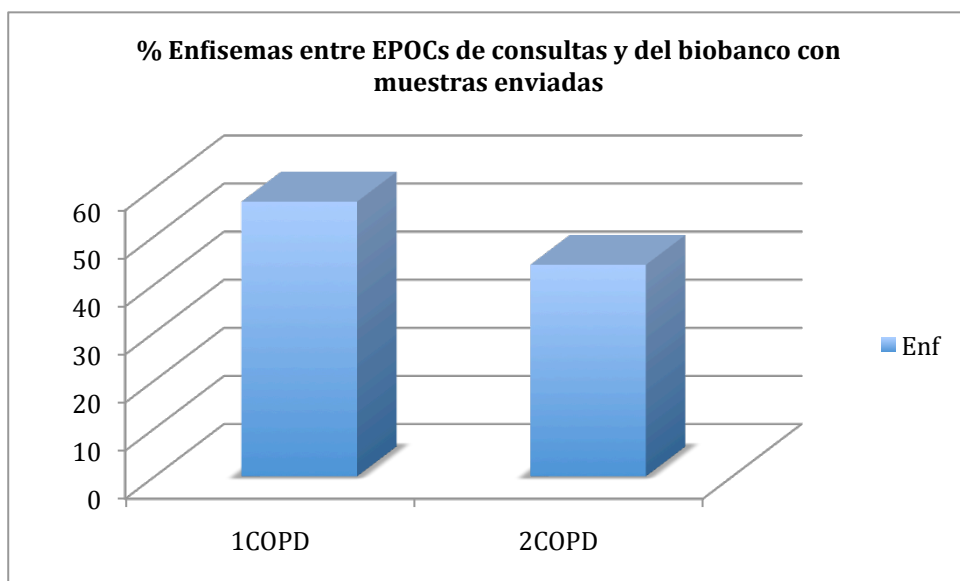


Fig 79. Proporción de enfisemas entre EPOC de consultas y del biobanco.

Porcentualmente había una proporción algo menor de enfisemas entre los pacientes EPOC del biobanco con muestras enviadas que entre los EPOC de consultas, probablemente por el mismo motivo.

6. Resultados del análisis principal del estudio: análisis comparativo estadístico bioinformático ROAST de la expresión génica diferencial del tejido pulmonar de los pacientes EPOC respecto a los no EPOC

6.1. Análisis de la expresión génica diferencial por “grupos de genes” de vías moleculares

Se observaron **46 vías moleculares (pathways) con expresión diferencial**, en su mayoría infraexpresadas, con nivel de significación (**p<0.05**). Hubo un total de 191 vías moleculares con expresión diferencial, en su mayoría infraexpresadas, con nivel de significación (**p<0.1**).

Enumeramos la lista de las 46 vías moleculares con expresión diferencial en los pacientes con EPOC con nivel de significación (**p< 0.05**).

La lista de genes diferencialmente expresados de cada uno de los grupos de genes de cada vía molecular se puede consultar en el apartado específico de los anexos.

En la siguiente lista de dichas **46 vías moleculares** expresadas diferencialmente en EPOC. Anotamos entre paréntesis el **número de genes** (las listas con sus nombres se pueden consultar en el anexo correspondiente), el nivel de significación (**p**), el nombre de cada vía molecular en inglés y español, y un resumen de los resultados de estudios previos sobre las **funciones** y actividad de cada una de estas vías moleculares en la EPOC:

1. **CCR3** (33 genes) **p=0.047**. C-C receptor 3. Estudios previos mostraban: Receptores de ligandos C-C de linfocitos T, células epiteliales, músculo liso y eosinófilos. Favorece la activación, proliferación y acúmulo tisular de linfocitos T CD8+ característico de la EPOC y la formación de folículos linfoides en grados más avanzados de obstrucción de la EPOC, que se han postulado como algunos de los mecanismos de perpetuación, cronificación y progresión de la inflamación crónica incluso tras el abandono del hábito de fumar. En la EPOC las células epiteliales activadas y los macrófagos liberan mediadores quimiotácticos como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), quimiocina C-C motif ligando 2, quimiocina (C-X-C motif) ligando 1 (CXCL1), CXCL8, CXCL9, CXCR10 y CXCR11 responsables de atraer linfocitos y otras células de defensa al lugar de la inflamación.

2. **ECM** (43 genes) **p=0.048**. Extracellular matrix. Matriz extracelular. Estudios previos mostraban: Aumento de los genes que promueven la producción y depósito de matriz extracelular alrededor de la pequeña vía aérea. Estabilidad o disminución de los mismos en el parénquima pulmonar. Los componentes de la matriz extracelular son producidos por fibroblastos fenotípicamente diferenciados en las respectivas áreas y por células musculares fundamentalmente. Algunos polimorfismos aislados en genes de las metaloproteasas 1, 2, 9 y 12 (MMP-1, MMP-2, MMP9, MMP12) se han asociado a la enfermedad de la EPOC. La composición de la matriz depende del balance entre proteinasas (especialmente metaloproteinasas: MMP9 y MMP12) y antiproteinasas

(sobre todo el inhibidor tisular de las metaloproteasas: TIMP). Resultados de estudios inconsistentes sobre remodelado bronquial en EPOC y los componentes de la matriz extracelular por la heterogeneidad de los pacientes con EPOC con grados variables de enfisema, fibrosis peribronquial o afectación de pequeña vía aérea. Ello hace necesario el fenotipado escrupuloso de estos pacientes. Componentes: colágeno (1 y 3), elastina, glicoproteínas y proteoglicanos. Algunos factores de reparación tisular están implicados en la activación de fibroblastos y la alteración de los componentes de la matriz celular como el transforming growth factor beta (TGF- β), connective tissue growth factor (CTGF), fibroblast growth factor (FGF), hepatocyte growth factor (HGF) y platelet-derived growth factor (PDGF), que se unen a glucosaminoglicanos de la matriz. Aumento del acúmulo peribronquial de colágeno de tipos 1 y 3. Disminución de biglicano y decorina que tienen como función entrelazar las fibras de colágeno, y de elastina. Capacidad de los fibroblastos disminuida de producción de elastina tras estímulo por TGF- β . Disminución en las paredes alveolares de la elastina y aumento del proteoglicano versicán.

3. **Ras** (68 genes) $p=0.047$. Ras oncogene. Oncogen ras. Estudios previos mostraban: Desarrollo en algunos fumadores de mutaciones somáticas adquiridas por el humo del tabaco en oncogenes con mayor o menor susceptibilidad, como el Ras, el p53, el receptor del factor de crecimiento epitelial (EGFR) o el PTEN. Dichas mutaciones son persistentes una vez adquiridas, lo que podría explicar la paradoja de la falta de resolución de la inflamación de la vía aérea de los pacientes EPOC pese al abandono de la exposición tabáquica o de la supuesta "susceptibilidad", que en este caso podría tener un componente mixto, genético y adquirido.

4. **GLEEVEC** (45 genes) $p=0.047$. GLEEVEC (imatinib) pathway. Estudios previos mostraban: Vía del imatinib (tratamiento antileucémico de la leucemia linfática crónica, inhibidor del platelet-derived growth factor (PDGF) y del transforming growth factor beta (TGF- β), implicados en la proliferación celular, angiogénesis y fibrosis peribronquial.

5. **GPCR** (45 genes) $p=0.047$. G protein coupled proteins. Receptores de membrana acoplados a proteínas G. Estudios previos mostraban: Acoplados a fosfolipasa A. Parte de los receptores parasimpáticos muscarínicos y betaadrenérgicos implicados en la hipersecreción mucosa glandular y contracción/hiperreactividad del músculo liso peribronquial los primeros y en la relajación bronquial los segundos. De ellos depende la respuesta al tratamiento broncodilatador, tanto anticolinérgico, como beta-2 adrenérgico inhalado y los fenómenos de taquifilaxia, o tolerancia cada vez a dosis mayores de beta-2 agonistas para conseguir efecto. Proliferación muscular peribronquial. os similares.

6. **CDK5** (30 genes) $p=0.047$. CDK5 kinasa. Estudios previos mostraban: Regulación del estrés oxidativo en la apoptosis celular endotelial causada por el humo del tabaco, a través de las vías MAP kinasa del p35.

7. **PDGF** (46 genes) $p=0.047$. Platelet derived growth factor. Factor de crecimiento de los derivados de plaquetas. Estudios previos mostraban: Trombogénesis. Angiogénesis. Fibrosis. Proliferación del músculo liso peribronquial.

8. **IL3** (38 genes) $p=0.047$. Interleukin 3. Interleucina 3.

Estudios previos mostraban: La inflamación eosinofílica, considerada característica de asma, a diferencia de la linfocito-TCD8+ con macrófagos y neutrófilos de la EPOC, está, no obstante, presente en el 20-40% de los esputos inducidos de pacientes con EPOC estable, y aumenta mucho más con las agudizaciones. En estas exacerbaciones, es resistente a corticoides inhalados pero responde a los sistémicos. Las interleucinas 3 y 5 y el factor estimulador de colonias granulocito-macrofágicas (granulocyte-monocyte colony-stimulating factor (GM-CSF)) ayudan a la liberación de los eosinófilos de la médula ósea. Las IL4 y 13 a su adhesión vascular, y la eotaxina liberada en los pulmones activa los receptores CXCR3 de los eosinófilos atrayéndolos al pulmón.

9. **EGF** (47 genes) $p=0.048$. Epithelial growth factor. Factor de crecimiento epitelial. Estudios previos mostraban: El receptor del factor de crecimiento epitelial puede jugar un papel importante en la reparación de epitelio bronquial, y en la hipersecreción bronquial, asociado al de las proteasas de los neutrófilos al respecto.

10. **MPR** (32 genes) $p=0.48$. Metaloprotease receptors. Receptores de las metaloproteasas. Estudios previos mostraban: La metaloproteasa 12 de matriz o matrix metaloprotease 12 (MMP-12) juega un papel consistente en el desarrollo de enfisema y de remodelado de la pequeña vía aérea en modelos experimentales de ratones expuestos al humo de tabaco, liberando TNF- α e IL8 de las células epiteliales, tras activación de EGFR y MAPK (ERK1/2). A su vez TNF-a, IL-1b, taquicinas, trombina, plasmina, surfactante D, la disminución de la NADPH oxidasa o del TGF-b1, aumentan MMP-12 favoreciendo la formación de enfisema. El aumento de MMP-1 por activación MAPK (ERK1) y AP-1 epitelial de la vía aérea y alveolar, también favorece la formación de enfisema. MMP-9 y también 2, 8 y 13 tienen su papel en la formación de enfisema. MMP-1,2 y 9 se han asociado con el remodelado bronquial de pequeña vía aérea y de la pared vascular, contribuyendo al desarrollo de hipertensión pulmonar. MMP-9 estimula EGFR para la hipersecreción mucosa induciendo la expresión de mucina 5AC por activación TGF- β .

11. **SPPA** (36 genes) $p=0.047$. Surfactant A. Surfactante A. Estudios previos mostraban:

Polimorfismos surfactante A y D causaban disminución de sus niveles en lavados broncoalveolares de pacientes con EPOC. Son colectinas de defensa alveolar disminuídas lo que favorece la colonización bacteriana en la EPOC. La disminución de los niveles de surfactante A se han asociado con caída del FEV1.

12. **PYK2** (60 genes) $p=0.049$. Estudios previos mostraban: Conexión entre los receptores de membrana acoplados a proteína G con el sistema de transmisión intracelular de señal y activación MAP kinasa.

13. **IGF1** (51 genes) $p=0.047$. Insulin growth factor 1. Factor de crecimiento dependiente de insulina 1. Estudios previos mostraban: En las exacerbaciones de EPOC se observa pérdida de fuerza muscular esquelética, que se ha visto relacionada con mayores niveles circulantes de IL-8 y de IGF1. En nuestros pacientes el factor cáncer es un sesgo de confusión con la EPOC y el humo de tabaco.

14. **IL5 UP** (42 genes) $p=0.047$. Interleukin 5. Interleucina 5. Estudios previos mostraban: En las agudizaciones de la EPOC y en algunos EPOC multirreingreadores las interleucinas 3 y 5 y el factor estimulador de colonias granulocito-macrofágicas (granulocyte-monocyte colony-stimulating factor (GM-CSF)) pueden ayudar a la liberación de los eosinófilos de la médula ósea.

15. **INSULIN** (41 genes) $p=0.047$. Insulin. Insulina. Estudios previos mostraban: La EPOC se ha relacionado con mayor resistencia a la insulina, posiblemente en relación con la inflamación sistémica subyacente. Parece incrementado aún más en el subgrupo de EPOC con obesidad y en un subgrupo de los multirreingresadores con hipersecreción bronquial, relacionándose con los niveles en sangre de IL6 y TNF- α .

16. **TPO** (43 genes) $p=0.047$. Trombopoietina. Estudios previos mostraban: Algunos biomarcadores de la inflamación sistémica plasmática secundaria a la EPOC se han relacionado de forma significativa con la misma (Cerberus 1, Growth Hormone R, IL-1F6, IL-17B R, IL-17D, IL-19, Lymphotoxin beta, MMP-10, Thrombopoietin y TLR4). La trombopoietina es uno de ellos. Trombogénesis. Inflamación sistémica de la EPOC. Osteoporosis.

17. **SPRY** (34 genes) $p=0.047$. Estudios previos mostraban: La vía molecular Sprouty 2 está infraexpresada en el cáncer de pulmón no microcítico.

18. **AT1R** (59 genes) $p=0.048$. Alfa 1 antitrypsin receptor. Receptor del alfa-1 antitripsina. Estudios previos mostraban: La antitripsina codificada por el gen SERPINA1, asociado a EPOC y a enfisema, es una antiproteasa. La mutación homocigota ZZ para el déficit de alfa-1 antitripsina es la que presenta una asociación más fuerte con el enfisema, que se agrava de forma exponencial con el tabaco. No obstante se calcula que sólo < del 1% de los pacientes con EPOC tienen algún grado de mutación para el alfa 1 antitripsina, y que en su mayoría son heterocigóticos. Confiere característicamente enfisema panlobar de predominio en lóbulos inferiores pulmonares.

19. **NO1** (42 genes) $p=0.047$. Nitric oxide 1. Óxido nítrico 1. Estudios previos mostraban: La expresión de los isozimas de la sintetasa de óxido nítrico inducible (iNOS) está aumentada en la EPOC.
20. **EPO** (51 genes) $p=0.047$. Erythropoietin. Eritropoyetina. Estudios previos mostraban: Reducción de hemoglobina con aumento de eritropoyetina en las agudizaciones de la EPOC, aunque con algún estudio contrapuesto con reducción en ellas de la eritropoyetina.
21. **CXCR4** (52 genes) $p=0.047$. CXC receptor 4. Receptor CXC 4. Linfocitos T.
22. **NFAT** (60 genes) $p=0.047$. Neural fat acids.
23. **NGF** (43 genes) $p=0.047$. Neural growth factor. Factor de crecimiento de neuronas.
24. **IL2** (41 genes) $p=0.047$. Interleukin 2. Interleucina 2. Presentación cruzada de antígenos por células dendríticas a nivel subepitelial a linfocitos T CD4+ y CD8+ según mecanismo de histocompatibilidad para la estimulación de la inflamación Th1 con proliferación T CD8+ en la EPOC.
25. **IGF1R** (51 genes) $p=0.047$. Insulin growth factor receptor 1.
26. **INTEGRIN** (66 genes) $p=0.047$. Integrin. Integrina. Matriz celular.
27. **MCALPAIN** (35 genes) $p=0.047$. M calpain. Calpaína M. La inhibición por el humo del tabaco de la calpaína (una proteinasa intracelular dependiente de calcio) inhibe la estimulación de la angiogénesis por las células endoteliales en la EPOC contribuyendo a un remodelado estructural alterado.
28. **ETS** (26 genes) $p=0.048$.
29. **MAPK** (36 genes) $p=0.047$. MAP kinases. MAP kinasas. Transducción de señal intracitoplásmica para la proliferación celular y quimiotaxis (por ejemplo en la expresión de NFkB y de IL-8 mediante ERK 1/2, p38 y JNK).
30. **HBX-HCC-DN** (34 genes) $p=0.048$.
31. **HDAC1-COLON-SUL16HRS-DN** (28 genes) $p=0.047$. Colon cancer SUL16 down.
32. **HDAC1-COLON-CLUSTER9** (41 genes) $p=0.048$. Colon cancer cluster 9. Cáncer de colon clase 9.

33. **TNFA** (28 genes) p=0.048. Tumor necrosis factor alfa (TNF-a).

34. **KO-WT-UP** (6 genes) p=0.048. Knocked out (KO) wild type (WT) increased.

35. **HBX-N-UP** (24 genes) p=0.048

36. **IFNA** (43 genes) p=0.047. Interferon alfa.

37. **VEGF** (79 genes) p=0.048. Vascular-endothelial growth factor. Factor de crecimiento vasculoendotelial. Receptores de VEGF (VEGF Flt-1 ó VEGFR1 y KDR/Flt-1 ó VEGFR2) en células epiteliales, macrófagos y células del músculo liso vascular y de la vía aérea en EPOC. Protección contra el enfisema.

La inhibición de VEGFR2 provoca enfisema en ratas. En la vía aérea periférica favorece la hipersecreción bronquial, la permeabilidad endotelial y la inflamación. Protección contra la hipertensión pulmonar. Remodelado y fibrosis peribronquial junto con TGF-β. Regeneración de la barrera epitelial. Fagocitosis de cuerpos apoptóticos alveolares por los macrófagos.

38. **TIGH JUNCTION** (95 genes) p=0.047. Tigh junction. Uniones estrechas intercelulares. Destrucción de las uniones estrechas (tigh junctions) de la parte apicolateral de las células epiteliales bronquiales que pierden proteínas en la EPOC, disminuyendo la zónula ocludens 1 y 2, aumentando la permeabilidad de la barrera epitelial y disminuyendo la resistencia eléctrica transepitelial. TGF-β1 protege y regenera estas uniones estrechas. La disrupción de las uniones estrechas permite a los virus ganar acceso a receptores laterales de membrana, favoreciendo sobreinfecciones posteriores bacterianas y acelera la muerte celular epitelial. Las infecciones por ciertas bacterias y sus factores de virulencia pueden atacar las proteínas de estas uniones estrechas. El desequilibrio proteasas-antiproteasas con aumento de la metaloproteasa 9 (MMP-9) respecto al inhibidor de metaloproteasa 1 (TIMP-1), así como el desequilibrio oxidante-antioxidante y ciertas citoquinas proinflamatorias también favorecen su destrucción en la EPOC. Factores de crecimiento vasculoendotelial (VEGF) y epitelial (EGF) tienen un papel fundamental en la regeneración de la integridad epitelial y de estas uniones , y con ello de la barrera epitelial.

39. **GAP JUNCTION** (65 genes) p=0.048

40. **LONG TERM POTENTIATION** (51 genes) p=0.047

41. **LONG TERM POTENTIATION** (55 genes) p=0.047

42. **MELANOSIS** (92 genes) p=0.047

43. **ENDOMETRIAL CANCER** (91 genes) p=0.049

44. **THYROID CANCER** (56 genes) p=0.047

45. **BLADDER CANCER** (65 genes) p=0.047

46. **NON SMALL CELL LUNG CANCER** (91 genes) p=0.049

Dichas vías moleculares se podrían clasificar en distintos grupos:

Las que forman parte de la **estructura de transmisión de la señal**: Actualmente representan el futuro más inmediato y prometedor en el desarrollo de nuevos fármacos en la EPOC. Se trata de redes estructurales con puntos estratégicos que son diana en distintas células inflamatorias.

-Las vías moleculares de los **receptores CXCR 3 y 4**.

