

eman ta zabal zazu



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

Tesis Doctoral

**Papel del Inflamasoma en la EPOC estable y
agudizada**

Patricia Sobradillo Ecenarro

Noviembre de 2021

Directoras:

Rosa Faner Canet, PhD

Nuria Marina Malanda, PhD, M.D.

A mi padre, por contagiarme su amor por la neumología y mostrarme cada día la clase médico y persona que quiero ser

“Cada día sabemos más y entendemos menos”
Albert Einstein

AGRADECIMIENTOS

La historia de esta tesis es la historia de mi vida: un camino largo que ha tenido sus momentos mejores y peores, sus dudas e incertidumbres. Pero que, como la vida, ha estado llena de aprendizajes. Y este camino no habría sido posible sin toda la gente con la que he tenido la suerte de compartirlo.

A Álvaro por enseñarme a “pescar” en el mundo de la investigación, por estar siempre ahí y convertirme en mi “padrino neumológico”. Gracias por creer en mí.

A Gemma, por adoptarme y hacerme sentir en casa. A Belén, Álvaro e Inés por hacerme sentir parte de la familia y por compartir esos partidos de fútbol.

A Rosa, que me lo ha enseñado todo de un laboratorio, gracias por no perder la paciencia y hacer la inmunología y la neumología totalmente compatibles.

A Nuri, porque el aprendiz ha superado al maestro; hace mucho que empezamos a recorrer este camino juntas y espero que sigamos siendo compañeras de viaje mucho tiempo.

A Beatriz, por no dejar de confiar en mí.

A mis padres por enseñarme que para “evolucionar hay que probar” y ser mi apoyo durante tantos años de estudio. He tenido el mejor ejemplo del mundo. A mis hermanos, por entender que les ha tocado una hermana “empollona y friqui” y quererme así.

A todos mis amigos, gracias por quererme “mucho y bien” y entender que mi amor por la investigación me roba tiempo de estas con vosotros.

A María y Alba por ser mi todo y demostrarme cada día que no hay imposibles si te atreves a soñarlo. Gracias por darme fuerza, cariño y confianza en mí misma.

ABREVIATURAS

AIM2: absent in melanoma 2, ausente en melanoma 2

ATP: adenosine triphosphate adenosín trifosfato

BAL: Bronchoalveolar lavage, lavado broncoalveolar

COPD: Chronic Obstructive Pulmonary Disease

CXCL: Chemokine Ligand, ligando de quimioquinas

DAMP: damage-associated molecular patterns, patrones moleculares asociados a daño

DNA: Deoxyribonucleic Acid, ácido desoxirribonucleico

EPOC: Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica

FEV1%: Forced expiratory volume in 1 s as a percentage of predicted, Volumen espirado forzado en el primer segundo en porcentaje del teórico

GOLD: Global Initiative for Obstructive Lung Disease

IF: Immunofluorescence, inmunofluorescencia

IFN γ : Interferon Gamma

IL: Interleucina

LPS: lipopolysaccharides, lipopolisacáridos

LRRs: leucine rich repeats, repeticiones ricas en leucina

LTB4: leucotrieno B4

MDP: muramyl dipeptide, muramil dipéptido

NF- κ B: nuclear factor kappa- β , factor nuclear kappa- β

NK: células natural killer

NLR: Nod like receptors, receptores tipo Nod

OTU: operational taxonomic unit; unidad taxonómica funcional

PAMP: pathogen-associated molecular patterns, patrones moleculares asociados a patógenos

PBMCs: peripheral mononuclear cells, células mononucleares periféricas

PRR: pattern recognition receptors, receptor de reconocimiento de patrones

qPCR: quantitative Polymerase Chain Reaction, reacción en cadena de polimerasa cuantitativa
PCR: C reactive protein, proteína C reactiva

RNA: Ribonucleic Acid, ácido ribonucleico

ROS: Reactive oxygen species, especies reactivas de oxígeno

TGF- β : β -Transforming growth factor, factor de crecimiento transformante- β

TLR: Toll like receptors, receptores de tipo Toll

TNF: tumoral necrosis factor, factor de necrosis tumoral

ÍNDICE

1	RESUMEN	1
1.1	ABSTRACT	5
1.2	LABURPENA	7
2	INTRODUCCIÓN	9
2.1	EPOC	11
2.1.1	Qué es la EPOC.....	11
2.1.2	Prevalencia.....	11
2.1.3	Microbioma en la EPOC	12
2.1.4	Agudizaciones	14
2.1.5	Costes de la EPOC y de sus agudizaciones	18
2.2	Complejidad de la EPOC	19
2.2.1	Enfermedad heterogénea	19
2.2.2	Fenotipos y endotipos.....	20
2.3	Características de la respuesta inmune relacionada con la EPOC.....	20
2.3.1	Respuesta inmune innata en la EPOC	21
2.3.2	Papel del sistema inmune adquirido en la EPOC	31
2.3.3	Mediadores inflamatorios.....	32
2.3.4	El estrés oxidativo	33
2.3.5	Inflamación sistémica en los pacientes con EPOC	34
3	HIPÓTESIS DE TRABAJO	35
3.1	Objetivos específicos:	¡Error! Marcador no definido.
4	OBJETIVOS.....	39
4.1	Objetivos específicos:	41
5	MÉTODOS.....	43
5.1	Diseño del estudio y ética.....	45
5.2	Participantes.....	45
5.3	Obtención de muestras	46
5.3.1	Función pulmonar	46
5.3.2	Muestras sanguíneas	46
5.3.3	Espuito	46
5.3.4	Muestras pulmonares	47
5.4	Mediciones	47
5.4.1	Concentración de citocinas en suero	47
5.4.2	Niveles de IL-1, IL-18 y de caspasa-1 en pulmón y esputo	47
5.4.3	Actividad de caspasa 1 en sangre periférica	48

5.4.4	Expresión de mRNA de pulmón	48
5.4.5	Evaluación de la activación del inflamasoma.....	49
5.4.6	Distribución de la caspasa-1 y el ASC en tejido pulmonar	50
5.4.7	Respuesta funcional in vitro del inflamasoma NLRP3.....	50
5.4.8	Microbiología	51
5.5	Análisis estadístico.....	51
6	RESULTADOS	53
6.1	Papel del inflamasoma en la EPOC Estable	55
6.1.1	Tejido pulmonar	55
6.1.2	Papel del inflamasoma en EPOC estable a nivel periférico	63
6.2	Inflamasoma en EPOC Agudizado.....	67
6.2.1	Características generales de la muestra	67
6.2.2	Mediadores del inflamasoma: Agudización vs Recuperación	68
6.2.3	Correlación entre marcadores en plasma y suero	68
6.2.4	Correlación entre los distintos marcadores de activación del inflamasoma	69
6.2.5	Marcadores de inflamasoma según la naturaleza de la agudización.....	69
6.2.6	Niveles de caspasa-1, IL-1 β e IL-18 en esputo	70
6.2.7	ASC	71
6.3	Capacidad funcional de respuesta a ligandos infecciosos y activación del inflamasoma	71
6.3.1	Respuesta a Ligandos de Inflamasoma	72
6.3.2	Respuesta a Agonistas de TLRs y NLRs.....	73
7	DISCUSIÓN	79
7.1	Principales resultados.....	81
7.2	Estudios previos.....	81
7.3	Interpretación de resultados	85
7.4	Fortalezas y Limitaciones.....	88
7.5	Implicaciones clínicas	88
8	CONCLUSIONES	91
9	BIBLIOGRAFÍA.....	95
10	ANEXOS.....	109

ÍNDICE FIGURAS

Figura 1 Cambios en la prevalencia en España (global, en hombre y mujeres) desde 1998 hasta 2018.	12
Figura 2 Grupos bacterianos que distinguen el microbioma en sujetos sanos y en pacientes con EPOC.	14
Figura 3 Representación proporcional de los grupos de agudizaciones de la EPOC en elipsoides tridimensionales.	15
Figura 4 Respuestas inmunitarias adaptativas e innatas en la enfermedad respiratoria crónica	21
Figura 5 Estructura esquemática de NLRP, ASC y caspasa-1.	25
Figura 6 Componentes del inflamasoma NLRP3	26
Figura 7 Representación gráfica de la formación del inflamasoma.....	26
Figura 8 Proceso de activación del inflamasoma NLRP3 en dos pasos.....	28
Figura 9 Distribución de las muestras incluidas en el estudio.	46
Figura 10 a) Expresión de caspasa-1 en células del epitelio pulmonar y en células inflamatorias. b) Porcentaje de macrófagos teñidos por Caspasa-1 en los diferentes grupos de pacientes. No se observaron diferencias significativas	56
Figura 11 Expresión Caspasa-1, IL1 β , IL-1RA, NLRP3 e IL-18 en tejido pulmonar.	57
Figura 12. La expresión de NLRP3 en pacientes con EPOC tanto fumadores activos como exfumadores.....	58
Figura 13 Correlación de Spearman de los niveles de expresión del mRNA NLRP3 y de IL1B en el pulmón de pacientes con EPOC estable con el volumen espirado en el primer segundo (FEV1 % del teórico).	58
Figura 14 Niveles de expresión de los mediadores relativos del inflamasoma y mediadores inflamatorios.	59
Figura 15 Valores proteicos en tejido de pulmón de Interleucina (IL)-1 β , IL-18, caspasa-1 e IL-1RA.	60
Figura 16 Impacto del estado tabáquico de los pacientes con EPOC en los niveles de citocinas mediadas por el inflamasoma.	60
Figura 17 El inflamasoma no está activado en la EPOC estable.	62
Figura 18 El inflamasoma no está activado en EPOC estable.	63
Figura 19 A) Mediadores del inflamasoma en suero y B) su correlación con los niveles de FEV1%.	65
Figura 20 Correlación de los marcadores del inflamasoma en sangre y tejido pulmonar.	65
Figura 21 Actividad del inflamasoma en PBMCS.....	66
Figura 22 Mediadores del inflamasoma en esputo y plasma de pacientes durante la agudización y estabilidad.	68
Figura 23 Correlación de los mediadores del inflamasoma en suero y esputo en fase de agudización.....	69
Figura 24 Distribución de las agudizaciones infecciosas en función de su etiología	70
Figura 25 Niveles de mediadores del inflamasoma según el tipo de agudización	70
Figura 26 Western blot representativo de ASC para muestras de esputo de paciente agudizados.....	71
Figura 27 Capacidad de respuesta del inflamasoma medida como producción de IL-1 β en los diferentes grupos a estudio.	73

Figura 28 Diferencias en la producción de IL-1 β en respuesta a Agonistas del inflammasoma en agudización vs. Estabilidad.....	73
Figura 29 Diferencias en la producción de IL-1 β en respuesta a Agonistas de TLRs, NOD1 y NOD2.	74
Figura 30 Diferencias en la producción de IL-1 β en respuesta a Agonistas de NOD1 y NOD2.	75
Figura 31 Diferencias en la producción de IL-6 en respuesta a Agonistas de TLRs, NOD1 y NOD2.	76
Figura 32 Diferencias en la producción de TNF- α en respuesta a Agonistas de TLRs, NOD1 y NOD2.	77
Figura 33 Diferencias en la producción de IL1 β en respuesta a Agonistas de TLRs, NOD1 y NOD2 en pacientes EPOC con obstrucción moderada vs. Severa y muy severa	78