-Las vías moleculares de los **receptores acoplados a proteínas G**. Dichas vías moleculares de estos receptores se repiten en distintas células inflamatorias activando funciones específicas complejas, convirtiéndose en dianas terapéuticas.

-Las vías moleculares de transducción de señal intracelular por fosforilación de proteínas intracelulares por el sistema de las **MAP kinasas (ERK 1 / 2, p35 y JNK)** son responsables de la activación proinflamatoria de NFκB y proliferativa celular.

Así por ejemplo los receptores CXCR3 y CXCR4 se encuentran en los linfocitos T, siendo, especialmente CXCR3 responsable de la activación de la respuesta Th1/Tc1 y del acúmulo de linfocitos T CD8+ citotóxicos en la vía aérea.

Favorecen fundamentalmente la proliferación celular y la quimiotaxis o atracción de células, en este caso a la vía aérea. También están presentes en el músculo liso favoreciendo la hiperreactividad bronquial y la hiperplasia del mismo mediante la migración de células musculares; en el epitelio bronquial, favoreciendo la hipersecreción bronquial; y de forma característica en los eosinófilos, con papel más destacado en las agudizaciones de la EPOC y en el EPOC multirreingresador.

Vías moleculares con expresión diferencial en tejido pulmonar de pacientes EPOC

Nº Vía molecular	Nº de genes sobreexpresados	P	Función principal	Células (y secreción)	Estímulos
A) Receptores de membrana					
1. CXCR3	33	0.047	Quimiotaxis	Eosinófilos (IL4, IL5, IL13: asma) Linfocitos Th1/TC1	CXCL11(I-TAC), RANTES
			Prolif/Migración	Músculo liso Células epitelio	
			Prolif/Migración	- bronquial - alveolar	
2. CXCR4	52	0.047	Quimiotaxis	Linfocitos T CD8	SDF1(CXCL12) (IFN γ , IL8, IL1b)
3. GPCR	45	0.047	Contracción músc.	bronquial/secr. glandular	
4. CDK5	30	0.047	Apoptosis	Endotelio	
B) Sistemas de transducción de señal					
5. MAPK	36	0.047	Fosforilación		
6. Ras	68	0.047	Apoptosis. Secreción mucosa		
7. SPRY?	34	0.047	Cáncer no microcítico pulmón		
8. PYK2?	60	0.049	Conexión GPCR y MAPK		
C) Reparación celular					
c1) Factores de crecimiento					
9. EGF	47	0.048	Reepitelización. Secreción mucosa.		
10. PDGF	46	0.047	Angiogénesis. Fibrosis.		
11. VEGF	79	0.048	Angiogénesis. Fibrosis. Enfisema.		
12. TGFB	45	0.047	Fibrosis.		
13. EPO	51	0.047	Hematopoiesis. Poliglobulia.		
14. TPO	43	0.047	Trombogénesis. Biomarcador inflam. sistémica		
15. GLEEVEC	45	0.047	Fibrosis		
16. NO1	42	0.047	Hipertensión pulmonar. Vasodilatación.		
c2) Citoesqueleto					
17. TIGH junctions	95	0.047	Estructura y sostén intercelular.		
18. GAP junctions	65	0.048	Comunicación intercelular		
19. INTEGRIN	66	0.047			

Vías moleculares con expresión diferencial en tejido pulmonar de pacientes EPOC

Nº	Vía molecular	Nº de genes sobreexpresados	P	Función principal	Células (y secreción)	Estímulos
c3) Interleuquinas						
20.	IL2					
21.	IL3					
22.	IL5					
23.	TNFa					
24.	IFNa					
D) Antiproteasas/proteasas						
25.	ATR1					
26.	ECM					
27.	MCALPAIN					
28.	MPR					
29.	ETS					
E) Defensinas						
30.	SPPA					
F) Afectación sistémica						
31.	IGF1					
32.	INSULIN					
33.	NFAT					
34.	NGF					
G) Cáncer						
35.	HDACI-COLON-SUL16HRS-DN (28)		0.047			
36.	HDACI-COLON-CLUSTER9 (41)		0.048			
37.	TNFA (28)		0.048			
38.	KO-WT-UP (6)		0.048			
39.	HBX-N-UP (24)		0.048			
40.	HBX-HCC-DN (34)		0.048			
41.	MELANOSIS (92)		0.047			
42.	ENDOMETRIAL CANCER (91)		0.049			
43.	THYROID CANCER (56)		0.047			
44.	BLADDER CANCER (65)		0.047			
45.	NON SMALL CELL LUNG CANCER (91)		0.049			
46.	LONG TERM POTENTIATION (51)		0.047			
46.	LONG TERM POTENTIATION (55)		0.047			

6.2. Análisis de la expresión génica diferencial “gen a gen”

Se compararon EPOC (cS+cX) vs no EPOC (hS+hX+hN), atendiendo a cociente postbroncodilatador FEv1/FVC < 0.7:

Se encontraron **34 genes sobreexpresados (p<0.1)** sin llegar a la significación estadística.

Había un posible **sesgo de sexo** al ser el grupo de EPOC (cX+cS) predominantemente de **varones (21 hombres y 3 mujeres)**, mientras que el de no EPOC (hS+hX+hN) estaba más equilibrado al respecto (**22 varones y 15 mujeres**), sin un efecto aditivo que no se puede tratar y que luego se estudiará.

Estos fueron los **34 genes expresados diferencialmente (p<0.1) en los pacientes EPOC:**

3.2.6.1. A_23_P37736.UNIQUE.11816; Log Fc: 2.07;

T= 5.3; adjust p=0.078; A_23_P37736; **TNFRSF17; NM_001192; tumor necrosis factor receptor superfamily member 17**; "Homo sapiens tumor necrosis factor receptor superfamily, member 17 (TNFRSF17), mRNA [NM_001192]";

Cromosoma: **chr16**; Inicio Cromosoma: 11969269; Fin Cromosoma: 11969328;

Citobanda 1: **16p13.1**; Citobanda 2: **16p13.13**; Chromosome strand: +; Unigene

1:Hs.2556; Unigene 2: Hs.2556; Ensemble 1: ENSG00000048462; Ensemble 2:

ENST00000053243; GO1: **signal transduction, immune response, multicellular**

organismal development, biological_process, cell proliferation, plasma membrane, integral to membrane, cellular_component, endomembrane system, protein binding, molecular_function, receptor activity;

GO biological process: GO:0006955 (**immune response**); GO:0007165 (**signal transduction**); GO:0007275 (**multicellular organismal**); GO molecular function:

GO:0003674 (**molecular_function**); GO:0004872 (**receptor activity**);

GO:0005515 (**protein binding**); GO cellular component: GO:0005575

(**cellular_component**); GO:0005886 (**plasma membrane**); GO:0016021

(**integral to membrane**).

3.2.6.2. A_23_P38712.UNIQUE.32173; Log Fc: 1.76; t=5.1; adjust p = 0.078;

A_23_P38712; **ADCYAP1; Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide**

precursor (PACAP) [Contains: PACAP-related peptide (PRP-48); Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide 27 (PACAP-27) (PACAP27); Pituitary

adenylate cyclase-activating polypeptide 38...; Cromosoma: **chr18**; Inicio

cromosoma: 900632; Fin cromosoma: 900691; Citobanda 2: **18p11.32**;

Chromosome strand: +; Ensemble 2: ENST00000269200; GO:0007190 (**adenylate**

cyclase activation); GO:0007267 (**cell-cell signaling**); GO:0007565 (**pregnancy**); GO:0045786 (**negative regulation of progression through cell cycle**); GO biological process: GO:0005179 (**hormone activity**); GO molecular function: GO:0005184 (**neuropeptide hormone activity**); GO cellular component: GO:0005576 (**extracellular region**); GO:0005625 (**soluble fraction**).

3.2.6.3. A_24_P127192.UNIQUE.9983; Log Fc: -0.72; t= -5.0; adjust p= 0.078; A_24_P127192; **LOC646936**; **LOC646936**; Gene bank accession 1: XR_019420; Gene bank accesión 2: XR_019420; **similar to ribeye**; "PREDICTED: Homo sapiens similar to C-terminal binding protein 2 isoform 2 (LOC646936), mRNA [XR_019420]"; Cromosoma: **chr2**; Inicio cromosoma: 48996169; Fin cromosoma: 48996228; Chromosome strand: -; Citobanda 1: **2p16.3**; Citobanda 2: **2p16.3**; Cromosoma: **chr2**; Unigene 1: Hs.646817; Unigene 2: Hs.646817; GO biological process: GO:0007190 (**adenylate cyclase activation**); GO:0007267(**cell-cell signaling**); GO:0007565 (**pregnancy**); GO:0045786 (**negative regulation of progression through cell cycle**); GO molecular function: GO:0005179 (**hormone activity**); GO:0005184 (**neuropeptide hormone activity**); GO cellular component: GO:0005576 (**extracellular region**); GO:0005625 (**soluble fraction**).

3.2.6.4. A_24_P104980.UNIQUE.23266; Log Fc: 1.19; t=5; adjust p= 0.078; A_24_P104980; **IGL@**; 9 gene symbol identical entries; **AJ319669**; Gene bank accessions 1 y 2: AJ319669; **immunoglobulin lambda locus**; "Homo sapiens **germline mRNA for immunoglobulin lambda-2 chain constant region, Daudi cell line. [AJ319669]**"; Cromosoma: **chr22**; Citobanda 1: **22q11.1-q11.2**; Citobanda 2: **22q11.22**; Inicio Cromosoma: 21573559; Fin cromosoma: 21573617; Chromosome strand: +; Unigene 1: c("Hs.449585", "Hs.561078"); Uni Gene 2: Hs.449585; **extracellular region, NA**.

3.2.6.5. A_32_P32061.UNIQUE.13644; Log Fc 1.08; t=5; adjust p=0.078; A_32_P32061; **C2orf27**; 2 Gene Symbol Identical Entries; **C2orf27**; NM_013310; NM_013310; **chromosome 2 open reading frame 27**; "Homo sapiens chromosome 2 open reading frame 27 (C2orf27), mRNA [NM_013310]"; Cromosoma: **chr2**; Citobanda 1: **2q21.1-q21.2**; Citobanda 2: **2q21.1**; Inicio Cromosoma: 132196547; Fin Cromosoma: 132196547; Chromosome strand: +; Unigene 1: c("Hs.635289", "Hs.655680"); Unigene 2: Hs.655680; Ensemble 1: ENSG00000197927; Ensemble 2: ENST00000379939.

3.2.6.6. A_23_P43979.UNIQUE.17503; LogFc 1.42; t=4.8; adjust p=0.085; A_23_P43979; **IGL@**; 9 gene symbol identical entries; **M87790**; Gene bank accession 1 & 2: M87790; **immunoglobulin lambda locus**; "Human (hybridoma H210) anti-

hepatitis A immunoglobulin lambda chain variable region, constant region, complementarity-determining regions mRNA, complete cds. [M87790]"; Citobanda 1: **22q11.1-q11.2**; Citobanda 2: **22q11.22**; Cromosoma: **chr22**; Inicio cromosoma: 21573548; Fin cromosoma: 21573605; Chromosome strand: +; Unigene 1: c("Hs.449585", "Hs.561078"); Unigene 2: Hs.449585; GO1: **extracellular region, NA**.

3.2.6.7. A_32_P200144.UNIQUE.32793; Log Fc: 1.60; t=4.8; adjust p=0.085; A_32_P200144; **IGH@**; 2 gene identical entries; **IGH@**; Gene bank accessions 1 & 2: AK130614; **immunoglobulin heavy locus**; "Homo sapiens **cDNA FLJ27104 fis, clone SPL04981, highly similar to Ig gamma-2 chain C region. [AK130614]**"; Citobanda 1: **14q32.33**; Citobanda 2: **14q32.33**; Cromosoma: **chr14**; Inicio Cromosoma: 105278751; Fin Cromosoma: 105278810; Chromosome strand: -; Unigene 1 & 2: Hs.510635.

3.2.6.8. A_24_P241996.UNIQUE.9809; LogFc 1.21; t=4.8; adjust p=0.085; A_24_P241996; **AY043127**; Gene bank accession 1: AM181370; Gene bank accession 2: AY043127; "Homo sapiens **MCLL063 immunoglobulin light chain variable region mRNA, partial cds. [AY043127]**"; Citobanda 2: **22q11.22**; Cromosoma: **chr22**; Inicio cromosoma: 20899393; Fin cromosoma: 20899452; Chromosome strand: +; Unigene 2: Hs.572894.

3.2.6.9. A_23_P6362.UNIQUE.32901; Log Fc: 1.87; t=4.7; adjust p=0.085; A_23_P6362; **DERL3**; 2 gene identical entries; **DERL3**; Gene bank accesión 1 & 2: NM_198440; **Der1-like domain family, member 3**; "Homo sapiens **Der1-like domain family, member 3 (DERL3), transcript variant 1, mRNA [NM_198440]**"; Citobanda 1: **22q11.23**; Citobanda 2: **22q11.23**; Cromosoma: **chr22**; Inicio cromosoma: 22508981; Fin cromosoma: 22508981; Chromosome strand: -; Unigene 1 & 2: Hs.593679; Ensemble 1: ENSG00000099958; **ER-associated protein catabolic process, endoplasmic reticulum unfolded protein response, membrane, integral to membrane, endoplasmic reticulum, endoplasmic reticulum membrane, integral to endoplasmic reticulum membrane, protein binding**; GO:0030433 (**ER-associated protein catabolic process**); GO:0030968 (**unfolded protein response**); GO:0005515 (**protein binding**); GO:0005783 (**endoplasmic reticulum**); GO:0016020 (**membrane**); GO:0016021 (**integral to membrane**); GO:0030176 (**integral to endoplasmic reticulum membrane**).

3.2.6.10. A_24_P564576.UNIQUE.16775; Log Fc: 0.90; t=4.7 ; adjust p=0.085; A_24_P564576; **FAM148B**; 1 gene identical entries; **NLF2**; Gene bank accesión 1 & 2: NM_001007595; **family with sequence similarity 148, member B**; "Homo

sapiens **nuclear localized factor 2 (NLF2)**, mRNA [NM_001007595]"; Citobanda 1: 15q22.2; Citobanda 2: 15q22.2; Cromosoma: **Chr15**; Inicio cromosoma: 60244390; Fin cromosoma: 60244449; Chromosome strand: +; Unigene 1 & 2: Hs.144372; Ensemble 1: ENSG00000205502; Ensemble 2: ENST00000380392; GO1: **nucleus, NA**.

3.2.6.11. A_24_P605563.UNIQUE.28301; Log Fc: 1.92; t=4.6; adjust p=0.085; A_24_P605563; **IGL@**; 9 gene identical entries; **AY172962**; Gene bank accession 1 & 2: AY172962; AY172962; **immunoglobulin lambda locus**; "Homo sapiens anti-rabies SOJB **immunoglobulin lambda light chain** mRNA, complete cds. [**AY172962**]"; Citobanda 1: 22q11.1-q11.2; Citobanda 2: 22q11.22; Cromosoma: **chr22**; Inicio cromosoma: 21578642; Fin cromosoma: 21578701; Chromosome strand: +; Unigene 1: c("Hs.449585", "Hs.561078"); Unigene 2: Hs.449585; Ensemble 2: ENST00000390323; GO1: **extracellular region, NA**.

3.2.6.12. A_23_P434040.UNIQUE.7036; Log Fc: -0.75; t=-4.6; adjust p=0.085; A_23_P434040; **LOC554206**; Gene bank accession 1: LOC554206; Gene bank accession 2: BC029609; **BC029609**; hypothetical LOC554206; "Homo sapiens hypothetical LOC554206, mRNA (cDNA clone IMAGE:5302675). [BC029609]"; Citobandas 1 & 2: 16p12.1; Cromosoma: **chr16**; Inicio cromosoma: 24951211; Fin cromosoma: 24951270; Chromosome strand: +; Unigene 1 & 2: Hs.552959; Ensemble 2: ENST00000329698.

3.2.6.13. A_24_P318990.UNIQUE.19186; Log Fc: 1.75; t=4.6; adjust p=0.085; A_24_P318990; **IGL@**; 9 gene identical entries; Gene bank accesión 1 & 2: BC012876; **BC012876**; **immunoglobulin lambda locus**; "Homo sapiens cDNA clone MGC:17259 IMAGE:4149333, complete cds. [**BC012876**]"; Citobanda 1: **22q11.1-q11.2**; Citobanda 2: **22q11.22**; Cromosoma: **chr22**; Inicio cromosoma: 21094520; Fin cromosoma: 21094579; Chromosome strand: +; Unigene 1: c("Hs.449585", "Hs.561078"); Unigene 2: Hs.449585; Ensemble 2: ENST00000390291; GO1: **extracellular region, NA**.

3.2.6.14. A_23_P102351.UNIQUE.28024; Log Fc: -0.66; t=-4.6; adjusted p= 0.085; A_23_P102351; **CHST10**; Gene bank accesión 1: CHST10; Gene bank accesión 2: NM_004854; **NM_004854**; **carbohydrate sulfotransferase 10**; "Homo sapiens carbohydrate sulfotransferase 10 (CHST10), mRNA [NM_004854]"; Citobanda 1: **2q11.2**; Citobanda 2: **2q11.2**; Cromosoma: **chr2**; Inicio cromosoma:100375793; Fin cromosoma: 100375852; Chromosome strand: -; Unigenes 1 & 2: Hs.516370; Ensemble 1: ENSG00000115526; Ensemble 2: ENST00000264249; GO1: **cell adhesion, carbohydrate metabolic process, Golgi membrane, membrane,**

integral to membrane, membrane fraction, Golgi apparatus, sulfotransferase activity, transferase activity; GO biological process: GO:0005975 (**carbohydrate metabolic process**); GO:0007155 (**cell adhesion**); GO:0007612 (**learning**); GO:0007616 (**long-term memory**); GO molecular function: GO:0008146 (**sulfotransferase activity**); GO:0016740 (**transferase activity**); GO cellular component: GO:0008146 (**sulfotransferase activity**); GO:0016740 (**transferase activity**).

3.2.6.15. A_24_P239076.UNIQUE.8015; Log Fc: 0.83; t=4.6; adjust p=0.085; A_24_P239076; **IGLL3**; Gene bank accession 1: CTA-246H3.1; Gene bank accession 2: NM_001013618; **NM_001013618; immunoglobulin lambda-like polypeptide 3**; "Homo sapiens similar to omega protein (LOC91353), mRNA [NM_001013618]"; Citobanda 1: c("22q11.2", "22q11.23"); Citobanda 1: 22q11.23; Cromosoma: **Chr22**; Inicio cromosoma: 24045796; Fin cromosoma: 24045855; Chromosome strand: +; Unigenes 1 & 2: Hs.567636; Ensemble 1: ENSG00000206066; Ensemble 2: ENST00000382738.

3.2.6.16. A_23_P435390.UNIQUE.13941; Log Fc: 2.01; t=4.6; adjusted p=0.085; **A_23_P435390**; A_23_P435390; Inicio y fin cromosoma: NA.

3.2.6.17. A_24_P76868.UNIQUE.12578; Log Fc:1.96; t=4.5; adjusted p=0.085; **A_24_P76868**; Gene bank accession 1 & 2: X01147; **X01147**; Human mRNA for **immunoglobulin lambda variable region corresponding to NEW protein of V lambda subgroup I. [X01147]**; Citobanda 2: **22q11.22**; Cromosoma : **Chr22**; Inicio cromosoma: 21007250; Fin cromosoma: 21007309; Chromosome strand: +; Unigene 2: Hs.654512.