ÍNDICE TABLAS

Tabla 1 Primers utilizados para la cuantificación de SybrGreen.....	49
Tabla 2 Características clínicas principales de los pacientes con EPOC estudiados a nivel pulmonar.	55
Tabla 3 Valores proteicos en tejido de pulmón de Interleucina caspasa-1, IL-1 β , IL-18, e IL-1RA en función de si los pacientes recibían o no tratamiento con corticoides inhalado.	61
Tabla 4 Características clínicas principales de los pacientes con EPOC estudiados a nivel periférico, subgrupo de estimulaciones.....	64
Tabla 5 Características generales de los pacientes estudiados durante la agudización.	67
Tabla 6 Niveles de leucocitos, neutrófilos, linfocitos y PCR durante la agudización y en la recuperación.	68
Tabla 7 Valores de Rho en las relaciones entre distintos marcadores de activación del inflammasoma.....	69
Tabla 8 Características generales de la muestra incluida para el estudio de la Capacidad funcional de respuesta a ligandos infecciosos y activación del inflammasoma.	72

1 RESUMEN

La EPOC se caracteriza por una respuesta inflamatoria exagerada frente a la inhalación de humo del tabaco, más evidente durante las fases de agudización de la enfermedad. El inflamasoma, un complejo multiproteico participante en la inmunidad innata, es estimulado a través de receptores toll-like y NOD-like y conlleva a la activación de la caspasa-1 y el procesamiento de la proIL1 y la proIL18 en sus formas maduras activas (IL1b e IL18). Debido al papel central de la IL-1b en la inflamación, la activación del inflamasoma está muy regulada, siendo necesarias dos señales (1ª cebado y 2ª activación) para poder desencadenar su respuesta. La actividad biológica de IL1 b es regulada por el antagonista endógeno de su receptor (IL1RA). El posible papel del inflamasoma y sus citocinas asociadas en la EPOC no está claro.

La hipótesis de este trabajo fue que la actividad del inflamasoma está aumentada en pacientes con EPOC, especialmente durante las agudizaciones.

Para demostrar esta hipótesis de trabajo, investigamos el estado del inflamasoma NLRP3, y sus citocinas asociadas en: 1) muestras de tejido pulmonar de 38 pacientes con enfermedad estable EPOC, 15 fumadores con espirometría normal y 14 nunca fumadores; y 2) muestras de esputo y plasma de 56 pacientes con agudización de EPOC, de los cuales 41 pudieron ser reevaluados en la recuperación clínica.

Los principales resultados indican que: 1) en muestras de tejido pulmonar de pacientes con EPOC estable, el ARNm de NLRP3 e interleucina (IL)-1 β estaban elevados. Pero tanto la caspasa-1 como la ASC estaban en su mayoría en forma inactiva, y 2) durante las agudizaciones de origen infeccioso, caspasa-1, ASC oligomérico y sus citocinas asociadas (IL-1 β , IL-18) estaban significativamente aumentadas en esputo en comparación con la recuperación clínica posterior.

De estos resultados, concluimos que el inflamasoma NLRP3 está cebado, pero no se activa, en los pulmones de pacientes con EPOC clínicamente estable. Pero, la activación del inflamasoma se alcanza durante las agudizaciones infecciosas, a través de una segunda señal infecciosa. Por todo ello, los resultados de este estudio sugieren que el inflamasoma participa en el estallido inflamatorio que ocurre durante las agudizaciones infecciosas.

1.1 ABSTRACT

COPD is characterized by an exaggerated inflammatory response to tobacco smoke inhalation, more evident during the exacerbation phases of the disease. The inflammasome, a multiprotein complex that participates in innate immunity, is stimulated through toll-like and NOD-like receptors and leads to the activation of caspase-1 and the processing of proIL1 and proIL18 in their active mature forms (IL1 β and IL18). Due to the central role of IL-1 β in inflammation, the activation of the inflammasome is highly regulated, requiring two signals (first priming and second activation) to be able to trigger its response. The biological activity of IL1 β is regulated by the endogenous antagonist of its receptor (IL1RA). The possible role of the inflammasome and its associated cytokines in COPD is unclear.

The hypothesis of this work was that the activity of the inflammasome is increased in patients with COPD, especially during exacerbations.

To demonstrate this working hypothesis, we investigated the status of the NLRP3 inflammasome and its associated cytokines in 1) lung tissue samples from 38 patients with stable COPD disease, 15 smokers with normal spirometry and 14 never smokers; and 2) sputum and plasma samples from 56 patients with exacerbation of COPD, of which 41 could be reassessed in clinical recovery.

The main results indicate that: 1) in lung tissue samples from patients with stable COPD, the mRNA of NLRP3 and IL-1 β were elevated. But both caspase-1 and ASC were mostly inactive, and 2) during exacerbations of infectious origin, caspase-1, oligomeric ASC and their associated cytokines (IL-1 β , IL-18) were significantly increased in sputum compared with subsequent clinical recovery.

From these results, we conclude that the NLRP3 inflammasome is primed, but not activated, in the lungs of clinically stable COPD patients. But the activation of the inflammasome is achieved during infectious exacerbations, through a second infectious signal. Therefore, the results of this study suggest that the inflammasome participates in the inflammatory outbreak that occurs during infectious exacerbations.

1.2 LABURPENA

Birikako gaixotasun butxatzaile kronikoa (BGBK) tabako kearen aurrean sortutako gehiegizko hauntura erreazio batek ezaugarritzen du, hau nabarmenagoa izanik gaixotasunaren larriagotze-faseetan. Inflamasoma, berezko immunitatean parte hartzen duen proteína-anitzeko konplexua, toll-like eta nod-like hargailuen bidez estimulatzen da, eta 1-kaspasa aktibatzea eta IL1 eta proIL18 forma-heldu aktiboak (IL-1b eta IL18) prozesatzea dakar. Hanturan IL-1b-ak duen paper nagusia dela eta, inflamasomaren aktibazioa oso erregulatuta dago, eta bi seinale behar dira (1go gizentzea eta 2. aktibazioa) erantzuna eragiteko. IL1 b-ren jarduera biologikoa bere antagonista endogenoaren hartzaileak (IL1RA) erregulatzen du. Ez dago argi zer eragin izan dezaketen inflamasomak eta honi lotutako zitokinek BGBKan.

Lan horren hipotesia, inflamasomaren jarduera BGBK duten pazienteetan handituta dagoela izan zen, bereziki larriagotzeetan.

Lan-hipotesi hau frogatzeko, NLRP3 inflamasomaren egoera eta honekin lotutako zitokinak aztertuko ditugu honakotan: 1) biriketako parenkima laginak, BGBK gaixotasun egonkorra duten 38 pazienterenak, espirometria normala duten 15 erretzailererenak eta inoiz erre ez duten 14 pertsonenak; eta 2) BGBK larriagotze bat duten 56 pazienteren karkaxa eta plasmaren laginak; horietatik 41 berriro ebaluatu ahal izan ziren berreskuratze klinikoaren ondoren.

Emaitza nagusiek adierazten dute: 1) BGBK egonkorra duten pazienteen birika parenkima laginetan, NLRP3 ARNm-a eta (IL)-1 β interleuzina altuak zeudela, baina bai 1-kaspasa eta bai ASC modu inaktiboan zeuden gehienetan., 2) Jatorri infekziosoetako larriagotzeetan, kaspasa-1, ASC oligomerikoa eta horiekin lotutako zitokinak (il-1 β , IL-18) nabarmen handitu ziren karkaxan, ondorengo berreskuratze klinikoarekin alderatuta.

Emaitza horietatik ondorioztatzen dugu NLRP3 inflamasoma gizenduta dagoela, baina ez dela aktibatzen klinikoki egonkor dauden BGBKdun pazienteen biriketetan. Baina inflamasoma infekzio-larriagotzeetan aktibatzen da, bigarren infekzio-seinale baten bidez. Horregatik guztiagatik, azterketa honen emaitzen arabera, inflamasomak infekzio-larriagotzeetan gertatzen den hantura-leherketan parte hartzen duela iradokitzen da.

2 INTRODUCCIÓN

2.1 EPOC

2.1.1 Qué es la EPOC

La Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC) se caracteriza por la presencia de síntomas persistentes y limitación al flujo aéreo y/o alteraciones alveolares (por ejemplo, la presencia de enfisema). La limitación al flujo aéreo parece relacionarse, al menos en parte, con los cambios estructurales derivados de la respuesta inflamatoria anómala de los pulmones frente a partículas dañinas o vapores(1). En países desarrollados el humo de tabaco es el principal factor de riesgo para desarrollar EPOC(2), mientras que en los países en desarrollo lo es la exposición a polución ambiental como la derivada de la combustión de biomasa empleada para la cocina y la calefacción(3). Sin embargo, cabe destacar que no todos los individuos expuestos desarrollan la enfermedad, lo que sugiere que el trasfondo genético (y/o epigenético) de cada persona es clave en el desarrollo de la enfermedad. Otros factores de riesgo reconocidos son la inhalación de polvos orgánicos (de origen ocupacional) y químicos (como los vapores, irritantes y gases)(4). Estudios recientes han demostrado que la mitad de los pacientes con EPOC diagnosticada a los 60 años no tenían una función pulmonar normal en la edad adulta temprana. Así, en un porcentaje de pacientes con EPOC, ya en etapas tempranas de la vida, hay factores de riesgo que condicionan un posterior desarrollo de la EPOC. Estos factores pueden ser de origen genético, epigenético y/o ambiental por factores como el tabaquismo pasivo, prematuridad, infecciones frecuentes del tracto respiratorio inferior y/o dietas pobres durante la infancia(5).

2.1.2 Prevalencia

La Organización Mundial de la salud (OMS) estima que 65 millones de personas padecen EPOC moderada o severa y que más de 3 millones fallecen a causa de ella anualmente, lo que corresponde al 5% de muertes a nivel global. En 2002 la EPOC era la quinta causa de muerte a nivel mundial(6). Se prevé que el total de muertes por EPOC se incremente en más de un 30% en los próximos 10 años en relación con el envejecimiento de la población(7,8), por lo que se estima que la EPOC se convertirá la tercera causa de muerte de forma global para 2030 (1). En España el último estudio poblacional de prevalencia llevado a cabo en 2018, el EPISCAN II, arrojó una prevalencia global del 11,8% en la población entre 40 y 80 años(9). Aproximadamente el 50% de los individuos con EPOC no están diagnosticados y por ello su prevalencia está manifiestamente infra estimada(10). En concreto en España dicho estudio

Papel del Inflamasoma en la EPOC estable y agudizada

mostró una tasa de infra diagnóstico del 74,7%. Históricamente la EPOC ha sido más frecuente en hombres(11,12) pero debido al aumento del consumo de tabaco entre mujeres en países desarrollados y el mayor riesgo de exposición a la combustión de biomasa en países en desarrollo, la enfermedad ahora afecta a ambos sexo casi de la misma manera(13). En España la prevalencia de EPOC en hombres es del 14,6% y en mujeres del 9,4%; en estas ha aumentado desde un 3,9% en las últimas dos décadas (Figura 1). Del mismo modo, el infra diagnóstico se distribuye de forma dispar, siendo del 70,4% en hombres y del 80,6% en mujeres(14). Una revisión llevada a cabo durante la realización de esta tesis, en la que participó la doctoranda, mostró diferencias demográficas y clínicas existentes entre mujeres y hombres con EPOC(15) (ANEXO 1).

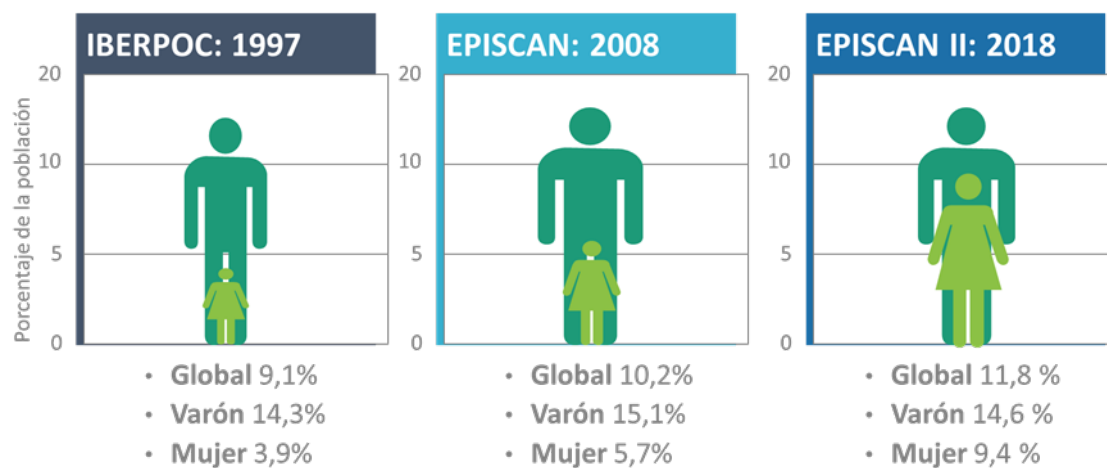


Figura 1 Cambios en la prevalencia en España (global, en hombre y mujeres) desde 1998 hasta 2018.

Adaptado de(9,11,12)

2.1.3 Microbioma en la EPOC

Se define como 'microbioma' al conjunto de microorganismos que ocupan un hábitat bien caracterizado, con distintas propiedades fisicoquímicas(16). El microbioma, conforma un micro ecosistema dinámico e interactivo y está integrado en macro ecosistemas (es decir, los huéspedes eucariotas)(17).

El pulmón sano se consideraba estéril, pero el análisis de la composición bacteriana independiente de cultivo, basado en el análisis del gen que codifica el ARN ribosómico (16S rRNA) demostró que no es así, y que hay un microbioma pulmonar que difiere en función de la salud y la enfermedad(16,18). En los últimos años se ha reportado que la determinación del microbioma mediante secuenciación del gen 16S rRNA, genera una clasificación taxonómica

utilizando el término de «unidad taxonómica funcional» (OTU) y considerando como tal cada unidad taxonómica similar a la de referencia(19). Así, una OTU se estimará como equivalente a género si su coincidencia con la referencia alcanza un 94%, o a especie, cuando llega al 97%. La composición del microbioma a nivel molecular se expresa habitualmente como abundancia relativa, entendiendo como tal la proporción de copias del gen 16S rRNA que corresponden a cada OTU identificada. La limitación más importante del uso del análisis del gen 16S rRNA es la imposibilidad de saber si los fragmentos de ácido desoxirribonucleico (ADN) que se están detectando corresponden a bacterias vivas o muertas, y el no poder obtener información de virus y hongos por esta vía; además del hecho que no se tiene una cuantificación absoluta del microbioma(20).

Tradicionalmente, se ha establecido la presencia de una colonización bronquial por microorganismos potencialmente patógenos a través del uso de metodologías de cultivo bacteriano(19,21,22). La aparición de las agudizaciones se ha relacionado principalmente con la incorporación de nuevas cepas a esta flora, pero la dirección de la causalidad entre esta colonización y la inflamación de las vías respiratorias, la limitación del flujo de aire y la destrucción del parénquima bronquial y pulmonar sigue sin resolverse(23). Existe evidencia de una relación entre la aparición de síntomas de agudización y la adquisición de nuevas cepas bacterianas(22), pero este cambio en la flora bacteriana solo justifica parcialmente la aparición de las agudizaciones.

Los estudios que han examinado el microbioma broncopulmonar por técnicas moleculares en pacientes con EPOC estable han observado diferencias claras respecto a la flora propia del sujeto sano(18,24) (Figura 2). Proteobacterias, *bacteroides*, *acinetobacterias* y *firmicutes* son más comunes en EPOC, con *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Prevotella* y *Haemophilus* como géneros frecuentes en estos pacientes. Esta predominancia se ha obtenido tanto en muestras de mucosa bronquial como en lavado broncoalveolar (BAL) o cepillo protegido, muestras que se han mostrado como equivalentes(25,26). Se han obtenido resultados similares en muestras de esputo, aunque esta muestra aborda una región diferente del aparato respiratorio y aloja una comunidad microbiana diferenciada(26).

Papel del Inflamasoma en la EPOC estable y agudizada

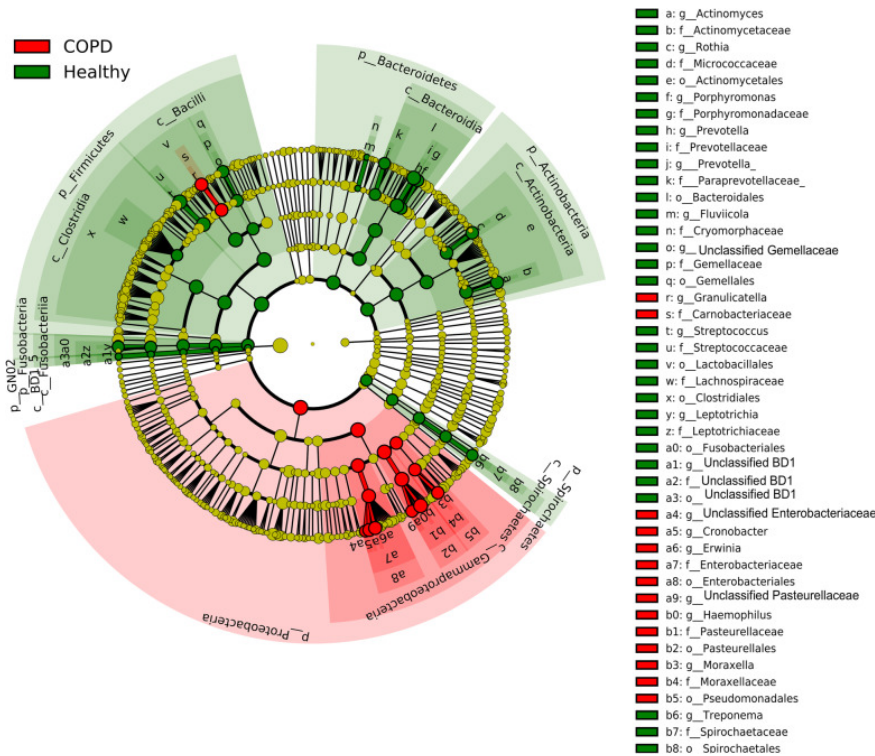


Figura 2 Grupos bacterianos que distinguen el microbioma en sujetos sanos y en pacientes con EPOC.

2.1.4 Agudizaciones

2.1.4.1 Definición Clínica

Durante el curso evolutivo de la enfermedad, muchos pacientes con EPOC presentan episodios de agudización caracterizados por un aumento de sus síntomas asociados a un brote inflamatorio pulmonar y sistémico. La definición de agudización de EPOC no está bien establecida y no existen criterios universalmente aceptados(27), aunque generalmente suele describirse como un “episodio agudo de inestabilidad clínica que acontece en el curso natural de la enfermedad y se caracteriza por un empeoramiento mantenido de los síntomas respiratorios que va más allá de sus variaciones diarias”(28). Los principales síntomas referidos son empeoramiento de la disnea, tos, incremento del volumen y/o cambios en el color del esputo(28).

Existen evidencias que muestran que los pacientes con antecedentes de agudizaciones tienen mayor riesgo de sufrir futuras agudizaciones. En estos pacientes la prevención de éstas es un objetivo fundamental del tratamiento(29,30). Las causas de estas descompensaciones pueden ser diversas. A continuación, se detallan la clasificación de éstas.

2.1.4.2 Cómo se clasifican las agudizaciones

Las agudizaciones se pueden clasificar según el uso de recursos que conlleven en leves, moderadas y graves. Las agudizaciones leves conllevan un aumento del uso de los broncodilatadores inhalados en dosis y/o frecuencia y suelen manejarse en el domicilio del paciente(31). Las agudizaciones moderadas requieren el tratamiento con antibióticos y/o corticoesteroides y las agudizaciones graves precisan una visita al Servicio de Urgencias u hospitalización(31). Precisamente las agudizaciones graves pueden ser, por sí mismas, un factor de riesgo independiente de mortalidad(32–35).

Las agudizaciones también se pueden clasificar según su etiología como se detalla a continuación(36) (Figura 3).

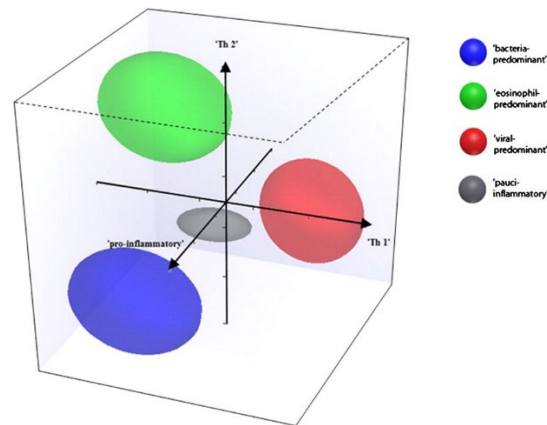


Figura 3 Representación proporcional de los grupos de agudizaciones de la EPOC en elipsoides tridimensionales.

Se muestra una representación proporcional de los grupos de agudizaciones de la EPOC en elipsoides tridimensionales. El grupo 1 se denomina "con predominio de bacterias" y se indica en azul, el grupo 2 se denomina "predominio de eosinófilos" y se indica en verde, el grupo 3 se denomina "predominio de virus" y se indica en rojo, y el grupo 4 se denomina "Pauciinflamatorio" y está perfilado en gris (36).