3.2.6.18. A_24_P83102.UNIQUE.12187; Log Fc:1.81; t=4.5; adjusted p=0.085; A_24_P83102; **IGLL1**; 2 gene identical entries; Gene bank accession 1: IGLL1; Gene bank accession 2: NM_020070; **NM_020070; immunoglobulin lambda-like polypeptide 1**; "Homo sapiens immunoglobulin lambda-like polypeptide 1 (IGLL1), transcript variant 1, mRNA [NM_020070]"; Citobanda 1: **22q11.23**; Citobanda 2: **22q11.23**; Cromosoma: **chr22**; Inicio cromosoma: 22245659; Fin cromosoma: 22245718; Chromosome strand: -; Unigenes 1 & 2: Hs.348935; Ensemble 1: ENSG00000128322; Ensemble 2: ENST00000330377; GO1: **immune response, membrane, extracellular region**; GO biological function: GO:0006955(immune response); GO cellular component: GO:0016020(membrane).

3.2.6.19. A_24_P510357.UNIQUE.7544; Log Fc: 1.91; t=4.5; adjusted p=0.085; A_24_P510357; **CKAP2**; 2 gene identical entries; Gene bank accession 1:

ENST00000390312; Gene bank accession 2: S76132; **S76132; cytoskeleton associated protein 2; Immunoglobulin Lambda light chain V gene segment** [Source:IMGT/GENE_DB; Acc:IGLV2-14] [ENST00000390312]; Citobanda 1: 13q14; Citobanda 2: 13q14; Cromosoma: **chr13**; Inicio cromosoma: 21431631; Fin cromosoma: 21431690; Chromosome strand: +; Unigene 1: c("Hs.444028", "Hs.706579", "Hs.711762"); Unigene 2: Hs.449585; Ensemble 1: ENSG00000136108; Ensemble 2: ENST00000390312; GO1: **apoptosis, cell cycle, cytoplasm, microtubule.**

3.2.6.20. A_24_P160202.UNIQUE.1803; Log Fc: 0.78; t=4.4; adjusted p=0.1; A_24_P160202; **PANX2**; 2 gene identical entries; Gene bank accession 1: PANX2; Gene bank accession 2: NM_052839; **NM_052839; pannexin 2**; "Homo sapiens pannexin 2 (PANX2), mRNA [NM_052839]"; Citobanda 1: **22q13.33**; Citobanda 2: **22q13.33**; Cromosoma: **chr22**; Inicio cromosoma: 48958569; Fin cromosoma: 48958628; Chromosome strand: +; Unigenes 1 & 2: Hs.440092; Ensemble 1: ENSG00000073150; Ensemble 2: ENST00000159647; GO1: **plasma membrane, integral to membrane, gap junction, cell junction**; GO cellular component: GO:0005921(gap junction);GO:0016020(membrane);GO:0016021(integral to membrane).

3.2.6.21. A_24_P472081.UNIQUE.20776; Log Fc 1.84; t=4.4; adjusted p=0.1; **A_24_P472081**; Gene bank accession 1: **ENST00000390294; Immunoglobulin Lambda light chain V gene segment** [Source:IMGT/GENE_DB; Acc:IGLV1-47] [ENST00000390294]; Citobanda 2: **22q11.22**; Cromosoma: **chr22**; Inicio cromosoma: 21042416; Fin cromosoma: 21042475; Chromosome strand: +; Unigene 2: Hs.655198; Ensemble 2: ENST00000390294.

3.2.6.22. A_23_P218807.UNIQUE.13939; Log Fc: 1.09; t=4.4; adjusted p=0.1; **A_23_P218807; ZC3H7B**; 2 gene identical entries; Gene bank accesión 1: ZC3H7B; Gene bank accesión 2: NM_017590; **NM_017590; zinc finger CCCH-type containing 7B**; "Homo sapiens **zinc finger CCCH-type containing 7B (ZC3H7B)**, mRNA [NM_017590]"; Citobanda 1: **22q13.2**; Citobanda 2: **22q13.2**; Cromosoma: **chr22**; Inicio cromosoma: 40085903; Fin cromosoma: 40085962; Chromosome strand:+; Unigenes 1 & 2: Hs.592188; Ensemble 1: ENSG00000100403; Ensemble 2: ENST00000352645; GO1: **intracellular, nucleus, protein binding, nucleic acid binding, metal ion binding, zinc ion binding**; GO molecular function: GO:0003676 (**nucleic acid binding**); GO:0008270 (**zinc ion binding**); GO:0046872 (**metal ion binding**); GO cellular component: GO:0005622 (**intracellular**); GO:0005634 (**nucleus**).

3.2.6.23. A_23_P37910.UNIQUE.26810; Log Fc: -0.58; t=-4.4; adjusted p=0.1;
A_23_P37910; 10 gene identical entries; Gene bank accession 1: **MAPK3**; Gene bank accession 2: NM_002746; **NM_002746**; mitogen-activated protein kinase 3; "Homo sapiens **mitogen-activated protein kinase 3 (MAPK3), transcript variant 1**, mRNA [NM_002746]"; Citobanda 1: **16p11.2**; Citobanda 2: **16p11.2**; Cromosoma: **chr16**; Inicio cromosoma: 30035738; Fin cromosoma: 30035797; Chromosome strand: -; Unigene 1 & 2: Hs.861; Ensemble 1: ENSG00000102882; Ensemble 2: ENST00000263025; GO1: **protein amino acid phosphorylation, cell cycle, Ras protein signal transduction, interspecies interaction between organisms, cytosol, cellular_component, nucleoplasm, nucleotide binding, protein binding, protein kinase activity, protein serine/threonine kinase activity, MAP kinase activity**; GO biological process: GO:0000074 (**regulation of progression through cell cycle**); GO:0006468 (**protein amino acid phosphorylation**); GO:0007049 (**cell cycle**); GO:0000166 (**nucleotide binding**); GO:0004672 (**protein kinase activity**); GO:0004674 (**protein serine/threonine kinase activity**); GO:0004707 (**MAP kinase activity**); GO:0005515 (**protein binding**); GO:0005524 (**ATP binding**); GO:0016740 (**transferase activity**); GO cellular component: GO:0005575 (**cellular_component**).

3.2.6.24. A_24_P267814.UNIQUE.4204; Log Fc: 1.46; t=4.4; adjusted p=0.1;
A_24_P267814; Gene bank accession 1: **ARPC1B**; Gene bank accession 2: BI521983; **BI521983**; "603081610T1 NIH_MGC_120 Homo sapiens **cDNA clone IMAGE:5220795 3'**, mRNA sequence [BI521983]"; Citobanda 2: **22q11.22**; Cromosoma: **chr22**; Inicio cromosoma: 21573194; Fin cromosoma: 21573253; Chromosome strand: -; Unigene 2: Hs.449574; GO biological process: GO:0006928 (**cell motility**); GO:0007155 (**cell adhesion**); GO molecular function: GO:0005200 (**structural constituent of cytoskeleton**); GO:0005515 (**protein binding**); GO cellular component: GO:0005885 (**Arp2/3 protein complex**); GO:0016020 (**membrane**).

3.2.6.25. A_23_P401472.UNIQUE.15793; Log Fc: -1.03; t=-4.4; adjusted p=0.1;
A_23_P401472; **CHRM3**; 2 gene identical entries; Gene bank accession 1: CHRM3; Gene bank accesión 2: NM_000740; NM_000740; **cholinergic receptor, muscarinic 3**; Homo sapiens **cholinergic receptor, muscarinic 3 (CHRM3)**, mRNA [NM_000740]"; Citobanda 1: **1q43**; Citobanda 2: **1q43**; Cromosoma: **chr1**; Inicio cromosoma: 238138604; Fin cromosoma: 238138663; Chromosome strand: +; Unigene 1 & 2: Hs.7138; Ensemble 1: ENSG00000133019; Ensemble 2: ENST00000255380; GO 1: **signal transduction, protein modification process, G-protein coupled receptor protein signaling pathway, nervous system development, digestion, cell proliferation, positive regulation of smooth**

muscle contraction, plasma membrane, integral to plasma membrane, basolateral plasma membrane, cell junction, synapse, postsynaptic membrane, rhodopsin-like receptor activity, phosphoinositide phospholipase C activity, receptor activity, muscarinic acetylcholine receptor activity; GO biological process: GO:0006464 (protein modification process); GO:0006939 (smooth muscle contraction); GO:0007165 (signal transduction); GO:0007186 (G-protein coupled receptor protein signaling pathway); GO:0007399 (nervous system development); GO:0007586 (digestion); GO:0008150 (biological_process); GO:0008283 (cell proliferation); GO:0045987 (positive regulation of smooth muscle contraction); GO molecular function: GO:0001584 (rhodopsin-like receptor activity); GO:0004435 (phosphoinositide phospholipase C activity); GO:0004872 (receptor activity); GO:0004981 (muscarinic acetylcholine receptor activity); GO cellular component: GO:0005886 (plasma membrane); GO:0005887 (integral to plasma membrane); GO:0016021 (integral to membrane); GO:0045211 (postsynaptic membrane).

3.2.6.26. A_24_P25137.UNIQUE.9932; Log Fc: -0.85; t=-4.4; adjusted p=0.1; **A_24_P25137; CHR3**; 2 gene identical entries; Gene bank accession 1: CHR3; Gene bank accesión 2: NM_000740; NM_000740; **cholinergic receptor, muscarinic 3**; Homo sapiens **cholinergic receptor, muscarinic 3 (CHR3)**, mRNA [NM_000740]; Citobanda 1: **1q43**; Citobanda 2: **1q43**; Cromosoma: **chr1**; Inicio cromosoma: 238137704; Fin cromosoma: 238137763; Chromosome strand: +; Unigene 1 & 2: Hs.7138; Ensemble 1: ENSG00000133019; Ensemble 2: ENST00000255380; GO 1: **signal transduction, protein modification process, G-protein coupled receptor protein signaling pathway, nervous system development, digestion, cell proliferation, positive regulation of smooth muscle contraction, plasma membrane, integral to plasma membrane, basolateral plasma membrane, cell junction, synapse, postsynaptic membrane, rhodopsin-like receptor activity, phosphoinositide phospholipase C activity, receptor activity, muscarinic acetylcholine receptor activity; GO biological process: GO:0006464 (protein modification process); GO:0006939 (smooth muscle contraction); GO:0007165 (signal transduction); GO:0007186 (G-protein coupled receptor protein signaling pathway); GO:0007399 (nervous system development); GO:0007586 (digestion); GO:0008150 (biological_process); GO:0008283 (cell proliferation); GO:0045987 (positive regulation of smooth muscle contraction); GO molecular function: GO:0001584 (rhodopsin-like receptor activity); GO:0004435 (phosphoinositide phospholipase C activity); GO:0004872 (receptor activity); GO:0004981 (muscarinic acetylcholine receptor activity); GO cellular component: GO:0005886 (plasma membrane);**

GO:0005887 (**integral to plasma membrane**); GO:0016021 (**integral to membrane**); GO:0045211 (**postsynaptic membrane**).

3.2.6.27. A_23_P158817.UNIQUE.10652; Log Fc: 1.68; t=4.3; adjusted p=0.1; A_23_P158817; **IGH@**; 2 gene identical entries; Gene bank accession 1: IGH@; Gene bank accession 2: AK130614; **AK130614; immunoglobulin heavy locus**; "Homo sapiens cDNA **FLJ27104** fis, clone **SPL04981**, highly similar to **Ig gamma-2 chain C region. [AK130614]**"; Citobanda 1: **14q32.33**; Citobanda 2: **14q32.33**; Cromosoma: **chr14**; Inicio cromosoma: 105180588; Fin cromosoma: 105180647; Chromosome strand: +; Unigene 1 & 2: Hs.510635; Ensemble 2: ENST00000390549; GO cellular component: GO:0042612 (**MHC class I protein complex**).

3.2.6.28. A_23_P397320.UNIQUE.24127; Log F 1.66; t=4.3; adjusted p=0.1; **A_23_P397320; JSRP1**; Gene bank accesión 1: JSRP1; Gene bank accesión 2: NM_144616; **NM_144616; Junctional sarcoplasmic reticulum protein 1**; "Homo sapiens **junctional sarcoplasmic reticulum protein 1 (JSRP1)**, mRNA [NM_144616]"; Citobanda 1: **19p13.3**; Citobanda 2: **19p13.3**; Cromosoma: **chr19**; Inicio cromosoma: 2203556; Fin cromosoma: 2203615; Chromosome strand: -; Unigene 1: Hs.712901; Unigene 2: Hs.693971; Ensemble 1: ENSG00000167476; Ensemble 2: ENST00000300961; G01: **membrane, sarcoplasmic reticulum membrane**.

3.2.6.29. A_23_P72252.UNIQUE.4663; Log Fc: 2; t=4.3; adjusted p=0.1; A_23_P72252; **A_23_P72252**.

3.2.6.30. A_24_P519504; Log Fc: 2.19; t=4.3; adjusted p=0.1; **A_24_P519504; IGL@**; 9 gene identical entries; Gene bank accession 1: X57802; Gene bank accession 2: X57802; **X57802; immunoglobulin lambda locus**; Human rearranged **immunoglobulin lambda light chain** mRNA. [X57802]; Citobanda 1: **22q11.1-q11.2**; Citobanda 2: **22q11.22**; Cromosoma: **chr22**; Inicio cromosoma: 21553467; Fin cromosoma: 21553526; Chromosome strand: +; Unigene 1: c("Hs.449585", "Hs.561078"); Unigene 2: s.449585; Ensemble 2: ENST00000390319; G01: extracellular region, NA.

3.2.6.31. A_23_P389426.UNIQUE.751; Log Fc: -1; t=4.3; adjusted p=0.1; A_23_P389426; **MGC26597**; Gene bank accesión 1: MGC26597; Gene bank accesión 2: BC028580; **BC028580; PIP5K1A pseudogene**; "Homo sapiens **PIP5K1A pseudogene**, mRNA (cDNA clone **MGC:26597** IMAGE:4828163), complete cds. [BC028580]"; Citobanda 1: **6p24.3**; Citobanda 2: **6p24.3**; Cromosoma: **chr6**; Inicio

cromosoma: 7934953; Fin cromosoma: 7935012; Chromosome strand: +; Unigenes 1 & 2: Hs.676966.

3.2.6.32. A_23_P84596.UNIQUE.32123; Log Fc: 1.82; t=4.3 ; adjusted p=0.1; **MGC29506**; Gene bank accesión 1: MGC29506; Gene bank accession 2: NM_016459; **NM_016459; hypothetical protein MGC29506**; "Homo sapiens **hypothetical protein MGC29506 (MGC29506)**, mRNA [**NM_016459**]"; Citobanda 1: **5q23-q31**; Citobanda 2: **5q31.2**; Cromosoma: **chr5**; Inicio cromosoma: 138751442; Fin cromosoma: 138751501; Chromosome strand: -; Unigene 1 & 2: Hs.409563; GO1: **apoptosis, extracellular region, cytoplasm**; GO cellular component: GO:0005783 (**endoplasmic reticulum**).

3.2.6.33. A_24_P10657.UNIQUE.10491; Log Fc: -0.56; t=4.3; adjusted p=0.1; A_24_P10657; **SLC44A2**; 2 gene identical entries; Gene bank accesión 1: SLC44A2; Gene bank accession 2: NM_020428; **NM_020428; solute carrier family 44, member 2**; "Homo sapiens **solute carrier family 44, member 2 (SLC44A2)**, mRNA [**NM_020428**]"; Citobanda 1: **19p13.1**; Citobanda 2: **19p13.2**; Cromosoma: **chr19**; Inicio cromosoma: 10615558; Fin cromosoma: 10615617; Chromosome strand: +; Unigenes 1 & 2: Hs.631631; Ensemble 1: ENSG00000129353; Ensemble 2: ENST00000335757; GO1: **transport, choline transport, positive regulation of I-kappaB kinase/NF-kappaB cascade, membrane, integral to membrane, signal transducer activity, choline transmembrane transporter activity**; GO biological process: GO:0006810 (**transport**); GO:0015871(**choline transport**); GO:0043123 (**positive regulation of I-kappaB kinase/NF-kappaB cascade**); GO molecular function: GO:0004871(**signal transducer activity**); GO:0015220 (**choline transporter activity**); GO cellular component: GO:0016020 (**membrane**); GO:0016021 (**integral to membrane**).

3.2.6.34. A_24_P918673.UNIQUE.5938; Log Fc -0.72; t=-4.3; adjusted p=0.1; A_24_P918673; Gene bank accession 1: AK094046; Gene bank accesión 2: AK094046; **AK094046**; "Homo sapiens cDNA **FLJ36727 fis, clone UTERU2012286. [AK094046]**"; Citobanda 2: **11q13.1**; Cromosoma: **chr11**; Inicio cromosoma: 66191111; Fin cromosoma: 66191170; Chromosome strand: +; Unigene 2: Hs.523822.

7. Resultados del análisis de la expresión génica diferencial entre fenotipos pulmonares.

Como **objetivo secundario** se intentó comparar la expresión génica diferencial del ADN de muestras de tejido pulmonar entre distintos **subgrupos o fenotipos** de pacientes:

7.1. Fenotipos según espirometría e historia tabáquica.

Las comparaciones entre **subgrupos según hábito tabáquico: (1)EPOC fumador activo= COPD Smoker (cS); (2) EPOC exfumador=COPD exsmoker (cX); (3) no EPOC fumador activo= healthy Smoker (hS); (4) no EPOC exfumador = hX; (5) no EPOC nunca fumador= healthy never Smoker (hN))** no dieron grupos de genes sobreexpresados de forma significativa, probablemente por **falta de tamaño muestral suficiente**. La mayoría de las comparaciones de sobre o infraexpresión génica de genes aislados entre los grupos **no mostraron efectos significativos**. Poniendo un umbral en un valor de $p=0.1$ ajustado por proporción de descubrimientos falsos ("False Discovery Rate: FDR"), y debido al gran número de comparaciones, daba un **FDR** demasiado grande, que era mayor que 0.1.

Se realizaron contrastes con **1 grado de libertad con "T tests" y ANOVA o F-test** para buscar diferencias significativas de genes aislados entre dichos 5 grupos, sin observarse ningún resultado significativo (todos con $p>0.25$).