2.1.4.3 Etiología

2.1.4.3.1 Agudizaciones infecciosas

La infección, definida como el aislamiento de microorganismos potencialmente patógenos, supone la causa más frecuente de las agudizaciones (entre el 50-70% de las agudizaciones podrían ser atribuidas a infecciones respiratorias)(31). Aun así, se cree que esta tasa es mayor, ya que el hecho de que en muchas de las mismas no se pueda determinar su etiología puede deberse a la existencia de infecciones bronquiales no detectadas con las técnicas diagnósticas habituales (cultivo celular)(37). Las técnicas de biología molecular aplicadas a la microbiología

Papel del Inflamasoma en la EPOC estable y agudizada

que se han descrito anteriormente, son mucho más sensibles y capaces de detectar la presencia de patógenos bacterianos no mediante cultivo celular, pero no se utilizan de forma rutinaria en el diagnóstico de las agudizaciones de EPOC(23).

En cuanto a los patógenos bacterianos, en muestras de cultivo celular, se ha observado que están presentes en el 25-80% de las agudizaciones; pueden tener un papel primario en el desarrollo de éstas o ser una sobreinfección de un proceso viral inicial. El *Haemophilus influenzae* es la bacteria aislada con mayor frecuencia en todas las series (2/3 de las agudizaciones en general), seguido del *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis* y *Pseudomonas aeruginosa*(37,38). Se ha demostrado que un 30% de las muestras en las que se aísla *H. influenzae* pertenecían a pacientes fumadores activos, lo que implica que los fumadores, posiblemente por presentar una menor movilidad de los cilios, pueden presentar infecciones respiratorias con mayor frecuencia(39). Estos mismos gérmenes se han obtenido en cultivo de esputo y en diversas muestras de más fiabilidad (catéteres telescopados) en pacientes EPOC en fase estable. Durante las agudizaciones hay géneros que aumentan su abundancia relativa mientras que otros no cambian significativamente(23). Además, las agudizaciones no solo parecen estar relacionadas con una sobrerrepresentación de géneros aislados, sino también asociadas con cambios colaterales en la composición del microbioma en su conjunto, que a su vez parecen estar asociados con aumentos en los marcadores relacionados con la inflamación en el BAL. Por otro lado, otros estudios cuestionan estos resultados pues indican que las cepas de *H. influenzae* aisladas de pacientes durante las agudizaciones de EPOC a menudo inducen más inflamación de las vías respiratorias y probablemente tienen diferencias en la virulencia en comparación con las cepas colonizadoras(38). Estos hallazgos apoyan el concepto de que las bacterias que infectan las vías respiratorias durante las agudizaciones de la EPOC median el aumento de la inflamación de las vías respiratorias y contribuyen a la disminución de la función de las vías respiratorias(23). Se ha observado que el grado de deterioro funcional de los pacientes con EPOC puede indicar la presencia de diferentes microorganismos, siendo menos diverso, más rico en proteobacterias y en microorganismos potencialmente patógenos en las muestras de esputo, en el curso de una agudización. En los casos de EPOC leve-moderada Volumen espirado forzado en el primer segundo en porcentaje del teórico (FEV1%) >50%) el cultivo de esputo es poco efectivo y en muchos casos no se aíslan microorganismos potencialmente patógenos, mientras que los pacientes que presentan un deterioro funcional FEV1%<50%)

presentan un riesgo seis veces superior de sufrir una agudización causada por *Haemophilus influenzae* o *Pseudomonas aeruginosa*, siendo el rendimiento del cultivo mucho mayor en este tipo de pacientes(26).

Las exacerbaciones de EPOC modifican la composición del microbioma(40). Así, la alteración de algunas unidades taxonómicas operativas bacterianas, en particular *Haemophilus spp.*, podría tener un gran impacto en la estructura general de la comunidad microbiana y dichos cambios parecen estar asociados con eventos de exacerbación y son indicativos de fenotipos de exacerbación específicos. Asimismo, los tratamientos con antibióticos y esteroides parecen tener efectos diferenciales sobre el microbioma pulmonar(41).

Las infecciones virales, particularmente los *Rhinovirus*, *Influenzae*, *Parainfluenzae*, *Coronavirus*, *Adenovirus* y *Virus respiratorio sincitial* provocan el 30% de los episodios de agudización(37). Los pacientes con patología de base respiratoria grave presentan mayor susceptibilidad a estos agentes infecciosos y sus consecuencias son peores en los enfermos con EPOC grave(18). Las manifestaciones clínicas no permiten identificar la causa de la agudización, debido a que sea de origen viral o bacteriano, se asocian con los mismos síntomas clínicos y similar respuesta inflamatoria.

2.1.4.3.2 Agudizaciones no infecciosas:

En el 25% de los episodios de agudización no se demuestra una etiología infecciosa(37). En estos casos, generalmente no suele determinarse la causa, pero probablemente jueguen un papel importante factores tales como la contaminación atmosférica, o la exposición a polvos, vapores o humos (42). En este sentido, es interesante destacar que se ha comprobado una importante asociación entre el aumento de la polución ambiental y los ingresos hospitalarios por agudización. Existen otras variables que pueden agravar o facilitar que se produzca una agudización: un déficit nutricional o el abandono de la medicación como broncodilatadores o diuréticos en pacientes con '*cor pulmonale*' crónico podrían empeorar su situación clínica. La toma de benzodiazepinas, la formación de tapones mucosos, la broncoaspiración y la fatiga muscular respiratoria agravarían también el cuadro(43).

2.1.4.4 Patogenia

Independientemente del origen, las agudizaciones de la EPOC presentan unas manifestaciones clínicas similares. En general, durante la agudización parece haber un

Papel del Inflamasoma en la EPOC estable y agudizada

incremento en el número de células inflamatorias y proteínas desencadenado por una infección, partículas contaminantes u otros factores. La broncoconstricción producida lleva a un empeoramiento en la limitación al flujo aéreo, lo que a su vez conlleva un aumento en el trabajo respiratorio, empeoramiento de la relación ventilación/perfusión y alteraciones en el intercambio gaseoso. También resulta en un empeoramiento de la hiperinsuflación, que a su vez empeora la fatiga muscular. A pesar de que, a mayor gravedad de la obstrucción, mayor es el número de agudizaciones moderadas-graves, éstas aparecen desde los primeros estadios de la enfermedad, lo que demuestra que el fenotipo exacerbador es independiente de la gravedad de la obstrucción(37,43).

2.1.4.5 Consecuencias

Las agudizaciones de EPOC suponen un importante problema de salud pública(44). Más allá de la frecuencia, la intensidad del evento también tiene importancia, siendo peores las consecuencias a medida que la gravedad de la agudización es mayor(35). En España, se estima que generan el 10-12% de las consultas de Atención Primaria, entre el 1-2% de todas las visitas a Urgencias y cerca del 10% de los ingresos médicos. Las agudizaciones se asocian generalmente a un deterioro de la función pulmonar, nivel de actividad física, estado funcional y calidad de vida(45–47). Además, son las principales determinantes de la morbilidad y mortalidad por EPOC(48).

2.1.5 Costes de la EPOC y de sus agudizaciones

Al igual que con otras enfermedades crónicas, la carga económica asociada se entiende en forma de costes directos e indirectos. En 2010, el coste de EPOC en los EE. UU. se estimó en aproximadamente \$49.9 mil millones, que incluía \$20 mil millones en costes indirectos y \$30 mil millones en gastos directos por atención médica(49). Los costes directos de atención médica, que representan casi dos tercios del total de dólares gastados en EPOC, son los relacionados con la detección, el tratamiento, la prevención y la rehabilitación de una enfermedad e incluyen: consultas médicas, hospitalizaciones, atención domiciliaria y medicación(50). Como se esperaba, existe una relación directa entre la gravedad de EPOC y el coste general de la atención a nivel del paciente(51). Los datos indican que, con cada etapa progresiva de la EPOC, definida por la limitación al flujo aéreo según Global Initiative for Obstructive Lung Disease (GOLD) los pacientes con estadio I experimentan el coste directo

más bajo con \$1681 por paciente y año, los pacientes estadio II \$5037. Los del estadio III conllevan el mayor coste con un total estimado de \$10,812 por paciente y año(52). La hospitalización se identifica como la variable de coste más importante en cualquiera de los estadios de EPOC. La estancia hospitalaria representa aproximadamente entre el 45% y el 50% del coste directo total generado por los pacientes con EPOC(52,53). Los costes indirectos se refieren a la morbilidad y mortalidad causadas por la enfermedad. Estas cifras provienen de los efectos incapacitantes de la EPOC, que se exhiben principalmente como días de absentismo laboral(54). La actividad física y la calidad de sueño se reducen en el 70% y el 50% de los pacientes con EPOC, respectivamente. Además, la mitad de los pacientes con EPOC (51%) afirman que su enfermedad dificulta su capacidad para desempeñar su trabajo diario(55).

2.2 Complejidad de la EPOC

2.2.1 Enfermedad heterogénea

La EPOC es una enfermedad que se asocia a diversas manifestaciones pulmonares y extra pulmonares (56), en la que la limitación al flujo aéreo no refleja bien esta complejidad (57). Por ejemplo, algunas manifestaciones extrapulmonares de la EPOC como la pérdida ponderal o la disfunción del músculo esquelético influyen en el curso de la enfermedad independientemente del FEV1%. Y su tratamiento, por ejemplo mediante la rehabilitación, contribuye a mejorar el pronóstico y el bienestar de estos pacientes sin modificar su función pulmonar(58). Por ello, se hace necesario entender la complejidad de la EPOC para mejorar el abordaje clínico actual y avanzar en la investigación biomédica y el desarrollo farmacológico. Un primer avance en este sentido fue el desarrollo y validación de diferentes índices multidimensionales, como el índice BODE (Body mass index, Obstruction (FEV1%), Dyspnea, and Exercise capacity)(59), el índice DOSE (Dyspnea, Obstruction (FEV1%), Smoking status, and Exacerbation frequency)(60) y el índice ADO (Age, Dyspnea, Obstruction (FEV1%))(61). La doctoranda, participó en el estudio de validación de este índice ADO del que se obtuvo un nuevo índice actualizado que precedía mortalidad a tres años de manera más precisa que el índice original(62) y en una comparación de los distintos índices pronósticos mediante el empleo de meta-análisis de redes (Anexo 2).

Papel del Inflamasoma en la EPOC estable y agudizada

2.2.2 Fenotipos y endotipos

Para poder capturar la heterogeneidad y complejidad de la EPOC se han propuesto diferentes conceptos, como son los fenotipos, los endotipos y los rasgos tratables(63).

En su sentido más amplio, el fenotipo se define como cualquier característica observable, pero el término “fenotipo clínico”, como se publicó en una revisión que escribimos, se define como la característica o conjunto de características de una enfermedad que puede diferenciar individuos con EPOC y que se relaciona con objetivos clínicos significativos como los síntomas, las agudizaciones, la respuesta al tratamiento, la progresión de la enfermedad o la muerte(64) (Anexo 3). Adicionalmente, la doctoranda participo en la revisión del conocimiento actual sobre conceptos básicos (fenotipos, genotipos, biomarcadores y redes libres de escala) que resultan esenciales para progresar hacia una visión integrada y multinivel de la EPOC basados en el concepto de la biología de sistemas y su potencial para derivar en la Medicina P4 (Predictiva, preventiva, participativa y personalizada)(65–67)(Anexo 4).