Se realizaron también comparaciones según la **historia tabáquica**, según fueran **fumadores activos (hS), exfumadores (hX) o nunca fumadores (hN)** dentro del grupo de "no EPOC", o bien, **fumadores activos (cS) o exfumadores (cX)** dentro del grupo de EPOC:

- a) **EPOC fumadores activos (cS) versus EPOC exfumadores (cX): Sólo 1 gen sobreexpresado: A-24-P357791.UNIQUE, el NP1247838 con $p=0.098$. GB/AL162389.21/CAH73163.1 proteína ribosómica L36a pseudogene 6.**
- b) **EPOC fumadores activos (cS) versus EPOC exfumadores (cX) usando sólo hombres: Sólo 4 genes sobreexpresados.**
 - a. **A_24_P357791.UNIQUE, NP1247838 con $p=0.067$. GB/AL162389.21/CAH73163.1 proteína ribosómica L36a pseudogene 6. Cromosoma 9; Citobanda 9q31.2.**

- b. **A_24_P521662.UNIQUE.16715, Cromosoma 8; Citobanda 8p12** con $p=0.075$. CR627448.
 - c. **A_24_P213206.UNIQUE.14911, LOC442240, Cromosoma 6; Citobanda 6q21, $p=0.075$. Dedo de zinc o Zinc finger proteína like 259.**
 - d. **A_32_P29149.UNIQUE.24598, BX647987. Cromosoma 4; Citobanda 4q23**
- c) **EPOC fumadores activos (cS) versus no EPOC fumadores activos (hS): No se encontraron** genes diferenciales expresados de forma significativa. Tanto para todos los pacientes, como sólo para los varones.
- d) **EPOC exfumadores (cX) versus no EPOC exfumadores (hX): No se encontraron** genes diferenciales expresados de forma significativa. Tanto para todos los pacientes, como sólo para los varones.
- e) **No EPOC fumadores activos y exfumadores (hS+hX) versus no EPOC nunca fumadores (hN): No se encontraron** genes diferenciales expresados de forma significativa. No se pudo realizar la comparación de sólo para los varones.
- f) **No EPOC fumadores activos (hS) versus no EPOC nunca fumadores (hN): No se encontraron** genes diferenciales expresados de forma significativa. No se pudo realizar la comparación de sólo para los varones.
- g) **No EPOC fumadores activos (hS) versus no EPOC exfumadores (hX): No se encontraron** genes diferenciales expresados de forma significativa. Tanto para todos los pacientes, como sólo para los varones.
- h) Se valoró si había **interacciones (afectación diferencial de la expresión génica) por ser exfumador o fumador activo** en general y en los grupos de EPOC o de no EPOC: **No se encontraron** que las hubiera de forma significativa.
- i) **No se comparó expresión diferencial según la cantidad fumada (dosis acumulada-año)**, pese a que se había recogido dicha variable en las bases de datos en todos los casos, al no haber umbrales consensuados que permitieran comparar subgrupos de cantidad acumulada fumada por niveles de gravedad

al respecto. Tampoco los años exfumador, dado que el ser exfumador no mostraba diferencias significativas respecto al seguir fumando.

7.2. Enfisema vs. no enfisema.

Las comparaciones entre **fenotipos pulmonares**:

- Sólo fueron posibles entre **enfisemas y no enfisemas** (independientemente de que fueran EPOC o no):

No se encontraron genes sobre o infraexpresados de forma significativa, ni al comparar **enfisemas varones (todos los enfisemas eran varones) con no enfisemas varones**; ni siquiera entre **enfisemas (todos varones) y no enfisemas (varones y mujeres)**. Se cree que por falta de tamaño muestral. La paradoja del sexo se comenta más adelante.

Además de tener grupos homogéneos de enfisema (aunque sólo varones) confirmados usando como GOLD standard la TAC torácica por 2 radiólogos expertos (sin los avances actuales y no siempre de alta resolución), covalorados por microscopía óptica de las muestras histológicas de las biopsias pulmonares y comparados con sus pruebas de función respiratoria completas en todos los casos, eran el único fenotipo con un número suficiente de pacientes para realizar comparaciones.

En la mayoría de casos el enfisema radiológico (diagnosticado por TAC) se confirmaba en las muestras histológicas obtenidas, pues en su mayoría eran de lóbulos superiores (al ser la mayor parte de lobectomías para cirugía de cáncer allí por ser más frecuente el cáncer de pulmón en estas localizaciones, y también ser más frecuente la afectación por enfisema en su distribución por TAC en ellos), y con predominio en los casos de enfisema de enfisema centroacinar.

Sólo muy excepcionalmente era éste extenso o grave, y raramente panacinar (más habitual del enfisema avanzado o del déficit de alfa-1 antitripsina: ningún paciente del estudio), dado que la difusión de monóxido de carbono (DLCO) baja era un criterio de exclusión para la intervención quirúrgica.

Por lo tanto era un grupo de expresión génica de enfisema más bien ligero y excepcionalmente moderado, para nada comparable con otros de enfisema avanzado bulloso con cirugía de resección de bullas y reducción de volumen pulmonar.

Así mismo, no disponíamos de los sistemas objetivos actuales de medición del grado de atenuación, extensión y distribución del enfisema sin disponer de la tecnología de los TACs actuales.

Tampoco podíamos preparar los pulmones como hacíamos con las muestras de pulmones de ratones para calcular de forma objetiva la distancia de la línea media interlaminar.

7.3. Valoración de otros fenotipos pulmonares.

- El fenotipo de “**bronquitis crónica**” **no se consideró valorable** al no disponer en “todos” los casos de “si expectoraba durante al menos 3 meses dos años consecutivos”, al ser una pregunta no documentada de forma rutinaria en las historias, que se tuvo que hacer en la mayoría de casos a propósito (que no todos).

Dependía de la subjetividad de la respuesta de cada paciente, sin una medida objetiva y cuantificable de la expectoración o del engrosamiento de la vía aérea por TAC torácico, al no disponer entonces de los avances actuales para medirlo de forma objetiva.

- El fenotipo “**bronquiectasias**”, diagnosticadas por TAC y que se intentó documentar en todos los casos, fue la **excepción**, por lo que **tampoco se consideró un fenotipo fiable para poderlo comparar**.

Generalmente son cilíndricas iniciales leves en lóbulos inferiores en la EPOC, secundarias a infecciones previas más predominantes en los lóbulos inferiores por acúmulo gravitacional de secreciones, sin haber correlación, a veces por la falta de afectación de lóbulos superiores, con las muestras histológicas obtenidas predominantemente de los lóbulos superiores, al ser más frecuentes las lobectomías por cáncer de pulmón en estas localizaciones que no aquellas.

Además, generalmente se diagnostican de forma más fiable por TACAR torácica (TAC de alta resolución o los TACs más actuales) que no se realizaba de forma rutinaria en 2005-2006.

- El fenotipo EPOC “**asmático**” ateniéndonos a la **prueba broncodilatadora positiva**, **tampoco se consideró un fenotipo fiable para poderlo comparar**, dada la variabilidad evolutiva de la positividad-negativización de la prueba broncodilatadora de los EPOCs en un mismo paciente y su posible relación o no con recientes agudizaciones.

Además, no se disponía de documentación de otros criterios diagnósticos, todavía hoy en debate, como la IgE, la eosinofilia, el Prick test, la metacolina o el óxido nítrico, que no se habían realizado de forma rutinaria, al no ser el motivo de la intervención quirúrgica, y no haber un consenso entonces de los criterios diagnósticos del ACOS (asthma-COPD overlap syndrom).

Tampoco se disponía de una documentación exhaustiva en “todos” los casos de historia personal y/o familiar de asma, atopia o rinitis alérgica y no se preguntó específicamente en todos los casos.

- El fenotipo “**colonización bronquial**”, que también se intentó documentar en todos los casos, también fue la excepción (**no hubo pacientes**), dado que contraindicaba o normalmente postergaba la intervención quirúrgica en espera del control o resolución de la misma.

Generalmente, al tratarse de pacientes con EPOC de grado más avanzado, tienen mayor dificultad para pasar el filtro de los criterios de operabilidad.

- El posible fenotipo EPOC “**multirreingresador**” teniendo en cuenta los ingresos en el último año, también fue la excepción, por lo que **no se realizó la comparación de dicho grupo**.

Probablemente también los EPOC más graves eran filtrados no cumpliendo criterios de operabilidad.

- El posible fenotipo de EPOC con “**caída acelerada del FEV1**” **no se evaluó de forma específica**, dado que en la mayoría de casos no disponíamos de un seguimiento evolutivo de los pacientes con pruebas funcionales seriadas, y en muchos casos sólo estaban hechas las pruebas funcionales respiratorias preoperatorios.

- El fenotipo con “**hipercapnia**” era la excepción, por lo que no se dispuso de pacientes suficientes para realizar análisis comparativo.

- El fenotipo de “**infección bronquial activa**”, que también se intentó documentar en todos los casos, también fue la excepción. Se excluyó un paciente al presentar diagnóstico tardío de nódulo pulmonar como tuberculosis.

Generalmente, la constatación de infección activa en la Preanestesia contraindicaba o normalmente postergaba la intervención quirúrgica en espera del control o resolución de la misma.

No obstante, no se enviaban las muestras resecadas de pulmón de forma rutinaria a Microbiología, por lo que no se pudo comparar de forma fehaciente este grupo de pacientes, y no se siguieron los cultivos de esputo del postoperatorio inmediato, si los hubiera.

8. Valoraciones sobre la posibilidad del análisis de la expresión génica diferencial de los fenotipos sistémicos.

Las comparaciones entre los **fenotipos sistémicos** evaluados en las bases de datos **no se realizaron** finalmente al no seguir unos criterios consensuados fiables, dado que se basaban en scores de puntuación arbitrarios propios de eventos cardiovasculares y factores de riesgo cardiovascular para el fenotipo **cardiovascular**; alteraciones metabólicas para el fenotipo **metabólico**; enfermedades autoinmunes para el fenotipo **autoinmune o inflamatorio**; y episodios de infección para el fenotipo **inmunodeprimido**.

Se había documentado qué pacientes presentaban **poliglobulia** y cuáles **anemia**, pero tampoco se hizo dicha comparación por ausencia de un número suficiente de pacientes.

Así mismo, se documentó el **índice de masa corporal (IMC)** y si presentaban **caquexia**, pero en el contexto del sesgo de que en una mayor parte de los pacientes el motivo de la intervención era por cáncer, era difícil evaluar si esta era exclusivamente por el cáncer (en la mayoría de los casos) o también por enfisema o pérdida de masa muscular esquelética de la EPOC.

No se realizó la comparación de este grupo de pacientes al no ser un fenotipo fiable por este sesgo del cáncer de pulmón.

Tampoco se documentaron otros posibles efectos sistémicos de la EPOC como la depresión, que tampoco entraron en el análisis comparativo, además de que se consideró que no aportarían excesivos datos la expresión génica de tejido pulmonar al respecto.

9. Expresión génica diferencial del tejido pulmonar según edad y sexo y valoración de posibles interacciones en la expresión génica diferencial entre los grupos de EPOC y no EPOC.

- **Edad entre EPOC y no EPOC:** No se encontraron diferencias significativas de expresión génica atribuibles a las diferencias de edad usando un análisis lineal de Bayes empírico como se utilizó con Limma et al (514). Incorporando en todos los modelos posibles efectos del array y del técnico. Se acoplaron modelos con la edad: a) como variable lineal, b) como variable cuadrática, c) smoothing (cubic) spline with 1 knot, d) smoothing cubic spline with 2 knots. Dado el reducido tamaño muestral, no estaba indicado realizar modelos más complejos. En ninguno de los modelos hubo diferencias significativas. Todos los valores ajustados de p fueron > incluso a 0.5.
- **Sexo entre EPOC y no EPOC:** Hubo un **efecto significativo** en la expresión génica atribuible al sexo. Sin embargo, **sin una interacción significativa atribuible al sexo en la expresión génica diferencial entre grupos EPOC y no EPOC.** Se hizo el análisis en dos sentidos: con todos los pacientes (con la variables aditiva “sexo”); y en un modelo con la variable de interacción “sexo”, donde los contrastes son sólo entre los varones.

Se examinaron también entre los **no EPOC al comparar fumadores y exfumadores versus no fumadores si existía efecto aditivo del sexo, que no se encontró** que lo hubiera de forma significativa. No se pudieron realizar estas determinaciones de posibles efectos aditivos del sexo en las comparaciones de subgrupos dentro de los pacientes con EPOC por ser mayoritariamente varones.

Se compararon por grupos de genes (gene sets) diferencialmente expresados los **varones versus mujeres en el grupo de todos los pacientes sin enfisema:** sólo un grupo de genes (gene set) mostró efecto significativo ($p=0.0189$) el “DISTECHE_XINACTIVATED_GENES”. Este grupo de genes está infraexpresado en los varones con 29 genes que pertenecen a esta vía, y el 70% están infraexpresados. Llamaba la atención, no obstante que no hubiera diferencias significativas de expresión en otros grupos de genes (gene sets) de vías moleculares característicamente diferentes entre hombres y mujeres como “HSA00150_ANDROGEN_AND_ESTROGEN_METABOLISM” con valores ajustados de $p=0.24$ (infraexpresión) y 0.75 (sobreexpresión) respectivamente. Pero, todo ello también podría explicarse porque no tuvieran una expresión diferencial en tejido pulmonar.

10. Análisis de la plausibilidad biológica de los resultados.

Como hemos expuesto, no pudimos realizar a posteriori estudios confirmatorios funcionales, de replicación o de localización estructural de los genes con expresión génica diferencial, al restringírsenos totalmente el acceso a las muestras de tejido pulmonar del biobanco, tras cambio de manos en la dirección y control del mismo.

En cuanto a la evaluación gen a gen de los **genes expresados diferencialmente** en los pacientes con EPOC, se realizó un análisis de **agregación de casos** por: a) **cromosomas** (para detectar posibles locus o regiones con polimorfismos específicos); b) **procesos biológicos**; c) **función molecular**; d) **equivalencia** con los resultados de otros **estudios genómicos** sobre expresión diferencial de genes en pacientes EPOC, ya fueran de **asociación familiar o linkeage, o de otros GWAS**.

Entre las regiones de estos genes expresados diferencialmente en EPOC existía cierta **equivalencia** de nuestros resultados con los de **otros GWAS** que se expondrá más abajo.

Inicialmente agrupamos dichos genes según localización cromosómica y función.

-Cromosomas: He aquí la clasificación de esos **34 genes** por su localización cromosómica y según su función después.

Chr	Cytobands	Strand	Gene	Bank Accession	LogFc	t	p	Function/Location	Gene	
1	1q43	1q43	+	CHRM3	NM_000740-	1.03	-4.4	0.1		
2	2p16.3	2p16.3	-	LOC646936	ribeye	-0.72	-5.0	0.078	Adenylcyclase/inhibits cellcycle/pregnancy	A24P127192
2	2q21.1-2	2q21.1	+	C2orf27	NM_013310	1.08	5	0.078		A32P32061
2	2q11.2	2q11.2	-	CHST10	NM_004854	-0.66	-4.6	0.085		A23P102351
5	5q23-31	5q31.2	-	MGC29506	NM_016459	1.82	4.3	0.1	Apoptosis/Endoplasmic Reticulum.	A23P84596
6	6p24.3	6p24.3	+	MGC26597	PIP5K1A	-1	4.3	0.1		A23P389426
11	11q13.1		+	AK094046	FLJ36727	-0.72	-4.3	0.1	UTERU2012286	A24P918673
13	13q14	13q14	+	CKAP2S76132	IGLLV	1.91	4.5	0.085	Apoptosis/cellcycle/mt	A24P510357
14	14q32.33	14q32.33-		IGH	AK130614	1.60	4.8	0.078		A32P200144
14	14q32.33	14q32.33+		IGH	AK130614	1.68	4.3	0.1	MHCI (histocompatibility I)	A23P158817
15	15q22.2	15q22.2	+	NLF2	NM_001007595	0.9	4.7	0.085	FAM148B/Nucleus	A24P56576
16	16p11.2	16p11.2	-	MAPK3	NM_002746	-0.058	-4.4	0.1	Ras/cellsignalling phosphoril/Prol	A23P37910
16	16p12.1	16p12.1	+	LOC554206	BC029609	-0.75	-4.6	0.08		A23P434040
16	16p13.1	16p13.13	+	TNFRSF17	NM_0011192	2.07	5.3	0.078	Proliferación/Plasma membrane.	A23P37736
18	18p11.32		+	ADCYAP1		1.76	5.1	0.078	Adenylcyclase...	A23P38712
19	19p13.1	19p13.2	+	SLC44A2	NM_020428	-0.56	4.3	0.1	NFKB/Proinflammatory/membrane	A24P10657
19	19p13.3	19p13.3	-	JSRP1	NM_144616	1.66	4.3	0.1	Skeletal muscle contraction	A23P397320
22	22q11.1-2	22q11.22+		IGL2	AJ319669	1.19	5	0.078	Extracellular	A24P104980
22	22q11.1-2	22q11.22+		IGLv	M87790	1.42	4.8	0.078	Extracellular/Igl Light chain/antiVHA.	A23P43979
22	22q11.1-2	22q11.22+		IGLv	MCLL063	1.21	4.8	0.085	Extracellular/Igl variable/AM181370	A24P24996
22	22q11.1-2	22q11.22+		IGLI	AY172962	1.92	4.6	0.085	Extracellular/Igl Light chain	A24P605563
22	22q11.1-2	22q11.22+		IGL	BC012876	1.75	4.6	0.085	Extracellular/Igl	A24P605563
22	22q11.1-2	22q11.22+		IGLI	X57802	2.19	4.3	0.1	Extracellular	A24P519504
22	22q11.2	22q11.23	+	IGLL3	NM_001013618	0.83	4.6	0.085	Extracellular/Igl Light chain/w protein	A24P239076
22	22q11.22	22q11.22+		IGLv1	X01147	1.96	4.5	0.085	Extracellular	A24P766868
22	22q11.22	22q11.22-		ARPC1B	BI521983	1.46	4.4	0.1	Motility/adhesion/cytoskeleton/membrane	A24P766868
22	22q11.23	22q11.23+		IGLL1	NM_020070	1.81	4.5	0.085	Extracellular	A24P83102
22	22q13.2	22q13.2	+	ZC3H7B	NM_017590	0.78	4.4	0.1	Nucleus	A23P218807
22	22q13.33	22q13.33+		PANX2	NM_052839	0.78	4.4	0.1	Extracellular	A24P160202
22	22q11.23	22q11.23	-	DERL3	NM_198440	1.87	4.7	0.085	Endoplasmic Reticulum/Protein catalysis	A23P6362
						2	4.3	0.1		A23P72252

Se resumen, así mismo, las **funciones básicas** de los genes expresados diferencialmente, atendiendo a las descripciones de la Human Gene Database de las Gene Cards del Weizmann Institute of Science y publicaciones al respecto de probables implicaciones en la patogénesis de la EPOC:

FUNCIONES BÁSICAS DE LOS 34 GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESADOS EN LOS PACIENTES CON EPOC (p<0.1)

-CHRM3: Chr 1. Cholinergic receptor muscarinic 3. Receptor colinérgico muscarínico 3. Log Fc 1.03, t=-4.4, p=0.1. **G-protein coupled receptors (GPCR).** Receptores acoplados a proteína G. Estimulados por acetilcolina: inhibición de adenilciclasa, degeneración de fosfoinositol (IP) y regulación de los canales de K+. **Contracción del músculo liso. Secreción glandular. Asociado con EPOC en otros GWAS** y estudios funcionales.

-LOC646936: similar to ribeye. Chr 2. LogFc -0.72, t=-5.0, p=0.078. Correpresor de la transcripción. Inhibidor del ciclo celular. Aceptor de NAD+. Adenilato ciclasa. Diferenciación de adipocitos de la grasa magra. Embarazo.

-C2orf27: Chr 2. Chromosome 2 open reading frame 27. Marco 27 de lectura abierta del cromosoma 2.

-CHST10: Chr 2. Carbohydrate sulfotransferase 10. Log Fc-0.66, t=-4.6, p=0.085. Transfiere sulfatos al carbono 3 del grupo hidroxil del ácido glucurónico terminal de proteínas y lípidos unidos a oligosacáridos. **Biosíntesis de O-glicano y oxidación biológica. Biosíntesis y metabolismo de la estructura de carbohidratos. También de las células natural killer. Plasticidad neuronal. En la membrana del aparato de Golgi.**

-MGC29506: Chr5. Log Fc 1.82, t=4.3, p=0.1. **Apoptosis. Retículo endoplásmico.** Inflamación crónica. Posible resistencia insulínica en adipocitos.

-PIP5K1A: Chr 6. Phosphatidylinositol 4-Phosphate 5-kinase type 1A. Fosfatidil inositol 4 fosfato 5 kinasa tipo 1A. Log Fc 1, t=4.3, p=0.1. Cataliza la fosforilación de fosfatidil inositol 4 fosfato a fosfatidil inositol 4,5 bifosfato, sustrato para formar fosfatidil inositol 3,4,5 trifosfato. **Organización de las fibras de actina del citoesqueleto. Adhesión, migración y fagocitosis celular** induciendo la polimerización actínica Arp 2/3 dependiente. **Adhesión plaquetaria** mediante estimulación de **receptores acoplados a proteínas G.**

-AK094046: RBM14 (RNA binding motif 14): Chr 11. Log Fc - 0.72, t= -4.3, p=0.1. **Interactúa con el receptor de la hormona tiroidea. Activador de la transcripción.**

-CKAP2: Chr 13. Cytoskeleton associated protein 2. Proteína 2 asociada al citoesqueleto. Log Fc 1.91, t=4.5, p=0.085. **Estabiliza los microtúbulos. Regula la división celular. Apoptosis. Fosforilación de serinas y treoninas. En citoplasma.**

-NLF2: Chr 15. Nuclear localized factor 2, family with sequence similarity 148, member B. Factor localizado nuclear 2, familia con similitud de secuencia 148, miembro B. C2 calcium-dependent domain containing 4B. Log Fc 0.90. t=4.7. p=0.085. Probablemente relacionado con los **procesos inflamatorios**, con la **arquitectura celular** y los procesos de **adhesión celular.**

-TNFRSF17: Chr 16. Tumor necrosis factor receptor superfamily member 17. Miembro 17 de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral. Log Fc 2.07, t=5.3, p=0.078. **Proliferación. Receptor de membrana plasmática. Supervivencia de linfocitos T en tejido periférico.** Transducción de señal. Respuesta inmune. Desarrollo orgánico multicelular.

-MAPK3: Chr 16. Log Fc-0.058, t=-4.4, p=0.1. Ras. Reguladores del ciclo celular por fosforilación. Proliferación celular. Proinflamatorio.

-LOC554206: Chr 16. Log Fc -0.75, t=-4.6, p=0.08.

-ADCYAP1: Chr 18. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide precursor (PACAP). Precursores del polipéptido hipofisario activador de la adenilciclasa 27, 38 y relacionado 48. **Activación de la adenilato ciclasa.** Transducción de señal intracelular. Embarazo. Inhibición de la progresión en el ciclo celular. Actividad hormonal. Neuropéptido. Extracelular. Fracción soluble.

-SLC44A2: Chr 19. Solute carrier family 44 (Choline transporter) member 2. Familia 44 de portadores de soluto (transportador de colina) miembro 2. Log Fc -0.56, t=4.3, p=0.1. Activador del factor nuclear kappa B (NFkB) proinflamatorio. Proinflamatorio. En membrana celular.

-JSRP1: Chr 19. Junctional sarcoplasmic reticulum protein 1. Proteína 1 de unión del retículo sarcoplásmico. Log Fc 1.66, t=4.3, p=0.1. Contracción del músculo esquelético.

FUNCIONES BÁSICAS DE LOS 34 GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESADOS EN LOS PACIENTES CON EPOC ($p \leq 0.1$)

-IGH: Chr 22. Immunoglobulin heavy locus. Locus de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas. El locus contiene los segmentos V (variable), D (diversidad), J (joining: unión), y C (constante). Durante el desarrollo de los linfocitos B, por recombinación a nivel del ADN se une un solo segmento D con un segmento J; este gen parcialmente reformado D-J se une entonces con el segmento V. El segmento V-D-J neoformado se transcribe con la región constanteIGHM; este transcriptoma codifica una cadena a mu pesada. Más tarde en el desarrollo de los linfocitos B cells se genera el ARN premensajero V-D-J-Cmu-Cdelta, que se puede escindir (splice) de forma alternativa para codificar tanto cadenas pesadas mu o delta. Los linfocitos B maduros realizan recombinación switch, de forma que el gen V-D-J se aproxima a con otro de los genesIGHG, IGHA, or IGHE y cada célula expresa ,bien las cadenas pesadas gamma, alpha, o epsilon. La recombinación de muchos segmentos V diferentes con varios segmentos J permite una gran capacidad de reconocimiento antigénico. Para adquirir más diversidad se realiza por uniones diversas, resultando de la adición aleatorizada de nucleótidos por la terminal deoxinucleotidiltransferasa, y por mutaciones hipersomáticas, que ocurre durante la maduración de los linfocitos B en el bazo y en los ganglios linfáticos. Debido a polimorfismos, la cantidad de genes V, J y D funcionales varía entre cada individuo y algunos segmentos V, D J y C pueden ser pseudogenes.

-IGL@: Chr 22. Immunoglobulin lambda locus. Immunoglobulin lambda light chain. AY172692. Log Fc 1.92, t=4.6, p=0.085.

-ARPC1B: Chr 22. Actin related protein 2/3 subunit 1B. Proteína 2/3 relacionada con actina, subunidad 1B. Log Fc 1.46, t=4.4, p=0.1. **Motilidad. Adhesión. Citosqueleto. Membrana. Polimerización de las fibras de actina.** Actúa como probable subunidad p41 del complejo Arp 2/3 que probablemente mantiene su estructura. Sustrato y activador de la Aurora A kinasa que mantiene la **homeostasis de los centrómeros**. Mediación en la respuesta inmune **CCR3 en eosinófilos y otros tipos celulares**.

-DERL3: Chr 22. Der-1 like domain family member 3. Miembro 3 de la familia del dominio similar a Der-1, de la familia de las derlinas, variante de transcripción 1. Log Fc 1.87. t=4.7. p=0.085. Unión y **catabolismo de las proteínas MHC I** desdobladas endoluminales y del CFTR (cystic fibrosis transmembrane receptor: canal de cloro transmembrana de la fibrosis quística) por medio de la formación de un canal en la membrana del retículo endoplásmico que permite su retrotranslocación al citosol, donde pueden ser ubiquitinadas para ser degradadas por el proteasoma. Implicados también en la patogénesis de la fibrosis quística, del hemangioma cavernoso y de la degradación de las cadenas pesadas de proteína del citomegalovirus en las infecciones causadas por éste.

-ZC3H7B: Chr 22. Zinc finger CCCH-type containing 7B. Dedo de Zinc tipo CCCH que contiene 7B. Log Fc 0.78, t=4.4, p=0.1. Núcleo. Interacciona con la proteína no estructural NSP3 del rotavirus.

-PANX2: Chr 22. Pannexin 2. Log Fc 0.78, t=4.4, p=0.1. Extracelular. **GAP junctions.** Uniones GAP. Familia de las inexas.

De forma interesante, por la **distribución de los genes** con expresión diferencial, se podrían sospechar algunos **locus** que pudieran tener relación con la EPOC, a falta de su constatación en estudios con mayor tamaño muestral y de replicación o funcionales:

- **13 genes** se juntan en un espacio reducido en el **cromosoma 22**:
 - **9** son genes sobreexpresados de las **inmunoglobulinas lambda**.
 - **1 gen** sobreexpresado **ARPC1B (complejo 2/3 de la proteína relacionada con la actina subunidad 1B)** que participa en la **polimerización de actina del citoesqueleto** para la **adhesión y motilidad celular y proliferación celular** en respuestas mediadas por **receptores CXCR3** de membrana en eosinófilos y otros tipos celulares. Asociado previamente con EPOC.
 - **1 gen** sobreexpresado **DERL3 (miembro 3 de la familia con dominio similar a derlina-1)** implicado en la **retrotranslocación de proteínas** con mecanismo de histocompatibilidad de tipo I (**MHC I**) desde el retículo endoplásmico al citosol para su **catabolismo** por ubiquitinización por el proteasoma.
 - **1 gen** sobreexpresado **ZC3H7B** (dedo de Zinc tipo CCCH que contiene 7B) que interacciona con la proteína NSP3 no estructural del rotavirus.
 - **1 gen** sobreexpresado **PANX2** (pannexin 2) que conforma la panexina 2, inexina estructural de las **uniones GAP**.

- **3 genes** se juntan en un espacio reducido en el **cromosoma 16**:
 - **1 gen** sobreexpresado **TNFRSF17** (miembro 17 de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral) implicado en la **proliferación y supervivencia** de los **linfocitos T** en el **tejido pulmonar y periférico**. Los genes del receptor TNFR se han asociado previamente a EPOC.
 - **1 gen** sobreexpresado **MAPK3** (mitogen-activated proteína kinase 3) de las proteínas implicadas en la **transmisión** intracelular de las señales de receptores de membrana (entre ellos CCR3 y TNFR) mediante **fosforilación MAP1 y 2, ERK2 ó p38**, para la activación de la **proliferación celular y quimiotaxis** en linfocitos T y múltiples células.

- **1 gen** infraexpresado **LOC554206** de función incierta.
- **3 genes** se juntan en un espacio reducido en el **cromosoma 2**:
 - **LOC646936** (similar a **ribeye**) infraexpresado.
 - **C2orf27** (Chromosome 2 open reading frame 27) sobreexpresado.
 - **CHST** (carbohydrate sulfotransferase 10) infraexpresado.
- **2 genes** se juntan en un espacio reducido en el **cromosoma 14** de **cadena pesada de inmunoglobulinas** también relacionadas con el mecanismo de histocompatibilidad de tipo I (MHC I).
- **2 genes** se juntan en un espacio reducido en el **cromosoma 19**:
 - **SLC44A2 (solute carrier family 44 (Choline transporter) member 2)** proinflamatorio.
 - **JSRP1 (junctional sarcoplasmic reticulum protein 1)** implicado en la **contracción del músculo esquelético**.

-Tras **comparación con otros estudios de genes expresados diferencialmente en EPOC** se evaluaron **coincidencias** con nuestros resultados y diferencias en metodología de los estudios y la comparabilidad de los pacientes incluidos:

- **Coincidencias de locus con expresión diferencial:**
 - **Con GWAS previos:**
 - El locus del cromosoma **Chr 14q32: RIN3**. Demostrada relación con EPOC (Cho et al, 2014) en casos y controles con EPOC grave y muy grave.

- **Genes de locus relacionados con EPOC en la proximidad de los genes expresados diferencialmente en nuestro estudio**
 - En GWAS previos:
 - El locus del cromosoma **Chr15q25: CHRNA 3/5 / IREB2 (genes de los receptores colinérgicos nicotínicos alfa 3 y 5 y iron –responsive element binding protein 2)** se encuentra en la **proximidad del gen NFL2 (Chr15q22.2)** expresado diferencialmente en nuestro estudio. La valoración de posibles relaciones entre ambos locus podría precisar de más estudios. El locus Chr15q25 CHRNA 3/% / IREB2 tiene demostrada relación con la **obstrucción bronquial** definida por el cociente FEV1/FVC (Wilk et al., 2012) en población mezclada de casos y controles con EPOC desde leves a graves, y también con **EPOC** en población de casos y controles con EPOC moderado-grave (Pillai et al., 2009; y Cho et al., 2014). Demostrada replicación en estudio de genes candidatos (Candidate gene study) en EPOC grave y muy grave con casos y controles en Polonia (Hardin et al., 2012). También demostrada la relación de este locus con la **dependencia nicotínica**, con el **cáncer de pulmón** y con la **enfermedad arterial periférica**. Cohortes GenKOLS de Noruega, ICGN (International COPD Genetics Network), NETT (Nacional Emphysema Treatment Trial), NAS (Normative Aging Study), EOCOPD (Early-Onset COPD) de Boston y el ECLIPSE (Evaluation of COPD Longitudinally to Identify Surrogate Endpoints).
 - El locus del cromosoma **Chr 1q41: TGFB2 (transforming growth factor beta 2)** se encuentra en la **proximidad** del gene **Chr 1q43 CHRM3 (receptor colinérgico muscarínico 3)** expresado diferencialmente en nuestro estudio. La valoración de posibles relaciones entre ambos locus

podría precisar de más estudios. El locus del cromosoma **Chr 1q41: TGFB (transforming growth factor beta)** se ha asociado con EPOC (Cho et al, 2014) y con deterioro de la función pulmonar (Soler y Artigas et al., 2011)

-En cuanto a los **grupos de genes clasificados según vías moleculares** con expresión diferencial, se intentaron dividir según probables **procesos patogénicos** ya conocidos en la EPOC, y así mismo, se valoraron algunos grupos de genes de vías moleculares como **posibles sesgos** del estudio, tanto por las características de los pacientes, en su mayoría **oncológicos**, como por el mayor número de **mujeres** y con **metástasis de cáncer de colon** de los pacientes controles **“no EPOC”**.

-Se clasificaron los **grupos de genes de las vías moleculares** expresadas diferencialmente según **nivel de significación (p)**:

P=0.047

1. CCR3=C-C receptor 3 (33 genes)
2. Ras=oncogen Ras (68 genes)
3. GLEEVEC=imitanib (45 genes) inhibidor PDGF y TGF- β
4. GPCR=Receptores de membrana acoplados a proteínas G (45 genes)
5. PDGF=Factor de crecimiento de los derivados de plaquetas (46 genes)
6. IL3=interleucina 3 (38 genes)
7. CDK5=CDK5 kinasa (30 genes). Apoptosis celular endotelial post estrés oxidativo vía MAPK (p35).
8. SPPA= Proteína A del surfactante.
9. IGF1R: Receptor del factor de crecimiento de a insulina 1 (51 genes).
10. IL5 UP= interleucina 5 arriba (4 genes).
11. INSULIN=Insulina (41 genes)
12. TPO=trombopoyetina (43 genes)
13. SPRY=sprouty 2 (34 genes)
14. NO1=óxido nítrico 1 (42 genes)
15. EPO=eritropoyetina (51 genes)
16. CXCR4= Receptor CXC 4 de los linfocitos T (52 genes)
17. NFAT=ácidos grasos neurales (60 genes)
18. NGF= factor de crecimiento neuronal (43 genes)
19. IL2=interleucina 2 (41 genes)
20. INTEGRIN=integrina de la matriz celular (66 genes)
21. MCALPAIN= Calpaína M (35 genes)
22. HDACI-colon-SUL16HRS-DN (28 genes)

23. IFNA=Interferón alfa (43 genes)
24. TIGHT JUNCTION (95 genes)
25. LONG TERM POTENTIATION (51 genes)
26. LONG TERM POTENTIATION (55 genes)
27. MELANOSIS (92 genes)
28. THYROID CANCER (56 genes)
29. MAPK=MAP kinasas (36 genes)
30. BLADDER CANCER (65 genes).
31. TGF β (45 genes).

P=0.048

32. ECM=Matriz extracelular (43 genes)
33. MPR=Receptores de las metaloproteasas (32 genes)
34. EGF=Factor de crecimiento epitelial (47 genes)
35. AT1R=Receptor de la antiproteasa alfa 1 antitripsina (59 genes)
36. ETS= Ets (26 genes)
37. HBX-HCC-DN=HBX-cáncer de colon-bajo (34 genes)
38. TNF-a=Factor de necrosis tumoral alfa (28 genes)
39. KO_WT_UP (6 genes)
40. HBX-N_UP (24 genes)
41. VEGF=Factor de crecimiento vasculoendotelial (79 genes)
42. GAP JUNCTION (65 genes)
43. HDACI COLON CLUSTER 9 (41 genes).

P=0.049

44. PYK2=Conexión entre receptores de membrana acoplados a proteína G y sistema MAP quinasa (60 genes).
45. ENDOMETRIAL CANCER (91 genes)
46. NONSMALL CELL LUNG CANCER (91 genes)

-Y posteriormente según **grupos patogénicos:**

Vías moleculares sobreexpresadas en tejido pulmonar de los pacientes EPOC

Nº	Vía molecular	Nº de genes sobreexpresados	P	Función principal	Células (y secreción)	Estímulos
A) Receptores de membrana						
1.	CXCR3	33	0.047	Quimiotaxis	Eosinófilos (IL4, IL5, IL13: asma)	CXCL11(I-TAC), RANTES
				Prolif/Migración	Músculo liso Células epitelio	
				Prolif/Migración	- bronquial - alveolar	
2.	CXCR4	52	0.047	Quimiotaxis	Linfocitos T CD8	SDF1(CXCL12)
					(IFNg, IL8, IL1b)	
3.	GPCR	45	0.047	Contracción músc.	bronquial/secr. glandular	
4.	CDK5	30	0.047	Apoptosis	Endotelio	
B) Sistemas de transducción de señal						
5.	MAPK	36	0.047	Fosforilación		
6.	Ras	68	0.047	Apoptosis.	Secreción mucosa	
7.	SPRY	34	0.047	Cáncer no microcítico	pulmón	
8.	PYK2	60	0.049	Conexión GPCR y MAPK		
C) Reparación celular						
c1) Factores de crecimiento						
9.	EGF	47	0.048	Reepitelización.	Secreción mucosa.	
10.	PDGF	46	0.047	Angiogénesis.	Fibrosis.	
11.	VEGF	79	0.048	Angiogénesis.	Fibrosis. Enfisema.	
12.	TGFb	45	0.047	Fibrosis.		
13.	EPO	51	0.047	Hematopoiesis.	Poliglobulia.	
14.	TPO	43	0.047	Trombogénesis.	Biomarcador inflam. sistémica	
15.	GLEEVEC	45	0.047	Fibrosis		
16.	NO1	42	0.047	Hipertensión pulmonar.	Vasodilatación.	
c2) Citoesqueleto						
17.	TIGH junctions	95	0.047	Estructura y sostén intercelular.		

Vías moleculares sobreexpresadas en tejido pulmonar de los pacientes EPOC

Nº Vía molecular	Nº de genes sobreexpresados	P	Función principal	Células	Estímulos
18. GAP junctions	65	0.048	Comunicación intercelular		
19. INTEGRIN	66	0.047			
c3) Interleuquinas					
20. IL2					
21. IL3					
22. IL5					
23. TNF α					
24. IFN α					
D) Antiproteasas/proteasas					
25. ATR1					
26. ECM					
27. MCALPAIN					
28. MPR					
29. ETS					
E) Defensinas					
30. SPPA					
F) Afectación sistémica					
31. IGF1R					
32. INSULIN					
33. NFAT					
34. NGF					
G) Cáncer					
35. HDACI-COLON-SUL16HRS-DN (28)		0.047			
36. HDACI-COLON-CLUSTER9 (41)		0.048			
36. TNFA (28)		0.048			
37. KO-WT-UP (6)		0.048			
38. HBX-N-UP (24)		0.048			
39. HBX-HCC-DN (34)		0.048			
40. MELANOSIS (92)		0.047			
41. ENDOMETRIAL CANCER (91)		0.049			
42. THYROID CANCER (56)		0.047			
43. BLADDER CANCER (65)		0.047			
44. NON SMALL CELL LUNG CANCER (91)		0.049			
45. LONG TERM POTENTIATION (51)		0.047			
46. LONG TERM POTENTIATION (55)		0.047			

Según esta última clasificación, atendiendo a la **función patogénica** de los grupos de genes de las **vías moleculares expresadas diferencialmente**:

- Hay **genes relacionados con cáncer (non small cel lung cancer, bladder cancer, melanosis)**. El humo de tabaco y la EPOC, especialmente el enfisema se ha relacionado con un riesgo aumentado de cáncer de pulmón y otros cánceres relacionados con el tabaco. No obstante, nuestro estudio al estar **sesgado** por tratarse de pacientes que mayoritariamente acababan en quirófano para cirugía de cáncer con afectación pulmonar (sobre todo **cánceres de pulmón o colon con metástasis pulmonares únicas**), **no está diseñado para valorar esta relación**.
- Parece haber algunas vías moleculares infraexpresadas en EPOC relacionadas con **cáncer de colon y cánceres que son más frecuentes en mujeres (endometrio y tiroides)**. Todo ello se debe a que existían **más mujeres en el grupo control y más cánceres de colon con metástasis pulmonares únicas en este grupo** como motivo de la intervención por Cirugía Torácica. Un sesgo que se aprecia en los resultados de la expresión génica diferencial en este sentido.
- Llama la atención:
 - a) La importancia de algunas **vías moleculares estructurales** expresadas diferencialmente en los pacientes EPOC, que comparten varias de las células implicadas en su patogénesis, y que **precisarían de estudios celulares específicos de mapeado funcional fino** de las mismas (célula a célula). Están siendo ya objeto de investigación sobre futuros fármacos en la EPOC:
 - a. **Receptores CCXR3 y 4**: Responsables de la **quimiotaxis y acúmulo de linfocitos T CD8+** en las vías aéreas y parénquima pulmonar característico de la EPOC.
 - b. **Receptores acoplados a proteínas G**: Implicados en múltiples funciones celulares de activación y proliferación celular. Entre otras la **contracción del músculo liso** y la **secreción glandular**, así como la respuesta a la acción de tratamientos broncodilatadores anticolinérgicos y beta-2 agonistas.
 - c. Sistema **MAP kinasa (ERK 1 / 2, p38, JNK)** de **transducción intracelular de señal** para la **proliferación celular**, generalmente mediante la **activación final nuclear del factor nuclear kappa B (NFkB)**.