Adicionalmente, en esta línea de trabajo, la doctoranda participó en un estudio en el que mediante el empleo de análisis de clusters se identificaban 5 subgrupos de pacientes con EPOC con diferentes fenotipos clínicos que diferían en relación a la severidad de la enfermedad, a la presencia de comorbilidades cardiovasculares y diabetes, y que mostraban diferentes tasas de mortalidad(68) (Anexo 5).

2.3 Características de la respuesta inmune relacionada con la EPOC

El proceso inflamatorio que caracteriza a la EPOC es complejo y se ha asociado tanto a: 1) una respuesta anormal y crónica al humo de tabaco, 2) la respuesta al microbioma pulmonar, 3) la respuesta a antígenos propios, o 4) una mala regulación de la terminación de la respuesta inflamatoria(69).

Así, la respuesta inmune en la EPOC incluye fenómenos tanto de inmunidad innata como adaptativa (Figura 4). Fundamentalmente a nivel pulmonar se identifica un infiltrado de neutrófilos, linfocitos T (en concreto predominan los CD8+), linfocitos B y macrófagos, aunque también participan en dicha respuesta los eosinófilos, células natural-killer (NK) y células dendríticas. Se ha postulado que se liberan una serie de mediadores entre los que destacan el factor de necrosis tumoral (TNF

)- α , la interleucina (IL) -8 y el leucotrieno B4 (LTB4), en respuesta al insulto tabáquico y promueven la perpetuación de la inflamación y el daño tisular. A continuación, se analizan los diferentes elementos tanto celulares como humorales que se hallan involucrados de forma relevante en la respuesta inflamatoria de los pacientes con EPOC(70).

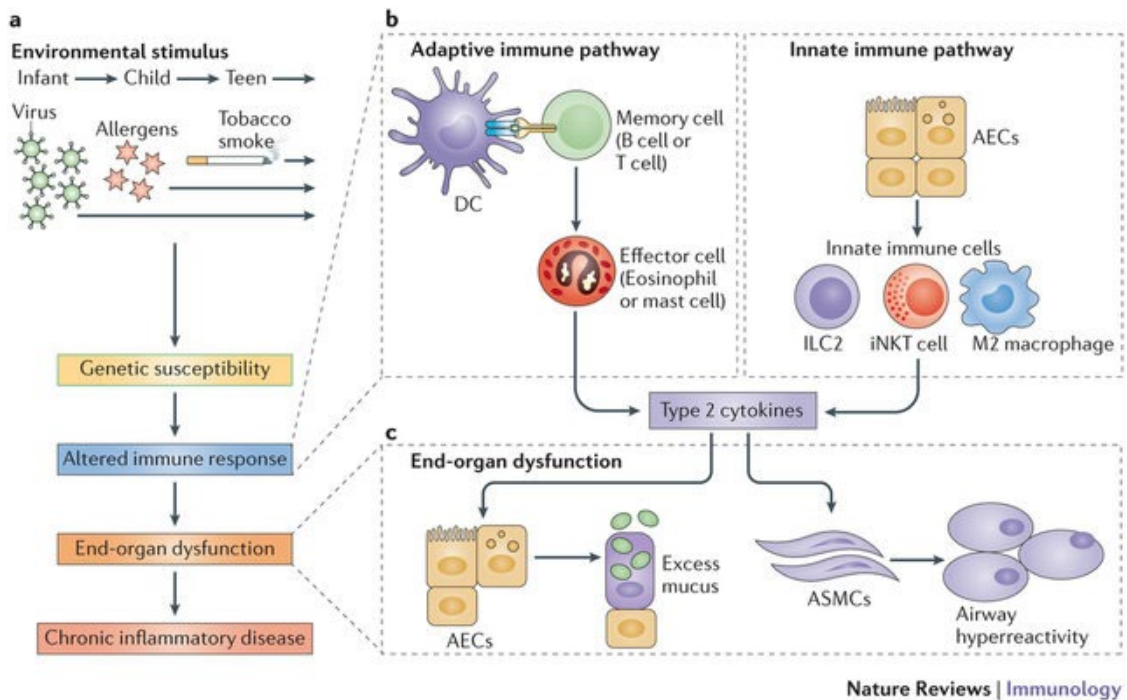


Figura 4 Respuestas inmunitarias adaptativas e innatas en la enfermedad respiratoria crónica

2.3.1 Respuesta inmune innata en la EPOC

El Sistema Inmune Innato (SII) es la primera línea de defensa del huésped. Posee mecanismos preexistentes que se activan de manera rápida y que preceden a la Inmunidad Adaptativa en la respuesta defensiva. El SII responde de la misma manera frente a diferentes estímulos infecciosos y posee una especificidad limitada, es decir, distingue estructuras comunes a grupos de microorganismos no pudiendo distinguir diferencias finas entre ellos(71). El SII es el más antiguo y está presente en todos organismos multicelulares, incluso plantas e insectos. A continuación, se describen, de forma resumida, los elementos principales del sistema inmune innato la EPOC.

Papel del Inflamasoma en la EPOC estable y agudizada

2.3.1.1 Neutrófilos

Los neutrófilos son los elementos celulares tradicionalmente más característicos de la EPOC. Se hallan aumentados en la vía aérea y en el parénquima pulmonar, secretando una serie de factores oxidantes y proteasas que al afectar al parénquima estarían involucrados en la aparición y avance del enfisema. Noxas como el humo del tabaco estimularían la secreción de factores de crecimiento (p.ej. el estimulador de colonias de granulocitos o G-CSF, o de granulocitos y macrófagos o GM-CSF) por parte de las células epiteliales del pulmón, y éstos serían a su vez capaces de estimular la producción y liberación de neutrófilos en la médula ósea(72). Más tarde, en un proceso mediado por la selectina E, estas células se adherirían a las endoteliales de los vasos pulmonares, pasando de ahí a la vía aérea al ser atraídos por distintos factores quimiotácticos (p.ej. los de la clase CXC, como CXCL1, CXCL5 y CXCL8)(70). Allí secretan lipocaína (enzima antibacteriana), pero también la enzima oxidante mieloperoxidasa (MPO) y diversas proteasas (elastasa del neutrófilo o HNE, diversas metaloproteinasas, proteinasa-3 y catepsina G, entre otras)(73). Sin embargo, y a pesar de su elevado número y activación, el papel antibacteriano de los neutrófilos parece hallarse reducido en la EPOC(74). Destacar que ensayos clínicos en los que se han testado inhibidores de neutrófilos en la EPOC han mostrado resultados negativos(75). Reflejando la complejidad de la EPOC con sus numerosas vías feno / endotípicas que juegan un papel en la EPOC. De hecho, en la EPOC, no hay una citocina o quimiocina dominante y, por lo tanto, un solo anticuerpo monoclonal no puede ser eficaz en todas las vías. Esto hace que sea esencial evaluar estos tratamientos en fenotipos / endotipos específicos bien identificados en los que algunas de estas citocinas o quimiocinas podrían predominar, como en la EPOC eosinofílica(75).

2.3.1.2 Macrófagos

Los macrófagos son descendientes de monocitos llegados por el torrente sanguíneo y diferenciados a nivel del tejido pulmonar. En el caso del pulmón de los pacientes con EPOC los monocitos, son atraídos por sustancias como el ligando 2 de la quimioquina β (CCL2), y el ligando 1 de la quimioquina α (CXCL1). Estos, junto con las poblaciones de macrófagos ya residentes en el pulmón forman un grupo celular heterogéneo, en el que unas porciones de ellos muestran actividad proinflamatoria (M1) y otros actúan sobre todo como fagocitos, contribuyendo a la reparación de los tejidos dañados y modulando a la baja la inflamación

local (M2). Los macrófagos M1 se hallan activados por sustancias como el lipopolisacárido bacteriano (LPS) o citoquinas del tipo Th1, como el interferón gamma (IFN- γ) o el GM-CSF, liberando una cascada de citoquinas proinflamatorias (IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-23 y TNF- α , entre otras). Por su parte, los macrófagos M2, influidos por las citoquinas Th2 (como IL-4 e IL-13) producirán moléculas antiinflamatorias como IL-10 y Factor de Crecimiento Transformante- β (TGF- β). La relación entre M1/M2 podría estar implicada en la mayor predisposición al cáncer de los pacientes con EPOC(76). En la EPOC, el número de macrófagos se halla muy aumentado en el parénquima pulmonar y las vías aéreas, y se cree que predominan los macrófagos tipo M1, aunque los M2 jugarían también un papel relevante en algunos procesos tisulares. Por otra parte, los macrófagos de los pacientes, a través de la activación del factor de transcripción nuclear, el factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- κ B) y la quinasa mitógeno-activada p38, secretan mayores cantidades de mediadores inflamatorios, enzimas proteolíticas (elastolíticas y catepsinas) y especies reactivas de oxígeno (ROS) que los de los sujetos sanos. Indicar que el tabaco juega un papel en el fenotipo de los macrófagos pulmonares(77). Finalmente, ayudan a atraer a otras células, como los CD8+ y CD4+, a través de la secreción de diversos factores quimiotácticos. Por contra, los macrófagos de estos pacientes tienen menor capacidad fagocítica ante las bacterias y también fracasan parcialmente en eliminar células apoptóticas(78).

2.3.1.3 Células dendríticas

Las células dendríticas son las principales células presentadoras de antígeno en las vías aéreas, con un papel entre la respuesta innata y adaptativa. Se hallan aumentadas en los pacientes con EPOC y tienen un papel fundamental en las respuestas antígeno específicas mediadas por linfocitos que se llevan a cabo en el pulmón(79,80).

2.3.1.4 Eosinófilos

Los eosinófilos son más importantes en el asma, a través de la liberación de mediadores de la reparación y el remodelado. Su papel en la EPOC aún no está bien caracterizado, pero se estima que pueden participar en algunos pacientes con EPOC (81)

Papel del Inflamasoma en la EPOC estable y agudizada

2.3.1.5 Receptores del sistema inmune innato: TLRs, NLRs

Las proteínas pertenecientes a las familias de receptores de tipo Toll (TLRs) y de tipo Nod (NLRs) son componentes fundamentales de la respuesta inmune innata e inflamatoria, en cuanto que por un lado van a detectar aquellos estímulos que las desencadenan (microorganismos, señales de peligro endógenas, polvos inorgánicos...) y por otro van a modular la naturaleza de la respuesta efectora. Desde un punto de vista estructural, los TLRs y los NLRs son receptores que presentan grandes semejanzas, compartiendo una estructura modular en la que se identifican dominios sensores (repeticiones ricas en leucina LRRs en ambos casos), dominios de oligomerización (dominio de unión a nucleótidos, NACHT/NOD en ambos casos) y dominios efectores (dominios TIR en los TLRs y dominios pirina (PyD) o dominio de reclutamiento de la caspasa (CARD) en los NLRs). Los receptores tipo TLR son receptores transmembrana, asociados bien a la membrana citoplasmática o bien a las membranas de vesículas u orgánulos intracelulares. En la actualidad se sabe que los ligandos naturales de dichos TLRs son estructuras moleculares conservadas presentes en microorganismos como los LPS y los muramil dipéptidos (MDP o el ssRNA y que se engloban dentro del concepto de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs)(82). A diferencia de los TLRs, los receptores de tipo NLRs son proteínas citoplasmáticas y en la actualidad se sabe que la variedad de ligandos de dichos receptores es más amplia que la observada en los TLRs, ya que además de los PAMPs son capaces de detectar señales endógenas de peligro, conocidas como damage-associated molecular patterns (DAMPs) como por ejemplo cristales de ácido úrico, y polvos inorgánicos como asbesto, sílice o aluminio. Asimismo, un importante número de receptores de tipo NLR son constituyentes de los inflamasomas.