- d. Sistema **PYK2** de vías moleculares de **conexión** entre **receptores de membrana acoplados a proteína G** y **sistema MAP kinasa**.
- b) La importancia estructural del **citoesqueleto** a nivel celular con múltiples vías moleculares implicadas en la motilidad celular, migración, quimiotaxis, reparación celular y mecanismos de barrera tisular, remodelado y comunicación intercelular: **GAP y TIGH junctions**.
- c) La importancia estructural de la **matriz extracelular** en el equilibrio de reparación y remodelado tisular, y del balance proteasa/antiproteasa: **ECM, INTEGRIN, MPR, MCALPAINA, ATR1**.
- d) La importancia de la integridad de la **barrera epitelio-endotelio-mesenquimal** y de su capacidad de **reparación** con **remodelado** alterado en la EPOC y de inducción o inicio de cascadas inflamatorias específicas: **EGF, VEGF, PDGF, TGF- β , EPO, TPO, NO1**.
- e) La importancia de determinadas quimiocinas en EPOC además de las clásicas IL-8, IL-1 β y TGF- β : **IL 2, 3 y 5, TNF- α e IFN- α** que podrían sugerir la posibilidad de reacciones iniciadas desde el **epitelio de las vías aéreas** inducidas por **infecciones por virus a través de estimulación TLR3**.
- f) La estimulación **TLR4** por polisacárido en contexto de infecciones bacterianas o colonización bronquial puede jugar también un papel importante en el inicio de la respuesta inmune.

DISCUSIÓN

1. Consideraciones generales.

Se cree que la EPOC es una enfermedad compleja con **múltiples polimorfismos o variantes de susceptibilidad genética de efecto modesto** cada una y/o **raras variantes de gran efecto** (420), creando en conjunto todo un abanico de fenotipos.

1.1. Conclusiones de los estudios previos de asociación (linkage).

De hecho, solamente, como variante de **susceptibilidad rara de gran efecto**, el gen **SERPINA 1** que codifica para el **déficit homocigoto de alfa 1 antitripsina** grave, ha demostrado una **asociación fuerte con susceptibilidad a EPOC**, riesgo de enfermedad pulmonar (enfisema panacinar) y hepática (14,76,308-336).

Por lo demás, más de **192 genes** se han relacionado con la patogénesis de la EPOC en **estudios de genes candidatos y de linkage o asociación genómica** (420, 421) pero con resultados **controvertidos** no irrefutables sobre su **replicabilidad** y reproductibilidad en muchos casos (6,151). Sólo **SOD3** (4,5,8,90,91,364,367-370), además de **SERPINA1**, han presentado estudios de replicabilidad en todos los casos positivos. En cuanto al resto, SERPINA 1 y otros 6 han sido los más repetidos, con más de 10 estudios cada uno, aunque con resultados de replicabilidad variables (excepto en SERPINA 1): **SERPINA 1, ADRB2, TGFB1, TNF, GSTM1, GSTP1, EPHX1**. Ello también denotaba sesgos sobre vías moleculares concretas hacia donde iban dirigidos los estudios al creerse relacionadas con la patogénesis de la EPOC: **proteasas-antiproteasas, inflamación-antiinflamación, oxidantes-antioxidantes**, etc.

Metanálisis (7-9,24) de estos estudios de genes candidatos se han realizado sobre vías moleculares distintas: inflamación (IL4, IL6, IL1B, IL1RN, LTA, TNF y TGFB1), proteasas-antiproteasas (MMP9, TIMP2 y SERPINA3), estrés oxidativo (GSTM1, GSTP1, GSTT1, EPHX1, SDO2 y SOD3), y otros (ECA y ADRB2). Sólo **GSTM1** se ha asociado de forma consistente a EPOC en más de un estudio, y **TNF**, pero exclusivamente en población asiática.

1.2. Plausibilidad biológica de los resultados de genes candidatos en estudios de asociación.

La **plausibilidad biológica** se intentaba demostrar en muchos casos por **estudios funcionales o estructurales de expresión y/o de replicación y mapeo génico** prioritariamente también sobre el tejido pulmonar humano, células extraídas de muestras biópsicas de tejido pulmonar, o en su defecto, sobre tejido pulmonar en modelos de experimentación animal, fundamentalmente de ratones expuestos a condensado del humo de tabaco, en algunos casos con ratones knocked-out para estudio funcional de vías moleculares complejas.

1.3. Estudio de los fenotipos de la EPOC.

Todo esto hace sospechar sobre la **variabilidad y heterogeneidad de los pacientes con EPOC** (487-494), que precisarían de un **fenotipado complejo**, teniendo en cuenta sus componentes variables de:

- **Afectación estructural pulmonar:** enfisematosa del parénquima distal; de fibrosis, bronquiolitis y remodelado de pequeña vía aérea; de hipersecreción y obstrucción bronquial; de hiperreactividad bronquial; de neovascularización bronquial o permeabilidad vascular; de afectación de la circulación pulmonar, etc.
- **Afectación funcional pulmonar.**
- **Agudizaciones.**
- **Comorbilidad sistémica.**
- **Colonización bronquial.**
- **Tratamientos recibidos.**
- **Células inflamatorias preponderantes.**
- **Vías moleculares afectadas.**

1.4. Necesidad de las redes de biobancos de tejido pulmonar.

Todo ello hace que para el estudio de los fenotipos de la EPOC se deban perseguir 2 objetivos: un **fenotipado escrupuloso** que permita comparar la expresión génica diferencial de **grupos homogéneos** entre sí que puedan compartir unas vías moleculares con expresión diferencial similar, y conseguir un número de pacientes suficientemente grande para permitir un **tamaño muestral suficiente en cada grupo** para poder tener poder estadístico para detectar los efectos modestos de múltiples variantes de susceptibilidad, o incluso poder incluir algún que otro paciente con una variante rara de gran efecto (tipo la SERPINA1) (420).

Todos estos objetivos son asimilables con la creación de amplias **redes de biobancos de tejido pulmonar** como la que nosotros comenzamos a desarrollar a partir de la experiencia de nuestro

primer nodo inicial, el biobanco de tejido pulmonar del Hospital de Son Dureta, ahora trasladado al Hospital de Son Espases, también de Palma de Mallorca (Baleares, España), y parte de la Plataforma Consorcio Red Nacional Respira de Biobancos de Tejido Pulmonar.

2. Limitaciones de nuestro estudio piloto de expresión génica diferencial de los pacientes EPOC en comparación con otros grandes estudios GWAS.

Las **limitaciones** de “tamaño muestral” y de índole de “consideraciones sobre el fenotipado”, que se abordan más abajo, de nuestro **estudio piloto de la expresión génica diferencial de los pacientes EPOC** a partir de muestras de tejido pulmonar de los primeros **100 pacientes del biobanco** obtenidas de intervenciones de **Cirugía Torácica, con 65 muestras de tejido pulmonar híbridadas** finalmente para su estudio genómico diferencial, ponen de manifiesto ciertas cuestiones que es importante tener en cuenta en los **diseños de los futuros estudios de las redes de biobancos**, y todo ello pese a haber intentado hacer un fenotipado serio, escrupuloso y exhaustivo.

Del mismo modo, conviene aprender también de otras experiencias muy interesantes a gran escala, con **grandes cohortes de estudios genéticos** actuales (ved el capítulo de introducción al respecto), valorarlas y compararlas en su justa medida, atendiendo al grupo de pacientes diferenciales que representan, y también a sus limitaciones. Han conseguido, sin duda, demostrar **asociaciones de expresión génica** mediante **GWAS** de distintos polimorfismos con parámetros generales como la **función pulmonar o el cociente FEV1/FVC, FEV1 y otras definiciones no tan claras de EPOC** basadas en criterios subjetivos del médico. Ello ha permitido la detección no sesgada de **locus**, no previamente buscados por sospechar su asociación, implicados en la **susceptibilidad al desarrollo de la EPOC: 5q25 CHRNA3/IREB2; 4q31 HHIP; 4q32 FAM13A; 19q13; 14q32 RIN3; 11q22 MMP12; 1q41 TGFB2.**

Y en muchos casos, consiguiendo alto poder estadístico a base de unir en metanálisis con un gran tamaño muestral a pacientes de múltiples cohortes diferentes que representan pacientes específicos muy distintos:

- **GenKOLS**: Estudio genético de cohortes de **fumadores** noruego.
- **National Emphysema Treatment Trial (NETT)**: Estudio genético en pacientes afectos de **enfisema grave avanzado** con afectación bullosa de LSD tributarios a **cirugía de reducción de volumen** con bullectomía.
- **Normative Aging Study (NAS)**.

- **Early-Onset COPD (EOCOPD)**: Estudio genético de cohortes de fumadores que desarrollan EPOC moderado-grave a temprana edad.

- **Evaluation of COPD Longitudinally to Identify Surrogate Endpoints (ECLIPSE)**.

- **International COPD Gene Network (ICGN)**:

No obstante, no se ha conseguido, demostrar dentro de dichos cohortes asociaciones diferenciales de expresión génica entre los distintos fenotipos de pacientes EPOC en ellos representados, excepto con los fenotipos más puros, como enfisema, EPOC con obstrucción de grado grave o el fenotipo sistémico de EPOC con caquexia, o cajones de sastré interesantes como el de caída acelerada del FEV1 (421-437, 267,268,273,274,299, 14,76,308-336, 402,410). Ello aboga a que en futuros estudios se deba abordar el fenotipado para su estudio de forma más fehaciente y refinada. Es más, todavía existe debate sobre cómo definir estos fenotipos que se deberían comparar diferencialmente (442-448,452,487-494).

Únicamente en algunos estudios de pacientes con fenotipos muy puros, como por ejemplo el de enfisema avanzado grave del NETT o el de los pacientes con EPOC grave de inicio precoz del EOCOPD, se han demostrado asociaciones concretas con dichos fenotipos más específicos.

3. Interpretación de nuestros resultados.

Nuestro **estudio piloto** también sugiere la **preponderancia de ciertas vías moleculares** en los pacientes del biobanco con **EPOC**:

-Muchas de ellas recuerdan la importancia de **vías moleculares estructurales** presentes en las células inflamatorias de la respuesta inmune innata implicadas en la patogénesis de la EPOC, que actualmente son el futuro más inmediato de la investigación científica en **nuevas dianas terapéuticas** en EPOC:

-**Receptores de membrana**:

- **CCCR3 y CCCR4**: Activación de la proliferación celular y acúmulo en el pulmón de linfocitos T CD8+ (ved introducción al respecto).
- **Acoplados a proteínas G** (495,496): Son un elemento estructural de algunos receptores de membrana implicados en funciones importantes varias, como algunos receptores del sistema nervioso autónomo simpático y parasimpático. Por

ejemplo la del receptor colinérgico muscarínico M3 codificado en el cromosoma 1, responsable de la secreción glandular y de la contracción muscular peribronquial, que es causa de la parte parcialmente reversible de la obstrucción bronquial y del atrapamiento aéreo secundario que son pieza clave de la fisiopatología de la enfermedad. Hacia estos receptores van dirigidos fármacos específicos broncodilatadores anticolinérgicos de larga duración. Así mismo, los receptores beta 2 adrenérgicos también están acoplados a proteínas G, también disponiendo de agonistas específicos broncodilatadores.

- Sistema **mitogen-activated protein kinasa (MAP kinasa)** de transducción de señal (**ERK 1 / 2, p38 y JNK**) intracelular para activación NFκB de genes inflamatorios. Prometedora diana terapéutica, sobre todo tras valorar efectos anti-p38 en experimentación animal; a falta de mejorar su tolerancia en humanos (497,498,505).

- Sistema **PYK2** (499) de vías moleculares de **conexión** entre **receptores de membrana acoplados a proteína G y sistema MAP kinasa**.

- La importancia estructural del **citoesqueleto** a nivel celular con múltiples vías moleculares implicadas en la motilidad celular, migración, quimiotaxis, reparación celular y mecanismos de barrera tisular, remodelado y comunicación intercelular: **GAP y TIGH junctions**.

- La importancia estructural de la **matriz extracelular** (500, 501) en el equilibrio de reparación y remodelado tisular, y del balance proteasa/antiproteasa: **ECM, INTEGRIN, MPR, MCALPAINA, ATR1**.

- La importancia de la integridad de la **barrera epitelio-endotelio-mesenquimal** (502) y de su capacidad de **reparación** con **remodelado** alterado en la EPOC y de inducción o inicio de cascadas inflamatorias específicas: **EGF, VEGF, PDGF, TGF-b, EPO, TPO, NO1**.

- La importancia de determinadas quimiocinas en EPOC además de las clásicas IL-8, IL-1b y TGF-b: **IL 2, 3 y 5, TNF-a e IFN-a** que podrían sugerir la posibilidad de reacciones iniciadas desde el **epitelio de las vías aéreas** inducidas por **infecciones por virus a través de estimulación TLR3**.

- La estimulación **TLR4** por polisacárido en contexto de infecciones bacterianas o colonización bronquial puede jugar también un papel importante en el inicio de la respuesta inmune con transmisión de la señal intracelular vía MAP kinasa.

Desde luego, éstas son sólo sugerencias del estudio que se deben de confirmar en un futuro con estudios funcionales y estructurales tisulares y de mapeo molecular de las células implicadas en la inflamación y patogenia de la EPOC, a partir de más muestras del biobanco, si se volviera a poder

tener acceso a las mismas, y con estudios más ampliados con muchos más pacientes procedentes de todos los nodos de la Plataforma de Red de Biobancos de Tejido Pulmonar de la Red Respira u otras redes de biobancos de tejido pulmonar.

4. Limitaciones de nuestro estudio.

Las **limitaciones** fundamentales de nuestro estudio son en gran parte atribuibles a un **tamaño muestral reducido** por la **restricción total** a partir de diciembre de 2006 del **acceso** a más muestras de tejido del biobanco pulmonar, denegándose el mismo al cambiar de manos el control del biobanco, y también a la imposibilidad de acceder a más muestras tisulares de los pacientes del estudio almacenadas en el biobanco a partir de entonces para poder hacer estudios confirmatorios de replicación, con PCR real time o de marcaje de expresión génica funcional o estructural.

Otro de los motivos del reducido tamaño muestral fue el filtrado por **criterios de exclusión extrictos** de las muestras con infección activa u otras patologías pulmonares (excepto las del cáncer o lesión pulmonar causa de la intervención quirúrgica, y los fenotipos supuestos pulmonares de la EPOC: enfisema, bronquitis crónica, bronquiectasias cilíndricas en lóbulos inferiores por EPOC, EPOC-asma) y la valoración estricta con **exclusión de las muestras con ADN no preservado o en cantidad insuficiente, tanto en Palma de Mallorca como en Madrid**, previa a la realización de los microarrays.

En parte se observó **mayor degradación del ADN en fumadores, y especialmente en algunos fumadores activos con EPOC (CS)**, lo que obligó a retirar las muestras de algunos de estos pacientes del estudio, tanto en Palma de Mallorca como en Madrid tras su traslado.

Probablemente, el motivo por el que haya **resultados significativos de grupos de genes agrupados en vías moleculares pero no de genes valorados gen a gen (al borde de la significación)**, no sea otro que el **reducido tamaño** muestral.

5. Puntos favorables diferenciales del estudio.

- 1.1. Definición consensuada acorde a las guías GOLD de EPOC.

La expresión diferencial se correlacionó con el cociente prebroncodilatador FEV1/FVC, pero también con el cociente **postbroncodilatador FEV1/FVC < 0.7**, ateniéndonos a la definición GOLD actual de la EPOC (413), a diferencia de otros estudios, siendo dicho criterio espirométrico un requisito necesario, con el cociente postbroncodilatador disponible en casi todos los casos (sólo 3 casos EPOC no tenían prueba broncodilatadora), además de la exposición previa o actual al humo

del **tabaco con una dosis acumulada total > 30 paquetes-año, y la exclusión de otras enfermedades pulmonares (infección activa, asma con obstrucción reversible, bronquiectasias difusas, lesiones posttuberculosis pulmonar, neumopatías intersticiales, etc).**

Por lo tanto, y a diferencia de otros estudios, en los cuales la asociación génica con la EPOC se respaldaba en el criterio subjetivo del médico, en nuestro estudio se basó en **criterios objetivos funcionales** de acuerdo en la gran mayoría de los casos con las **guías internacionales GOLD** de diagnóstico, manejo y tratamiento de la enfermedad.

- 1.2. Criterios de inclusión y exclusión estrictos.
- 1.3. Intento de fenotipado estricto.
- 1.4. Control estricto de la cantidad y calidad del ADN extraído.
- 1.5. Experiencia piloto sobre pacientes de biobanco de tejido pulmonar intervenidos rutinariamente por otras causas por Cirugía Torácica.

6. Interpretación de los resultados de expresión génica de los fenotipos comparados.

6.1. En los fenotipos pulmonares estudiados.

El que no se consiguieran **resultados significativos diferenciales en la expresión génica de los distintos fenotipos pulmonares y de consumo tabáquico evaluados (enfisema (E), no enfisema (E0), fumadores (S), exfumadores (X), nunca fumadores (N), EPOC fumadores (cS), EPOC exfumadores (cX), fumadores no EPOC (hS), exfumadores no EPOC (hX) y nunca fumadores no EPOC (hN))** se atribuye muy probablemente a que **todavía se reducían mucho más los tamaños muestrales** que se tenían que comparar al subdividir la muestra total en más grupos.

En cuanto a este objetivo secundario del estudio no conseguido, que era la **caracterización fenotípica y la expresión génica diferencial según dichos fenotipos de EPOC:**

Se intentó realizar un fenotipado estricto y exhaustivo de los **fenotipos pulmonares y sistémicos**, con toda una profusión de datos y variables que se recogieron en las bases de datos del biobanco. Además se valoraron posibles **factores de confusión** como la **edad** y el **sexo**.

No obstante, excepto el fenotipo **enfisema y los fenotipos de consumo o hábito tabáquico** descritos antes, ningún otro se consideró en las comparaciones de microarrays de expresión génica,

bien porque no fuera del todo fiable su diagnóstico o porque el número de pacientes que lo representaba era bastante escaso o nulo.