2.3.1.6 Inflamasoma

El inflamasoma juega un papel central en la regulación de la inflamación innata. Es un complejo citosólico multiproteico, no delimitado por ninguna membrana y cuyos componentes se acoplan y desacoplan en función de la presencia o ausencia de estímulos de los NLRs (Figura 5). Una vez ensamblado, el objetivo del inflamasoma es generar la forma activa de la proteína caspasa-1, la cual a su vez generará la forma activa de las citocinas proinflamatorias IL-1 β e IL-18, con el consiguiente desarrollo de una respuesta inflamatoria local y sistémica, dirigida a eliminar los microorganismos que la han activado(78,83). IL-1 β e IL-18 son citocinas relacionadas que causan una amplia variedad de efectos biológicos

asociados con infecciones, inflamación y procesos autoinmunes. IL-1 β participa en la generación de respuestas sistémicas y locales a infecciones y lesiones generando fiebre, activando linfocitos y promoviendo la infiltración de leucocitos en los sitios de infección o lesión. IL-18, por su parte, induce la producción de IFN- γ y contribuye a la polarización de las células T-helper 1 (Th1).

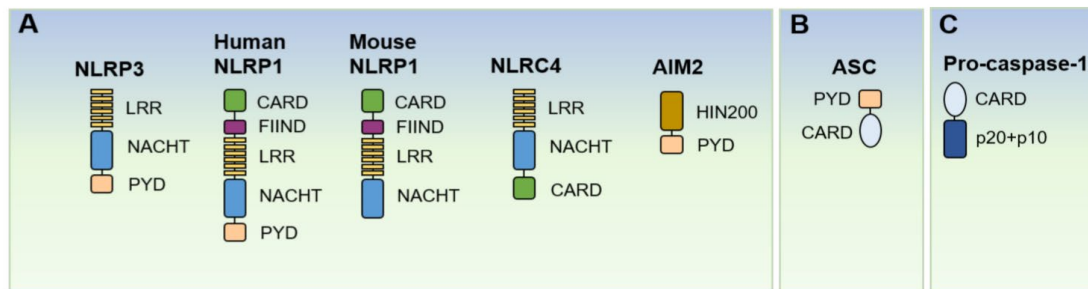


Figura 5 Estructura esquemática de NLRP, ASC y caspasa-1.

Estructuras del inflammasoma sensores NLRP3, NLRP1, NLRC4 y AIM2. (B) Estructuras de la proteína adaptadora del inflammasoma ASC y (C) efector del inflammasoma pro-caspasa-1. LRR; dominio de repetición rico en leucina, NACHT (o NBD); dominio de unión a nucleótidos, PYD; dominio de pirina, CARD; familia de dominio de reclutamiento de caspasas, FIIND; dominio de función para encontrar, HIN200; Repetición de 200 aminoácidos (84).

La maduración de IL-1 β e IL-18 por escisión con caspasa-1 es un requisito previo para inducir las respuestas inmunes. La propia caspasa-1 se sintetiza como un zimógeno inactivo de 45 kDa (pro-caspasa-1) que se somete a un procesamiento autocatalítico tras un estímulo apropiado. La forma activa de la enzima comprende las subunidades p20 y p10(84).

Esta plataforma proteica está formada por un receptor con dominio de oligomerización NLR o ausente en melanoma 2 (AIM2), la proteína ASC y la caspasa-1. El ensamblaje del inflammasoma es mediado por la interacción de los dominios de las proteínas pertenecientes a la superfamilia de muerte, la cual está comprendida por subfamilias que contienen dominio de muerte (death domain [DD]), dominio efector de muerte, dominio CARD y dominio PYD. La subfamilia NLRP de los NLR tales como NLRP1 y NLRP3, contienen 1) en su extremo C-terminal un dominio rico en repeticiones de leucina (LRR), el cual está implicado en el reconocimiento del ligando y en mantener al NLR en estado inactivo, 2) un dominio central de unión a nucleótidos NACHT (NOD) altamente conservado y 3) un dominio N-terminal PYD. La proteína ASC está comprendida por un dominio PYD en el N-terminal y un dominio CARD en su C-terminal y juega un papel crítico en el ensamblaje del inflammasoma NLRP3 (85–89) (Figura 6).

Papel del Inflamasoma en la EPOC estable y agudizada

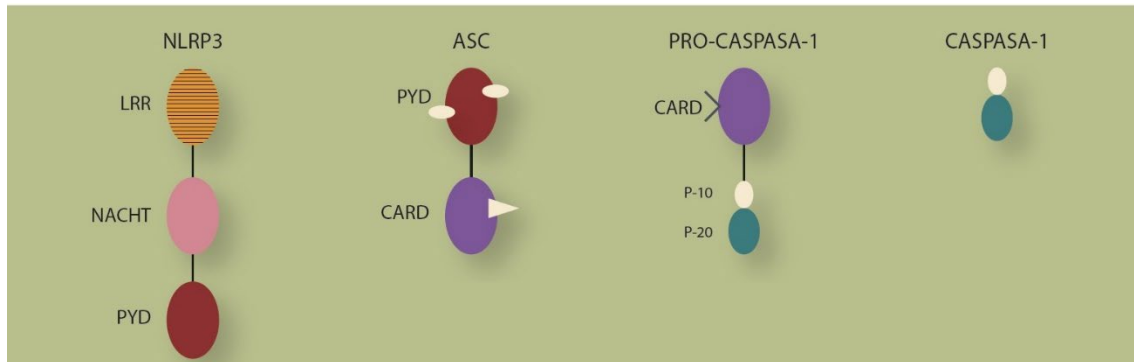


Figura 6 Componentes del inflamasoma NLRP3

la proteína NLRP3, la proteína adaptadora ASC (apoptosis-associated speck-like protein) y una procaspasa-1. La estructura de la proteína NLRP3 contiene un dominio de pirina N-terminal (PYD), un dominio con repeticiones ricas en leucina (dominio LRR), y un dominio NACHT (nucleotide binding and oligomerization domain), que es el responsable del proceso de oligomerización del inflamasoma (95)

La ASC es reclutada por el oligómero NLRP mediante interacción homotípica PYD, mientras que la interacción homotípica CARD entre la ASC y la procaspasa-1, ocurre después para ensamblar el inflamasoma. Por su parte, la ASC se ensambla en una estructura tipo punto, una vez que ha ocurrido la estimulación vía apoptótica o inflamatoria (85–88)(Figura 7).

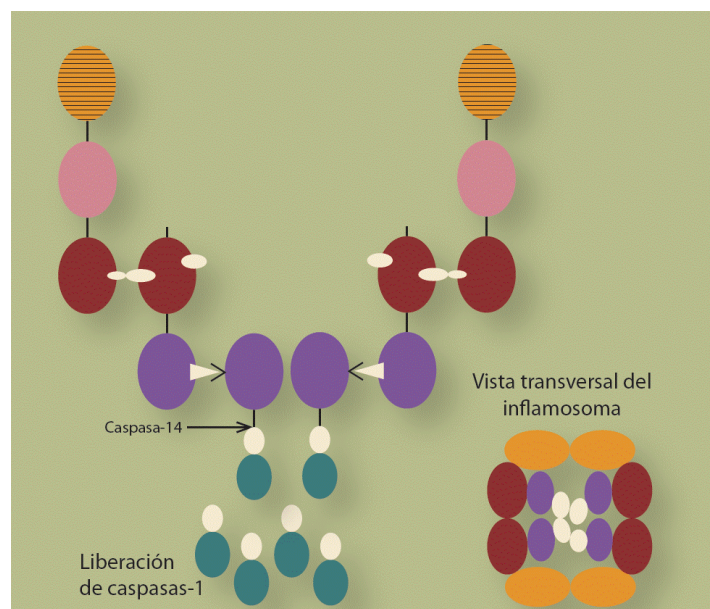


Figura 7 Representación gráfica de la formación del inflamasoma.

Se requieren al menos 2 elementos de cada uno de los componentes del inflamasoma. La liberación de p10/p20 de la proteína NLRP3 se debe a la acción de una caspasa. El ensamble de los componentes dispara una modificación conformacional que induce su activación y oligomerización en un tetrámero que conlleva a la activación de la caspasa-1 y ésta a su vez a la secreción de IL-1 β , IL-18 e IL-33 (93).

La activación del inflamasoma tiene como resultado final la liberación de las IL-1 β e IL-18 activas, y debido al papel central de estas citocinas en dirigir la inflamación innata, la activación del inflamasoma es un sistema de dos pasos. La señal-1 es mediada por la estimulación de los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) a través de los PAMPs o los DAMPs (es decir el reconocimiento de un patógeno o una señal de peligro); la inducción de los PRRs resulta en la activación de la vía NF- κ B para la expresión de la pro-IL-1 β y de los genes asociados a las proteínas del inflamasoma. La señal-2 puede ser conferida tanto por: a) el eflujo de potasio debido a la estimulación del canal de potasio sensible a adenosín trifosfato (ATP) o por la formación de poros por toxinas bacterianas; b) la desintegración lisosomal que conduce a la salida de catepsina B en el citosol; y/o c) la generación intracelular de las especies reactivas de oxígeno. Dicha activación conlleva la oligomerización del NLRP3 con ASC, en un gran complejo tipo-fibra llamado “speck” que puede detectarse mediante inmunofluorescencia o mediante unión cruzada de ASC en Western blots(90). Generalmente los niveles de mRNA de NLRP3 e IL-1 β se consideran marcadores del cebado de la inflamación, mientras que la oligomerización del NLRP3 y ASC y la presencia de caspasa-1 activa son marcadores de la activación del inflamasoma(83,91–93). Una vez ensamblado el inflamasoma se produce la maduración de las IL-1 β e IL-18 por la enzima caspasa-1 mediante el procesamiento proteolítico e induce una muerte celular inflamatoria conocida como piroptosis(88,94–98) (Figura8).

Papel del Inflamasoma en la EPOC estable y agudizada

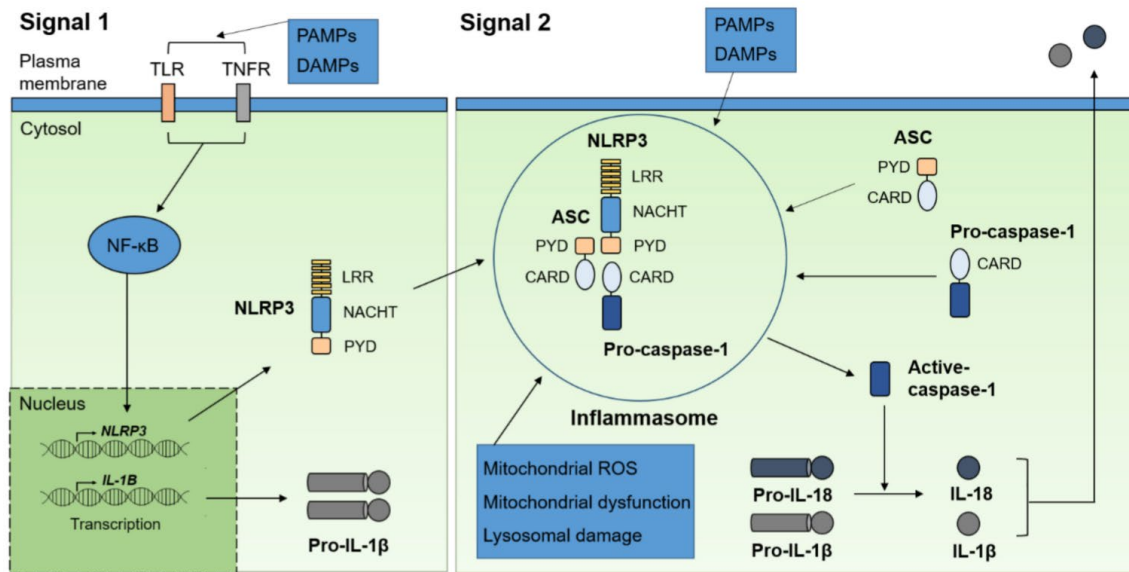


Figura 8 Proceso de activación del inflamasoma NLRP3 en dos pasos.

Los receptores TLRs o TNFR median una señal de cebado. El factor de transcripción NF-κB regula al alza los niveles de ARNm y proteínas de NLRP3 y pro-IL-1β. Una segunda señal (Señal 2) es activada por varios estímulos, incluidos PAMP y DAMP, y promueve directamente la activación de NLRP3 y el ensamblaje del inflamasoma. Posteriormente, el inflamasoma NLRP3 participa en la escisión de pro-IL-1β y pro-IL-18, lo que lleva a su activación. PAMP, patrones moleculares asociados a patógenos; DAMP, patrones moleculares asociados al peligro; TLR; Receptores tipo Toll; receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR); NF-κB, factor nuclear kappa-potenciador de cadena ligera de células B activadas; LRR, dominio repetido rico en leucina; NACHT (también conocido como NBD), dominio de unión a nucleótidos; PYD, dominio de pirina; CARD, dominio de activación y reclutamiento de caspasas; ROS, especies reactivas de oxígeno (97).

2.3.1.6.1 Inflamasoma NLRP3

Entre los inflamasomas, el inflamasoma NLRP3 es el más estudiado. Además de los dominios NOD y LRR, NLRP3 contiene un dominio PYD y, por lo tanto, activa la caspasa-1 usando su PYD para reclutar ASC. Forma solo un oligómero por célula y su oligómero está compuesto por siete moléculas NLRP3. Se sabe que es el inflamasoma más grande de todos, cubriendo alrededor de 2 μm de diámetro. Su activación en macrófagos se puede lograr con una plétora de PAMP, como LPS, peptidoglicanos y ácidos nucleicos bacterianos, siempre que las células estén expuestas al ATP. De hecho, en ausencia de ATP, los macrófagos estimulados con LPS producen grandes cantidades de pro-IL-1β, pero liberan poca citoquina madura al medio. El ATP y ciertas toxinas bacterianas, como la nigericina y la maitoxina, provocan un cambio en la composición iónica intracelular que conduce a la activación del inflamasoma NLRP3. El efecto del ATP está mediado por el receptor P2X7 junto con la pannexina, que provoca una rápida salida de potasio del citosol tras la activación(99).

Los cristales de urato monosódico y fosfato cálcico dihidratado activan la caspasa-1 de una manera dependiente de NLRP3 [14]. El depósito de cristales de urato monosódico y fosfato

cálcico dihidratado en las articulaciones es responsable de las afecciones inflamatorias gota y pseudogota, respectivamente, lo que implica a NLRP3 en su etiología. Además, las células necróticas liberan ácido úrico en el medio extracelular, lo que sugiere un papel importante de NLRP3 en la detección de señales de "peligro" endógenas. Se sabe que la sílice y el amianto activan el inflamasoma NLRP3, lo que implica su papel en la patogenia de la silicosis y la asbestosis(100). La sal de aluminio también puede activar el inflamasoma NLRP3, aunque en presencia de PAMPs como LPS. La fagocitosis de los cristales produce inflamación y daño lisosómico. La perturbación lisosómica junto con la liberación de catepsina B, una cisteína proteasa lisosómica, da como resultado la activación del inflamasoma NLRP3(101).

2.3.1.6.2 Otros inflamasomas

También se han caracterizado otros inflamasomas, como NLRP1, NLRC4 y AIM2 (Figura 5). El inflamasoma NLRP1, el primero en ser descrito, es activado por la toxina letal del ántrax(102). A diferencia de la mayoría de los NLR, NLRP1 activa la caspasa-1 directamente y no se requiere ASC para la producción de IL-1 β madura. El inflamasoma del NLRC4 o del factor activador de proteasa de la enzima convertidora de interleucina (IPAF) es activado por la flagelina citosólica o por el componente basal del cuerpo del sistema de secreción tipo 3 que se encuentra en *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri*, *Legionella pneumophila* y *Pseudomonas aeruginosa*(103). Las diferencias de los inflamasomas NLRP3 y NLRP1 incluyen la capacidad de activar la caspasa-1 sin el adaptador ASC y la expresión constitutiva de NLRC4 sin una señal de cebado mediada por TLR. Finalmente, AIM2, un PRR que detecta ADN bicatenario citosólico (dsDNA), también es capaz de formar inflamasomas. Dado que los requisitos de ligando para AIM2 incluyen dsDNA de virus, bacterias o el propio huésped, también puede contribuir a las respuestas autoinmunes(83).

2.3.1.6.3 Control de la actividad del inflamasoma

La actividad del inflamasoma requiere una regulación precisa para evitar una producción excesiva de citocinas y sus efectos deletéreos. La regulación tiene lugar a nivel transcripcional y postranscripcional. Por ejemplo, NLRP3 se expresa en números limitados de macrófagos y es altamente inducible en respuesta a estímulos proinflamatorios como LPS, citocinas o ROS(104). Además, el empalme diferencial de ASC puede generar variantes de proteínas con una función inhibidora, en lugar de la molécula adaptadora clásica. Otro nivel de regulación

Papel del Inflamasoma en la EPOC estable y agudizada

es la ubicación subcelular de los componentes del inflamasoma; un ejemplo es la redistribución de ASC antes mencionada desde el núcleo al citoplasma en células inflamatorias activada. Se puede lograr una regulación adicional de la actividad del inflamasoma mediante factores secretados. De hecho, los interferones de tipo I pueden suprimir la activación del inflamasoma y su posterior producción de IL-1 β , lo que puede contribuir al aumento del riesgo de infecciones bacterianas secundarias después de la influenza u otras infecciones virales. La autofagia, el proceso mediado por lisosomas necesario para mantener la homeostasis celular en respuesta al estrés, también desempeña un papel en la regulación de la actividad del inflamasoma. Saitoh y sus colegas (52) demostraron que las células deficientes en proteínas (105) específicas de la autofagia tienen una activación del inflamasoma mejorada en respuesta a los estímulos, lo que puede explicarse por el aumento de los niveles de ROS celular causado por la eliminación insuficiente de las mitocondrias defectuosas. Otra posible explicación para este fenómeno es la translocación citosólica del ADN mitocondrial en mitocondrias disfuncionales, que no solo podría involucrar al inflamasoma AIM2, sino que también podría señalar una vía independiente de AIM2(106).

2.3.1.6.4 Modelos animales de EPOC

Se han empleado diferentes abordajes preclínicos para imitar las principales características de la EPOC. Sin embargo, son dos los modelos animales habitualmente empleados

1. Modelo de enfisema elastasa que consiste en una única dosis elastasa instilada intranasalmente en ratas C57BL/6(107). Este procedimiento experimental promueve un daño pulmonar rápido (10 días), que no traslada completamente lo que ocurre en el pulmón humano, aunque podría utilizarse para imitar a las agudizaciones agudas(108)
2. Modelo de exposición al humo de tabaco que se caracteriza por una exposición bien de todo el cuerpo o solo nasal en ratones BALB/c(109). La exposición nasal única tiene la ventaja de que favorece el desarrollo de características de EPOC como la inflamación pulmonar, la hipersecreción mucosa, el remodelamiento de la vía aérea y la fibrosis, el enfisema y la pérdida de función pulmonar, imitando mejor el perfil de inhalación de los fumadores humanos comparado con la inhalación de todo el cuerpo(108)

En el momento de llevar a cabo este trabajo, existía evidencia de la activación del inflamasoma en modelos animales de EPOC, ya que los niveles de caspasa-1 aumentaban en el tejido pulmonar después de la exposición a humo de tabaco en ratones. Los niveles de caspasa-1 también eran más altos en el tejido pulmonar de pacientes con EPOC y fumadores que en donantes no fumadores(110). La inhibición selectiva de caspasa-1 redujo significativamente la inflamación después de la exposición a humo de tabaco en modelos animales(111).

2.3.2 Papel del sistema inmune adquirido en la EPOC

El sistema inmune adaptivo (SIA) está presente en todos los vertebrados, es específico para distintas moléculas y se caracteriza por ‘tener memoria’, es decir mejorar la capacidad defensiva frente a exposiciones sucesivas. Los principales elementos celulares del SIA son los linfocitos B y T que se activan frente a los antígenos (sustancias que inducen respuestas inmunes específicas)(112) y que participan respectivamente en la Inmunidad Humoral, y en la Inmunidad Celular. Los linfocitos T (denominados así porque se han diferenciado en el timo), son células que solo son capaces de reconocer los antígenos si estos son presentados por otros tipos celulares, desencadenando entonces la respuesta inmune frente a esos antígenos. Se subdividen en linfocitos CD8+, denominados también células T citotóxicas (Tc), y linfocitos CD4+ o células T helper (‘cooperadoras’ o Th). Tanto los Tc como los Th pueden subdividirse a su vez en tipo 1 y tipo 2 (Tc1 y Tc2; y Th1 y Th2), atendiendo a las citoquinas que secreta cada una de estas estirpes. Los Th1, al ser estimulados por determinados antígenos (generalmente de origen bacteriano), liberan citoquinas como la IL-2, IL-3, IL-12, IL-18, TNF α y β , GM-CSF e IFN- γ . Los Th2, estimulados generalmente por parásitos o antígenos extracelulares, generarán otro perfil citoquímico, con secreción fundamentalmente de IL-3, IL-4, IL-5, IL- 6 e IL-13, inhibición de células fagocíticas y potente producción de anticuerpos. El perfil de la respuesta inmunitaria va a depender en parte de las relaciones Th1/Th2 y Tc1/Tc2. En la EPOC predomina la respuesta Th1-Tc1, como sucede también en las enfermedades autoinmunes, mientras que en el asma lo hace la Th2-Tc2.