Así pasó con el fenotipo **EPOC-bronquiectasias, EPOC-bronquitis crónica, EPOC multirreingresador, fenotipo mixto EPOC-asma o con los fenotipos sistémicos de afectación cardiovascular, metabólica, autoinmunidad o inmunodeficiencia.**

Hubo algún que otro paciente, escasos, con **EPOC y bronquiectasias iniciales cilíndricas en lóbulos inferiores**, probablemente postinfecciosas postagudizaciones de EPOC, que no obstante no afectaban a la zona del lóbulo superior de donde se tomaba la muestra biopsica. Las bronquiectasias localizadas por neumonitis postobstructiva en caso de atelectasias por la obstrucción bronquial del cáncer con disminución del drenaje bronquial local se excluyeron, al considerarse proceso infeccioso neumónico agudo, y por no ser el objetivo de nuestro estudio, siendo que pudieran inducir a resultados sesgados. No hubo suficientes pacientes con EPOC-bronquiectasias para realizar un grupo de comparación en los microarrays.

La condición **EPOC con bronquitis crónica** era por definición clínica en 2005: “expectoración durante al menos 3 meses 2 años consecutivos”. No se preguntaba de forma rutinaria en la historia clínica. Intentamos hacer esta pregunta en el preoperatorio, aunque no lo hicimos con todos los pacientes, y además la respuesta era subjetiva y en algunos casos poco fiable. En aquel momento los TACs helicoidales empleados no permitían el cálculo y cuantificación del engrosamiento peribronquial, que debería confirmarse si debería ser el criterio diagnóstico de dicho fenotipo, y si es así, poder disponer de TACs que lo permitan.

Sobre el fenotipo mixto **EPOC-asma**, se documentó en todos los casos si en las pruebas funcionales respiratorias preoperatorias la **prueba broncodilatadora** había resultado positiva. También si en la historia clínica había documentada historia de asma, rinitis alérgica o atopía o antecedentes familiares al respecto. No se encontraron obstrucciones al flujo aéreo completamente reversibles que sugirieran diagnósticos excluyentes de asma en vez de EPOC. No obstante, no se realizó un despistaje rutinario sistematizado con un cuestionario específico que detectara los casos no documentados en la historia clínica. Así mismo, no recopilamos datos de Ig E, pruebas cutáneas de alergia o RAST/Phadiotop alérgicos, eosinofilia en sangre o esputo o prueba de broncoprovocación con metacolina, que no se realizan de forma rutinaria, ni mucho menos en el preoperatorio de estos pacientes. Sigue siendo bastante controvertido, aunque interesante, valorar este fenotipo basándose exclusivamente en la prueba broncodilatadora positiva, que aunque se haya relacionado con una mayor eosinofilia en el esputo y mayores niveles de óxido nítrico exhalado, presenta una gran variabilidad en el tiempo en un mismo paciente, incluso en un porcentaje de EPOC sin historia de asma y en fase estable no agudizada. Actualmente, han aparecido documentos consenso, no existentes en 2004-2005, sobre cómo definir este fenotipo mixto EPOC-asma (452), que requerirían un cuestionario específico para despistaje de historia asmática o alérgica, y pruebas como la IgE y

pruebas de alergia cutánea (Prick test) que no se realizan de forma rutinaria en el preoperatorio de estos pacientes y que se debería consensuar si incluirlas, o cuáles de ellas, en el preoperatorio de los pacientes que vayan a aportar muestras para un biobanco (en red o no) de tejido pulmonar para caracterizar adecuadamente este fenotipo.

El fenotipo **EPOC multirreingresador o multiagudizador** todavía **precisa de una definición consensuada** para los estudios de expresión génica diferencial. Sigue siendo un “cajón de sastre”, pero con gran significado pronóstico y mortalidad en la EPOC. Tanto que las guías de manejo clínico GOLD recomiendan, al menos, maximizar en ellos el tratamiento inhalado con triple asociación de broncodilatadores anticolinérgicos y beta2 adrenérgicos de larga duración con corticoides inhalados. En él se pueden incluir pacientes incorrectamente tratados o con manejo inapropiado (ya sean fumadores activos sin deshabituación tabáquica, o aquellos con escaso tratamiento broncodilatador, o sin prescripción de oxígeno, ventilación mecánica no invasiva o de rehabilitación cuando la precisan, o no vacunados, o con colonizaciones bronquiales no tratadas adecuadamente, o incorrectos tratamientos de las agudizaciones sin erradicación completa bacteriana, o con otras enfermedades pulmonares no tratadas correctamente (bronquiectasias o lesiones portuberculosas, asma, hipertensión pulmonar, etc), falta de tratamiento adecuado de comorbilidades sistémicas como insuficiencia cardíaca, arritmias, eventos trombotogénicos o tromboembólicos, cardiopatía isquémica, hipertensión, diabetes mellitus, dislipemia, síndrome de las apneas-hipopneas del sueño u obesidad-hipoventilación). Y pueden ser mezclados con aquellos que, de forma interesante, tienen mayor susceptibilidad genética por vías moleculares expresadas diferencialmente o con un tipo de inflamación diferente con mayor predominio de eosinófilos o neutrófilos. En nuestro caso, tampoco se constataba de forma rutinaria en la historia clínica en 2005. Se preguntó de forma específica sobre el número de ingresos por agudización en el último año, y se buscó en las historias clínicas documentación sobre las mismas. Los pacientes con **2 ó más ingresos en el último año fueron escasos, la excepción**, sin poder constituir por el número un grupo para su comparación en cuanto a expresión génica diferencial. Posiblemente este grupo se trate, mayoritariamente, que no siempre, de **EPOCs más graves** que en muchos casos **no pasan el filtrado funcional de operabilidad** para poder ser intervenidos por Cirugía Torácica. Para poder estudiar este grupo de pacientes a partir de muestras de tejido pulmonar de redes de biobancos **convendría definir de forma apropiada el “fenotipo”**, aunque no sea un fenotipo puro tal, y valorar tanto el dintel de agudizaciones en el último año (¿una?; ¿dos o más?) y la definición de agudización (¿sólo las graves que requieren ingreso hospitalario?; ¿también las visitas a urgencias y/o a Atención Primaria?). Y convendría valorar adecuadamente sesgos de infratratamiento o manejo incorrecto como los expuestos previamente, al igual que intentar correlacionar con imágenes de TAC y Ecocardiografía para el estudio estructural cardiopulmonar, y marcadores inflamatorios de aire exhalado u óxido nítrico, que nos sugieran el tipo de inflamación preponderante para realizar un endotipado más preciso de este “falso fenotipo” de interés.

Tampoco pudimos detectar **EPOC con declive acelerado de la función pulmonar o con caída acelerada del FEV1 (“fast decliners”)**, al no hacerse de forma protocolizada pruebas de función respiratoria seriadas para valorarlo, y en algunos casos sólo disponíamos de las pruebas de función respiratoria preoperatorias.

Ni tampoco aquellos **EPOC con capacidad de ejercicio disminuída**, al no tener protocolizado en el preoperatorio en todos los casos test del paseo de 6 minutos (6-minute walking test) o cicloergometría.

Tampoco pudimos detectar pacientes de **inicio precoz de EPOC** comparables con los del Early-Onset COPD de Boston; ni **EPOCs de grado de obstrucción grave o muy grave** que no eran tributarios a cirugía al no cumplir criterios de operabilidad; ni **enfisemas graves muy avanzados con criterios de Cirugía de Reducción de Volumen** comparables con los del National Emphysema Treatment Trial (NETT), dado que no hubo en ese período de 2005-2006 tales, y se había iniciado la implantación de la técnica de colocación de prótesis valvulares endobronquiales por vía endoscópica intervencionista como tratamiento alternativo preponderante en el Hospital Son Dureta para este tipo de pacientes, reduciendo la indicación quirúrgica por este motivo.

En las bases de datos se había incluido en todos los casos una gasometría arterial basal preoperatoria a aire ambiente en fase estable. Se evaluó la posibilidad gasométrica basal aire ambiente de EPOCs con **hipercapnia**, pero constituían las excepciones, y por la escasez del número de pacientes que representaban no pudimos considerarlos como grupo para la comparación de su expresión génica. Del mismo modo que habíamos considerado pacientes con **insuficiencia respiratoria crónica** basal o **acidosis respiratoria**, pero estos no se detectaron al no cumplir los criterios de operabilidad.

6.2. Interpretación del estudio de los fenotipos sistémicos de la EPOC.

En cuanto a los **fenotipos de afectación sistémica de la EPOC**, todavía generan cierta **controversia**, y algunos todavía los consideran como meras comorbilidades intercurrentes o causadas por el mismo tabaquismo. Muchos aceptan la presencia en los pacientes EPOC de una inflamación sistémica mayor que pudiera empeorar y acelerar dichas comorbilidades. No obstante, es cierto y demostrado que la condición de padecer EPOC es un **factor de riesgo cardiovascular** independiente de ser o no fumador, con mayor susceptibilidad a enfermedad cardiovascular, isquémica y protrombógena. También los pacientes con EPOC tienen mayor susceptibilidad al **cáncer de pulmón**, especialmente en EPOC con enfisema, **anemia de trastornos crónicos** y en algunos casos **poliglobulia, osteoporosis, caquexia y pérdida de masa muscular esquelética y depresión**.

Burger et al. incluso evaluaron combinaciones de fenotipos de **afectación pulmonar y sistémica según clusters asociados a mortalidad** e identificaron pacientes con **desarrollo precoz de EPOC** tanto de un grupo con **comorbilidad alta cardiovascular** como de un grupo de EPOC con **enfisema con menor comorbilidad cardiovascular** pero más **riesgo de muerte súbita por arritmias o cardiopatía isquémica**.

También falta por consensuar cómo definir de forma adecuada dichos fenotipos de afectación sistémica para el estudio de la expresión génica diferencial, y poder contestar a la pregunta de si existe expresión génica diferencial en tejido pulmonar significativa o si se precisaría de toma de muestras de otro tipo como una muestra sanguínea para su mejor caracterización. En nuestro caso optamos por la realización de escalas de puntuación (scores) para la valoración de **riesgo cardiovascular, metabólico, autoinmune y de inmunosupresión**, arbitrarias y no validadas:

a.- **riesgo cardiovascular**: se puntuaron con:

- 1 punto cada uno: los siguientes factores de riesgo cardiovascular: hipertensión arterial, diabetes mellitus, dislipemia, obesidad grados I y II, exfumador o taquicardia supraventricular paroxística tratada, EPOC u otras enfermedades crónicas inflamatorias, síndrome de las apneas-hipopneas del sueño (SAHS) en tratamiento con ventilación crónica con presión positiva continua en la vía aérea (cPAP) nocturna.
- 2 puntos cada uno: hipertensión arterial con falta de respuesta o mal control pese al tratamiento, signos de arteriosclerosis como calcificación del botón aórtico o de la aorta torácica o abdominal en la radiografía o TAC, o hipertensión arterial con afectación no embólica ni isquémica de órganos diana como miocardiopatía hipertensiva, retinopatía hipertensiva o nefroangioesclerosis; y del mismo modo, diabetes mellitus con mal control o afectación de órganos diana como retinopatía diabética, nefropatía diabética o vasculopatía diabética, arritmia cardioembólica anticoagulada (flúter o fibrilación auricular), taquicardia supraventricular paroxística no tratada o valvulopatía leve o moderada (tanto insuficiencia como estenosis, mitral o aórtica), episodios de pericarditis o endocarditis, síndrome de las apneas-hipopneas del sueño (SAHS) no tratada con hipoxemia intermitente nocturna significativa, colonización bacteriana (incluyendo la colonización bronquial), enfermedades autoinmunes, obesidad de grado premórbido.
- 3 puntos cada uno: complicaciones de afectaciones de órganos diana por hipertensión arterial (nefroangioesclerosis prediálisis, edema de retina), complicaciones cardioembólicas isquémicas (angina de pecho o infarto agudo de miocardio, isquemia cerebral por enfermedad cerebrovascular o isquemia arterial periférica tratadas o revascularizadas), enfermedad tromboembólica venosa (trombosis venosa profunda en

extremidades inferiores, tromboembolismo pulmonar tratadas), hemorrágica cerebral o aneurisma tratadas, o complicaciones de afectación de órganos diana por diabetes mellitus (úlceras vasculares, nefropatía diabética con síndrome nafrótico o hemorragia retiniana), bradiarritmias que precisan marcapasos con marcapasos, o taquicardias supraventriculares de reentrada tratadas con ablación o arritmias con indicación de desfibrilador autoinducible (DAI) tratadas con DAI, obesidad mórbida tratada.

- 4 puntos cada uno: complicaciones avanzadas de afectaciones de órganos diana por hipertensión o diabetes (nefroangiosclerosis o nefropatía diabética en diálisis, amputaciones), cardiopatía isquémica no revascularizada o complicada, o eventos embolígenos no tratados de forma aguda o sin tratamiento crónico posterior, bradicardias que precisan marcapasos no tratadas con marcapasos, arritmias sin tratamiento, roturas aneurismáticas, obesidad mórbida no tratada.

b.- **riesgo metabólico:** se puntuaron con:

- 1 punto cada uno: diabetes mellitus, dislipemia, hiperuricemia u obesidad de grados I ó II en tratamiento con control adecuado.
- 2 puntos cada uno: diabetes mellitus, dislipemia, hiperuricemia u obesidad de grados I ó II en tratamiento con mal control.
- 3 puntos cada uno: diabetes mellitus, dislipemia, hiperuricemia u obesidad de grado III (premórbida) en tratamiento con mal control y complicaciones menores, u obesidad mórbida tratada con cirugía bariátrica de reducción gástrica.
- 4 puntos cada uno: diabetes mellitus, dislipemia, hiperuricemia u obesidad de grado IV (mórbida) en tratamiento con mal control o complicaciones mayores.

c.- **riesgo de autoinmunidad:** se puntuaron con:

- 1 punto para cualquier enfermedad de origen autoinmune reflejada en la historia clínica incluyendo psoriasis, artritis reumatoide, tiroiditis, o anticuerpos de autoinmunidad en analíticas de inmunología reumática.

d.- **riesgo de inmunosupresión:** se puntuaron con:

- 1 punto para exfumador o exenolismo.
- 2 puntos para fumador activo, hábito enólico activo o drogodependencia.

- 3 puntos para episodios infecciosos activos, colonización bronquial, o estados de inmunosupresión (tratamientos inmunosupresores o corticoideos crónicos o repetidos, antibióticos 3 ó más al año, inmuno deficiencias (VIH, déficit de producción de inmunoglobulinas o de subgrupos de Ig Gs, etc), neoplasias, tratamientos quimioterápicos o radioterápicos, factores de riesgo de broncoaspiración o afectación del aclaramiento mucociliar o fuerza de la tos, alteraciones de barreras epiteliales.

Aunque se trataba de **escalas continuas lógicas**, el hecho de **no estar validadas**, y la **subjetividad y arbitrariedad de marcar puntos de corte** para comparar grupos decidiendo donde estaba el umbral que separaba la afectación sistémica (**cardiovascular, metabólica, autoinmune** o de **inmunosupresión**), de la ausencia o escasez de dicha afectación sistémica, lo que generó cierta **controversia**, no pudiendo decidirnos por unos claros grupos de comparación. Por lo tanto no se realizó la comparación diferencial de expresión génica entre estos grupos sistémicos por este motivo, y en parte también, al tener en cuenta el reducido tamaño muestral de los subgrupos, al no dar previamente significación en los fenotipos pulmonares analizados. Tampoco se valoró **osteoporosis** o **depresión**.

En estos grupos **conviene evaluar que biomarcadores o escalas validadas puedan ser los más representativos para caracterizar dichos fenotipos**. En nuestro caso no utilizamos escalas validadas cardiovasculares como la de Framingham u otras, ni biomarcadores como la proteína C reactiva o la trombopoyetina, además de que no se disponía de ellos de forma rutinaria.

Así mismo, los fenotipos de **anemia** o de **poliglobulia** representaban la excepción, con escasos pacientes, lo que imposibilitó la comparación de su expresión génica diferencial como grupos a parte.

Se consideró que el **enfisema y los fenotipos de consumo o hábito tabáquico** previamente enumerados eran los **más fiables** para realizar las comparaciones.

Actualmente, también otros estudios genéticos de cohortes más amplias han fallado en valorar la expresión diferencial comparada de los distintos grupos fenotípicos de la EPOC, a excepción de que fueran sesgadamente un fenotipo en concreto de la enfermedad, como el del enfisema grave avanzado del National Emphysema Treatment Trial (NETT) o EPOCs graves de inicio precoz en el Early-Onset COPD (EOCOPD) de Boston.

7. Consideraciones para futuros estudios de fenotipado en EPOC.

Para el estudio adecuado de los fenotipos pulmonares y sistémicos, además de recoger de forma exhaustiva toda una serie de **variables de interés en unas bases de datos extensas** como las muestras del biobanco, se precisa de:

- 1) **marcadores biológicos o técnicas de diagnóstico fiables y objetivas;**
- 2) **criterios consensuados y fiables diagnósticos;**
- 3) valorar el **tipo de muestras** utilizado y su localización;
- 4) valorar el **tipo de pacientes** representados.

Sin embargo, convendría apuntar algunas **apreciaciones** que se deberían tener en cuenta en futuros estudios sobre expresión génica de fenotipos pulmonares en la EPOC especialmente a partir de tejido pulmonar procedentes de biobancos o redes de biobancos de tejido pulmonar:

1) Todavía existe un cierto **debate y controversia** sobre cuáles son estos **fenotipos pulmonares** que se deben estudiar en la EPOC. Y por lo tanto, a falta de este primer paso, ya dado en asma, no se ha proseguido con el segundo, que es el de la subdivisión de los fenotipos en endotipos o grupos con unas vías moleculares etiopatogénicas de sobreexpresión preponderante similares. Si esto sigue estando así ahora, en 2004-2005, que es cuando diseñamos las bases de datos del biobanco para el estudio de los fenotipos de la EPOC, todavía el tema estaba aún más en ciernes.

- En cualquier caso, los **fenotipos pulmonares puros** en la EPOC son **escasos**, y en la mayor parte de los casos se **mezclan de forma variable y compleja** características con afectación preponderante de unos o de otros en mayor o menor grado, y en unas u otras localizaciones.

En este sentido, tomando en cuenta, por ejemplo, fenotipos estructurales anatomopatológicos como el enfisema (afectación del parénquima pulmonar), bronquiolitis (pequeña vía aérea periférica) y bronquitis crónica (vía aérea bronquial): **las vías moleculares etiopatológicas implicadas varían en expresión atendiendo a la localización preponderante**, pudiendo estar sobreexpresadas las mismas vías en una localización (contribuyendo al remodelado peribronquiolar por ejemplo), y reprimidas en otras localizaciones (contribuyendo al enfisema, por ejemplo, más distalmente).

- Sobre la **objetivación o caracterización** documentada de los fenotipos estructurales anteriormente mencionados (enfisema, bronquiolitis o bronquitis crónica) se deben de tener presentes algunas consideraciones a la hora de evaluar los cortes histológicos:
 - La **localización** de las muestras biópsicas extraídas de tejido pulmonar:
 - En la mayoría de nuestros pacientes fueron de **lóbulos superiores**, al ser la localización más frecuente de presentación de nódulos pulmonares y de cánceres de pulmón; y en muchos casos podrían ser **valorables del enfisema centrolobulillar preponderante** en la EPOC que predomina también en lóbulos superiores.
 - En la mayoría de nuestros pacientes fueron **cuñas subpleurales** de un considerable tamaño (3x1 cm) con predominio de tejido de parénquima pulmonar consistente en alvéolos y vía aérea periférica más distal. Por lo tanto, se podían observar lesiones de **enfisema**, y ocasionalmente de **bronquiolitis**. Las lesiones de **bronquitis crónica** de afectación bronquial algo más proximal, estarían por tanto, algo **menos representadas**, atendiendo a la porciones periféricas preponderantes de donde se extrajeron las cuñas biópsicas.
 - En comparación con los cortes histológicos biópsicos de pulmones de ratón, donde se puede realizar una preparación previa de los pulmones escindidos para garantizar la expansión alveolar, y donde existen mediciones objetivas del enfisema provocado en modelos experimentales mediante la medición de la distancia de la línea media interlamilar, en las **biopsias de tejido pulmonar humano**, al no poder realizar dicha preparación, el parénquima pulmonar se encuentra más desestructurado, **sin haber mediciones objetivas** que puedan **cuantificar el grado de enfisema** del mismo modo. En ellas precisa de la **valoración subjetiva**, en algunos casos de un anatomopatólogo experto.
 - Actualmente existen técnicas de imagen por **Tomografía Axial Computerizada (TAC) torácica** con una alta correlación con la Anatomía Patológica que permiten el **diagnóstico y cuantificación objetivos del enfisema pulmonar y del engrosamiento peribronquial** (lesión característica de la bronquitis crónica), que desde nuestro punto de vista deberían de ser utilizadas en todos los casos para poder diagnosticar y cuantificar el grado de afectación por estos dos fenotipos pulmonares, siempre intentando corroborar la correlación con la visión histológica del tejido extirpado y analizado para su expresión génica. No obstante, no se dispone de TACs con dichos avances tecnológicos en todos los hospitales,

aunque sería bueno poder tenerlos en al menos aquellos que sean nodos de una red de biobancos de tejido pulmonar con Cirugía Torácica para la valoración prequirúrgica de los pacientes que van a proporcionar muestras al mismo, y así poder caracterizar objetivamente dichos 2 fenotipos.

En nuestro estudio, y pese a no disponer de estos avances tecnológicos en 2005 y 2006, se realizaron **TACs torácicos** preoperatorios en todos los casos, algunos de ellos de alta resolución la minoría, que fueron **revalorados doblemente por 2 radiólogos expertos en TAC torácico**, entre otras cosas, para confirmar el diagnóstico de enfisema y, en caso positivo, clasificar su tipo y localización, y valorar la presencia de otros fenotipos pulmonares como bronquiectasias o comorbilidades excluyentes (lesiones posttuberculosis pulmonar, neumopatía intersticial, neumonía, etc).

Desgraciadamente no disponían de las técnicas actuales para cuantificar el engrosamiento bronquial o el grado y distribución de la atenuación del parénquima pulmonar del enfisema. Hubo un índice kappa de coincidencia entre ambos alto de casi el 94%. Los escasos casos discrepantes fueron consensuados finalmente entre ellos. Ello proporcionó algunos diagnósticos de enfisema que no figuraban en los informes convencionales de los TACs preoperatorios. Por tanto, consideramos el diagnóstico de los casos por TAC de enfisema altamente fiable, dado que se buscó concienzudamente, aunque debido a la no utilización de TAC de alta resolución en todos los casos, sino más bien en una minoría, no podríamos descartar la posibilidad de un mínimo infradiagnóstico de algunos de los casos más leves iniciales, que podrían haberse evaluado mejor con los cortes más finos de un TAC de alta resolución.

En cualquier caso, la valoración preoperatoria del cáncer de pulmón, sigue realizándose en la mayoría de casos y en casi todos los centros hospitalarios con TACs helicoidales toracoabdominales altos con contraste endovenoso para el preestadiaje también de las adenopatías. No obstante, han mejorado mucho su resolución acercándose bastante a la de los de la alta resolución. Pero, es difícil que puedan extenderse a todos los centros los TACs de última generación con software para el cálculo, la cuantificación y la distribución del grado de atenuación del enfisema o del engrosamiento bronquial.

Por todo esto, será importante consensuar de manera unívoca definiciones uniformes de enfisema y de engrosamiento bronquial, y métodos objetivos para su cuantificación de forma fiable e igual para todos los nodos de una red de biobancos de tejido pulmonar, adaptándose a la tecnología que se vaya a utilizar.

Teniendo todo esto en cuenta, y sabiendo que no disponíamos de una medida objetiva de cuantificación del enfisema en los cortes histológicos, a diferencia de lo que pasa en los pulmones más pequeños de ratón, tomamos como estándar para el diagnóstico de enfisema el diagnóstico radiológico por TAC. Los casos diagnosticados de enfisema por TAC fueron confirmados igualmente por nosotros en la visión microscópica de los cortes histológicos, asesorados por una anatomopatóloga, aunque no pudimos contar con una anatomopatóloga experta que accediera a confirmar todos los cortes histológicos.

Igualmente, recopilamos en las bases de datos toda una serie de variables antropométricas (índice de masa corporal) y funcionales respiratorias (de difusión alveolar: DLCO=difusión alveolar del monóxido de carbono, KCO=cociente DLCO/volumen alveolar; y de atrapamiento aéreo/hiperinsuflación pulmonar: VR= volumen residual o VR/TLC= cociente entre el volumen residual y la capacidad pulmonar total. Todos ellos, y también inversamente la capacidad inspiratoria (CI) – de la que no disponíamos de forma rutinaria- se habían correlacionado en otros estudios con el grado de enfisema pulmonar del TAC, en mayor medida que la obstrucción bronquial y su progresión, marcados por el volumen espiratorio forzado en el primer segundo (FEV1) y su caída.

En nuestro caso, también el parámetro funcional que más se correlacionó con los casos y gravedad del enfisema diagnosticados por TAC fue la DLCO.

Sin embargo, no podíamos basarnos exclusivamente en la disminución de la difusión de CO como diagnóstico de enfisema, debido al sesgo del cáncer de pulmón y de que algunos pacientes habían recibido quimio y/o radioterapia neoadyuvantes previas a la cirugía; y del mismo modo había pacientes EPOC que podían haber desarrollado cierto grado de hipertensión pulmonar con disminución secundaria de la misma DLCO, factor no descartado con ecocardiografías o cateterismos de forma rutinaria.

También la disminución del índice de masa corporal (IMC) y la caquexia podían estar relacionados en muchos de los casos, de forma sesgada, con el cáncer.

2) El tipo de pacientes estudiados tributarios de Cirugía Torácica, llevaba intrínseco **sesgos** que hay que tener en cuenta:

- El **sesgo del cáncer** se evaluó en la expresión génica, haciendo difícil la interpretación de la expresión diferencial plausible de ciertas vías moleculares en EPOC que también están expresadas diferencialmente en cáncer.

Así, algunos factores angiogénicos se han visto sobreexpresados en EPOC, induciendo neovascularización colateral y permeabilidad vascular que permita la quimiotaxis celular a nivel peribronquial y peribronquiolar.

En enfisema, el factor de crecimiento vasculoendotelial (VEGF) se ha visto aumentado también como protección inicialmente, aunque también se ha hipotetizado y mostrado modelos experimentales en ratones de enfisema inducido por la supresión o inhibición de sus receptores como una posible causa del mismo.

Pero no obstante, también tienen su papel en la neovascularización del cáncer o en la fibrosis peribronquial del remodelado de la pequeña vía aérea de la EPOC.

Por lo tanto la interpretación de sus resultados puede ser más compleja y precisar de estudios funcionales asociados.

- La expresión diferencial de **vías implicadas en distintos cánceres de pulmón o relacionados con el tabaco**, podría estar **sesgada** por tratarse de pacientes con **cáncer**.
- La expresión diferencial de **otros tipos de cánceres** podría estar sesgada, cosa que se tiene en cuenta en los resultados:
 - Los pacientes con **cáncer de colon** con metástasis únicas pulmonares con indicación de resección quirúrgica, mayoritariamente eran **más jóvenes y mujeres, y no fumadoras**, estando pues, en su mayoría, en el **grupo de control no EPOC**.
 - Las vías de algunos tipos de **cánceres más frecuentes en mujeres** se expresan de forma diferencial en el grupo de **controles no EPOC**, porque existía este **sesgo de más pacientes mujeres en el grupo no EPOC**.

8. Importancia de las vías moleculares expresadas diferencialmente en la patogenia de la EPOC.

Todos estas **limitaciones** de nuestro estudio piloto, no invalidan sus resultados en cuanto a la expresión génica diferencial en la EPOC de algunas vías estructurales que en muchos casos entrelazan receptores como **CCR3** y **CCR4** importantes en la inducción de la **quimiotaxis y acúmulo de linfocitos T CD8+ en el pulmón**, pero también implicados en la **activación eosinófila en las agudizaciones** de la EPOC, u otros **acoplados a proteínas G** implicados en múltiples procesos celulares, entre ellos los de la **hipersecreción glandular bronquial, la contracción y relajación de la musculatura lisa peribronquial**, mediante **receptores muscarínicos colinérgicos y beta2-adrenérgicos**. Otros receptores muscarínicos nicotínicos ya habían sido relacionados con susceptibilidad a EPOC y dependencia tabáquica.

Así mismo resalta la importancia en la EPOC de los sistemas de fosforilación para la transmisión de la señal intracelular en muchas de las células implicadas por medio de las mitogen-activated protein kinases (**MAP kinasas**: ERK 1 / 2, p38 y JNK) en el estímulo de la proliferación celular y proinflamatorio activando el factor nuclear kappa B (**NFkB**), que ya está siendo un campo prioritario de la investigación farmacológica en **dianas terapéuticas** del futuro inmediato de la EPOC. La importancia del **citoesqueleto (uniones GAP y estrechas)** y de la **integridad de la barrera epitelio-endotelio-mesenquimal** y de la **reparación celular**, como indica la expresión diferencial de las vías de los factores de crecimiento epitelial (**EGF**), vasculoendotelial (**VEGF**), y de los derivados plaquetares (**PDGF**), e factor transformador de crecimiento beta (**TGF-b**), la eritropoyetina (**EPO**), la trombopoyetina (**TPO**) y del óxido nítrico (**NO1**). El papel preponderante de la matriz celular y del equilibrio proteasas-antiproteasas en la EPOC con vías de expresión diferencial como la de la matriz extracelular (**ECM**) (506,507), la integrina (**INTEGRIN**), los receptores de las metaloproteasas (**MPR**), la M-calpaína (**MCALPAIN**) o de los receptores de alfa1 antitripsina (**ATR1**).

Y también la función de interleucinas como **IL 2, 3 y 5** que pudieran hacer sospechar un mayor protagonismo o no de los eosinófilos en la EPOC, y especialmente después de que se haya demostrado en asma del adulto la activación neutrofílica a través de inducción eosinofílica por estimulación del humo del tabaco e infecciones por virus y bacterias, utilizando receptores de reconocimiento de membrana (toll-like receptors: TLRs 3 y 4).

Y la de el factor de necrosis tumoral alfa (**TNF-a**) e interferón alfa (**IFN-a**), lo que reclama el papel del epitelio de la vía aérea en el inicio en muchos casos de la respuesta inflamatoria también en la EPOC.

Todo ello respalda ciertas hipótesis etiopatogénicas previas de la EPOC, que **deberían ser confirmadas con estudios de mapeo fino génico y de replicación** de dichas vías a nivel intracelular a partir de las muestras de tejido pulmonar de los pacientes con EPOC.

Las limitaciones de nuestro estudio piloto, en su mayor parte debidas a un **tamaño muestral limitado**, al sernos restringido el acceso a más muestras de tejido pulmonar del biobanco a partir del final del segundo año de recogida, pueden ser superadas por medio de un **aumento suficiente del tamaño muestral** con la adición exponencial de las muestras de **múltiples biobancos en red** con utilización de protocolos y bases de datos comunes y consensuados. Es por esto por lo que sentamos y trabajamos las bases de funcionamiento de la futura **Red Nacional Respira de Biobancos de Tejido Pulmonar**, actualmente constituida como **Plataforma de Biobancos de Tejido Pulmonar de la Red Respira**.

Así mismo, además de establecer sus **protocolos y bases de recogida de datos exhaustivas** que ya iniciamos y estuvimos utilizando para poner en marcha el Biobanco de Tejido Pulmonar del Hospital Son Dureta de Palma de Mallorca, actualmente continuado en el nuevo hospital, con el Biobanco de Tejido Pulmonar del Hospital de Son Espases, cabría adecuar estas bases de datos según las **definiciones consensuadas de los fenotipos pulmonares y sistémicos de la EPOC** que se quieran estudiar, optimizando su diagnóstico por medio de pruebas de imagen y biomarcadores lo más objetivos posibles, con correlación histológica valorada por anatomopatólogos expertos, unificando y protocolizando el estudio de los mismos de forma rutinaria, y con los procedimientos extra que se requieran, en todas las muestras de los pacientes de la Red de Biobancos de Tejido Pulmonar.

9. Características de los pacientes EPOC del Biobanco de Tejido Pulmonar del Hospital de Son Dureta.

La población de los pacientes EPOC representados en el Biobanco de Tejido Pulmonar del Hospital de Son Dureta en nuestro estudio piloto de expresión génica diferencial, denota lo que pueden ser los **sesgos epidemiológicos de la población de otros biobancos de tejido pulmonar o redes de biobancos que obtengan las muestras de intervenciones de Cirugía Torácica** con indicaciones prioritarias por cáncer, sobre todo de pulmón:

- 1) Mayoritaria indicación de la cirugía por **comorbilidad de cáncer de pulmón** (a tener en cuenta la expresión génica diferencial).
- 2) **EPOC y enfisemas con niveles de gravedad y obstrucción más leves** que la media de los valorados en una consulta neumológica o durante los ingresos hospitalarios, dado que han tenido que pasar el filtro funcional para considerarlos operable.

- 3) **Menor número de mujeres** que en el grupo de controles no EPOC (por el sesgo de una mayor cantidad de pacientes con metástasis pulmonares únicas de cáncer de colon).
- 4) **discreta mayor edad** media en el grupo de EPOC, también por el mismo sesgo, al ser los pacientes con cáncer de colon normalmente más jóvenes que los de pulmón, y no tener tanta relación con el tabaco.

10. Interpretación de posibles sesgos.

Estos sesgos en relación a la población representada, se deben de tener presentes a la hora de comparar con otros estudios de expresión génica diferencial de pacientes EPOC de subpoblaciones muy específicas y no muy equiparables como los del National Emphysema Treatment Trial (NETT) de enfisemas graves avanzados o del Early-Onset COPD de EPOC precoces graves.

11. Apreciaciones para futuros estudios.

Es importante a la hora de enfocar y planificar los nuevos estudios de expresión diferencial de pacientes EPOC y de los distintos fenotipos de la enfermedad a partir de muestras de redes de biobancos de tejido pulmonar, tener en cuenta todas estas premisas para:

- 1) utilizar una **definición funcional de EPOC consensuada y objetiva** basada en las **guías** de práctica clínica actualizadas (**GOLD** en nuestro caso), como hicimos en nuestro estudio; y no definiciones subjetivas arbitrarias del médico que atiende al paciente, como se ha realizado en otros estudios;
- 2) usar una **definición objetiva y consensuada de los fenotipos pulmonares y sistémicos de la EPOC**, ateniéndose a **pruebas objetivas de imagen** (por ejemplo la **atenuación** del enfisema, o la medida del **engrosamiento bronquial** en bronquitis crónica, ambos medidos en TACs de nueva generación) **o biomarcadores aceptados**, a ser posible correlacionadas con los cortes histológicos.
- 3) valorar los **sesgos de la población representada** en las muestras del biobanco.

CONCLUSIONES

La EPOC parece una enfermedad compleja con múltiples fenotipos que presentan asociaciones débiles de múltiples genes de distintas vías moleculares con la susceptibilidad a la misma, y excepcionalmente asociaciones fuertes de genes muy infrecuentes o raros como el SERPINA 1 del déficit de alfa-1 antitripsina.

De nuestra experiencia en la puesta en marcha del Biobanco de Tejido Pulmonar del Hospital de Son Dureta, del estudio piloto de expresión génica diferencial de los pacientes con EPOC y para el intento de estudio de sus fenotipos, y también el de la adecuación de las bases de funcionamiento de una Red Nacional de Biobancos de Tejido Pulmonar, coincidimos en que es **necesaria la adición exponencial de pacientes en una red de biobancos para conseguir tamaños muestrales suficientes** que puedan brindar poder estadístico a los genes expresados diferencialmente con asociaciones débiles y poder llegar a detectar casos extraños con asociaciones fuertes; y a su vez también, una **definición clara, objetiva, consensuada y uniforme de los fenotipos.**

Nuestro estudio piloto sobre la expresión génica diferencial de los pacientes EPOC a partir de muestras obtenidas del biobanco de tejido pulmonar pone de manifiesto la importancia de algunas vías moleculares que deben de estudiarse en profundidad con mapeo fino y replicación de sus genes en las células inflamatorias implicadas en la patogénesis de la EPOC para poder confirmar hipótesis etiopatogénicas: algunas vías estructurales que en muchos casos entrelazan receptores como **CCR3** y **CCR4** importantes en la inducción de la **quimiotaxis y acúmulo de linfocitos T CD8+ en el pulmón**, también implicados en la **activación eosinófila en las agudizaciones** de la EPOC; u otros **acoplados a proteínas G** implicados en múltiples procesos celulares, entre ellos los de la **hipersecreción glandular bronquial, la contracción y relajación de la musculatura lisa peribronquial**, mediante **receptores muscarínicos colinérgicos y beta2-adrenérgicos**; resalta la importancia en la EPOC de los sistemas de fosforilación para la transmisión de la señal intracelular en muchas de las células implicadas por medio de las mitogen-activated protein kinases (**MAP kinasas**: ERK 1 / 2, p38 y JNK) en el estímulo de la proliferación celular y proinflamatorio activando el factor nuclear kappa B (**NFkB**), que ya está siendo un campo prioritario de la investigación farmacológica en **dianas terapéuticas** del futuro inmediato de la EPOC; la transcendencia del **citoesqueleto (uniones GAP y estrechas)** y de la **integridad de la barrera epitelio-endotelio-mesenquimal** y de la **reparación celular**, como indica la expresión diferencial de las vías de los factores de crecimiento epitelial (**EGF**), vasculoendotelial (**VEGF**), y de los derivados plaquetares (**PDGF**), el factor transformador de crecimiento beta (**TGF-b**), la eritropoyetina (**EPO**), la trombopoietina (**TPO**) y del óxido nítrico (**NO1**); el papel preponderante de la matriz celular y del equilibrio proteasas-antiproteasas en la EPOC con vías de expresión diferencial como la de la **matriz extracelular (ECM)**, la integrina (**INTEGRIN**), los receptores de las metaloproteasas (**MPR**), la M-calpaína (**MCALPAIN**) o de los receptores de alfa1 antitripsina

(**ATR1**). Y también la función de **interleucinas** como **IL 2, 3 y 5** que pudieran hacer sospechar un mayor protagonismo o no de los **eosinófilos** en la EPOC, y especialmente después de que se haya demostrado en asma del adulto la activación neutrofílica a través de inducción eosinofílica por estimulación del humo del tabaco e infecciones por virus y bacterias, utilizando receptores de reconocimiento de membrana (toll-like receptors: TLRs 3 y 4). Y la del factor de necrosis tumoral alfa (**TNF-a**) e interferón alfa (**IFN-a**), reivindicando el papel del **epitelio de la vía aérea** en el inicio en muchos casos de la respuesta inflamatoria también en la EPOC.

Sesgos como los diagnósticos oncológicos, la edad y el sexo deben ser valorados.

Los pacientes con EPOC del biobanco, y probablemente los de redes de biobancos de tejido pulmonar obtenidos de cirugía torácica general de resección pulmonar, representan un espectro de EPOC más leve-moderado que los que se presentan habitualmente en la Consulta de Neumología habitual, puesto que precisan cumplir unos criterios funcionales estrictos de operabilidad. Por tanto, la comparabilidad de su expresión génica diferencial puede no ser del todo equiparable a la de otros cohortes que siguen pacientes más graves como los del National Emphysema Treatment Trial o del Early-Onset COPD.