Los linfocitos se hallan aumentados en las vías aéreas y en el parénquima pulmonar de los pacientes, sobre todo los CD8+, estando directamente relacionados con la gravedad de la enfermedad, tanto a nivel del grado de deterioro funcional obstructivo como del grado de enfisema. Estos linfocitos son activados por la presencia de patógenos intracelulares, que se

Papel del Inflamasoma en la EPOC estable y agudizada

presentan a nivel de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase 1. Los linfocitos CD8 secretan diversas sustancias capaces de destruir el parénquima pulmonar, como son el TNF- α , la proteasa granzima B y las perforinas (que inducen la muerte celular por mecanismos osmóticos), en caso de reconocer células que han sido infectadas o dañadas(113).

La respuesta humoral esta mediada por la activación de linfocitos B, que puede ser dependiente o independiente de linfocitos T CD4. Se ha descrito la acumulación de linfocitos B en el tejido pulmonar de pacientes con EPOC severo, aunque no se sabe si su papel es beneficioso o perjudicial para el curso de la enfermedad(114).

2.3.3 Mediadores inflamatorios

En cuanto a los mediadores inflamatorios puede decirse que se han hallado múltiples moléculas incrementadas en los pulmones, sangre y diversos órganos de los pacientes con EPOC. Muchos de estos mediadores pueden tener además acciones diversas o mostrar redundancias con otras moléculas proinflamatorias. Entre los mediadores inflamatorios característicamente involucrados en la EPOC destacan las citoquinas, sobre todo las ligadas a la respuesta Tc1, con expresión como se ha visto de IL-2, IL-3, IL-12, IL-18, TNF- α , TNF- β y GM-CSF, entre otras. TNF- α en concreto, ampliaría localmente la respuesta inflamatoria a través de la activación de NF- κ B, y participaría en algunas manifestaciones extrapulmonares de la enfermedad como la disfunción muscular y las alteraciones nutricionales(115–117). También es crítica la amplificación de la cascada inflamatoria ligada a la IL-6, que se halla elevada en sangre y secreciones respiratorias de pacientes con EPOC, sobre todo durante las agudizaciones. Esta es una IL con acciones ambivalentes, ya que se considera como una citoquina proinflamatoria en la mayoría de los tejidos, pero actúa como una mioquina antiinflamatoria en su versión local cuando es sintetizada en el músculo esquelético. Esto último es debido a su capacidad de inhibir a TNF- α y a IL-1(118,119). Finalmente, IL-17, IL-22 e IL-33, todas ellas aumentadas en los pacientes con EPOC, también parecen claves en el desarrollo y progresión de la enfermedad(120). Determinadas quimioquinas y sus ligandos también juegan un papel importante en la inflamación de la EPOC. Es el caso de los ligandos de quimioquinas (CXCL), como CXCL1, CXCL5 y CXCL8 procedentes de múltiples estirpes celulares y que se hallan aumentados en el pulmón de los pacientes, atrayendo allí sobre todo a monocitos y neutrófilos. De hecho, el receptor CXCR3 está sobreexpresado en las células

Tc1 y Th1, condicionando aumentos de CXCL9, CXCL10 y CXCL11, que son capaces de incrementar la atracción para monocitos y linfocitos. También participan las quimiocinas de clase CC y sus ligandos, como la CCL2, CCL5, que atraen células inflamatorias a la vía aérea(118,119). No deben olvidarse tampoco los mediadores de estirpe lipídica, como las prostaglandinas PGE2, PGF2 α y el leucotrieno LTB4, que se hallan aumentados en las secreciones y aire exhalado de los pacientes con EPOC(79).

2.3.4 El estrés oxidativo

En los tejidos debe existir un delicado equilibrio entre los oxidantes, como las especies reactivas de oxígeno o de nitrógeno, y los antioxidantes. Si este equilibrio se rompe por predominio de los primeros se produce estrés oxidativo o nitrosativo, modificándose diversas estructuras moleculares y repercutiendo en su función. El tabaco y otras noxas, tanto ambientales como del propio organismo (p.ej. las células inflamatorias) son capaces de inducir la producción de especies reactivas en pacientes con EPOC(118,119). De hecho, estas últimas explican en parte la persistencia del estrés oxidativo incluso tras dejar el tabaco. Las ROS no sólo actúan modificando proteínas, lípidos y ADN (con consecuencias estructurales y funcionales, como por ejemplo la disfunción de las antiproteasas), también activan el NF- κ B, amplificando la respuesta inflamatoria y dificultando la acción de algunos fármacos como los corticoides. En la EPOC no sólo se hallan aumentados los oxidantes, también existe una disminución de las sustancias antioxidantes, lo que desequilibra todavía más la situación(121). Esto es en parte debido a que no se activa correctamente el factor nuclear Nrf2, que es el encargado de dar respuesta mediante estas sustancias al incremento de las especies reactivas. El estrés oxidativo se ha involucrado en la aparición y progresión de la enfermedad pulmonar, pero también en algunas de sus manifestaciones sistémicas(122). Otra consecuencia probable del estrés oxidativo sería la aceleración en el proceso de envejecimiento y gasto metabólico de las estructuras pulmonares, que en parte se debería a la menor actividad de la sirtuina-1(118,119). Este proceso de senescencia tiene también sus propias consecuencias, ya que las células 'envejecidas' producen un perfil particular de moléculas proinflamatorias y oxidantes (p. ej. IL-1 β , IL-6, TNF- α , CCL2, CXCL8, etc.) que se han involucrado en algunas de las manifestaciones sistémicas y comorbilidades típicas de la EPOC(123).

Papel del Inflamasoma en la EPOC estable y agudizada

Además del humo del cigarro, la contaminación del aire, la combustión de biomasa, polvo, humos, gases y el uso de pesticidas agrícolas también generan grandes cantidades de ROS, elevan los marcadores de estrés oxidativo y reducen los antioxidantes endógenos(124).

2.3.5 Inflamación sistémica en los pacientes con EPOC

Se ha demostrado que los pacientes con EPOC, particularmente cuando la enfermedad es grave y durante las agudizaciones, muestran inflamación sistémica, que se mide como los niveles aumentados de citoquinas circulantes, las quimiocinas y los niveles de proteínas de fase aguda o como anomalías en los leucocitos circulantes. La inflamación persistente se asocia con peores resultados clínicos(125,126). El tabaquismo puede causar inflamación sistémica (por ejemplo, recuento aumentado de leucocitos totales), pero en los pacientes con EPOC, el grado de inflamación sistémica es mayor al esperable solamente por el humo del tabaco. Aún es desconocido si estos marcadores sistémicos de inflamación son un "derrame" de la inflamación pulmonar a nivel periférico o si son una anomalía paralela o si están relacionados con alguna enfermedad comórbida que tiene efectos en el pulmón. En cualquier caso, la inflamación sistémica observada en los pacientes con EPOC podría contribuir a sus manifestaciones sistémicas y podría empeorar las enfermedades comórbidas(127).

En un estudio de base poblacional grande la inflamación sistémica (la proteína C reactiva (PCR) aumentada, fibrinógeno y los niveles de leucocitos) se asoció con un riesgo 2 a 4 veces mayor de enfermedad cardiovascular, diabetes, cáncer de pulmón y neumonía, aunque no con la depresión. Al medir 6 marcadores inflamatorios (la proteína C reactiva, IL-6, CXCL8, fibrinógeno, TNF- α y leucocitos), el 70% de los pacientes con EPOC tenía algunos componentes de inflamación sistémica y el 16% tenía inflamación persistente. La inflamación sistémica parece relacionarse con la disminución acelerada de la función pulmonar y aumenta aún más durante las agudizaciones(125,127).

3 HIPÓTESIS DE TRABAJO

Papel del Inflamasoma en la EPOC estable y agudizada

La hipótesis general de este trabajo es que el inflamasoma juega un papel en la respuesta inflamatoria exagerada que caracteriza a la EPOC, especialmente durante las agudizaciones.

3.1 Hipótesis específicas:

1. El inflamasoma contribuye a la inflamación pulmonar y sistémica en la EPOC estable
2. El inflamasoma juega un papel en la inflamación que ocurre durante las agudizaciones
3. Los pacientes con EPOC presentan una respuesta funcional in-vitro aumentada a distintos agonistas del inflamasoma

4 OBJETIVOS

Objetivo general:

Analizar la contribución del inflamasoma en la patobiología de la EPOC tanto en fase estable como durante las agudizaciones de la enfermedad.

4.1 Objetivos específicos:

1. Analizar la contribución del inflamasoma a la inflamación pulmonar y sistémica en la EPOC estable.
2. Analizar el papel del inflamasoma en las agudizaciones de la EPOC.
3. Estudiar la respuesta funcional in-vitro a los agonistas del inflamasoma en pacientes con EPOC estable

5 MÉTODOS

5.1 Diseño del estudio y ética

Se trata de un estudio observacional, prospectivo y controlado en muestras humanas. El estudio fue aprobado por los comités de ética de todos los centros participantes. Todos los participantes firmaron el consentimiento informado.

5.2 Participantes

Se estudiaron 1) pacientes con diagnóstico de EPOC definido por un cociente FEV1/FVC <0.7 en una espirometría post-broncodilatación. 2) sujetos fumadores activos sin limitación el flujo aéreo en la espirometría y 3) controles sanos (nunca fumadores y sin limitación al flujo aéreo en la espirometría). De estos tres grupos se analizaron muestras tanto sanguíneas como de pulmón. Las segundas, fueron proporcionadas por el Biobanco pulmonar del Centro biomédico en red de respiratorio (CIBERES), procedentes de pacientes sometidos a cirugía de resección pulmonar por cáncer de pulmón localizado o trasplante pulmonar bilateral (<https://biobancopulmonar.ciberes.org/>).

Para estudiar el papel del inflammasoma durante la agudización de EPOC se incluyeron pacientes del estudio ECOS (Exacerbations of COPD in Spain) que fue un estudio observacional, multicéntrico y longitudinal que se llevó a cabo en diferentes hospitales de España(128). Se definió la agudización de EPOC como un deterioro en el estado clínico del paciente que produjo un incremento de su disnea y del aumento de la cantidad y/o purulencia del esputo sin objetivarse infiltrados pulmonares en la radiografía de tórax. Los pacientes eran aptos para participar en el estudio si tenían un diagnóstico de agudización confirmado por el equipo investigador, previo diagnóstico de EPOC basado en los criterios GOLD, edad de 45 años o superior y que tuvieran una historia pasada o presente de tabaquismo con un índice acumulado mayor de 10 años /paquetes. Se recogieron distintas pruebas, incluidos esputo y muestra sanguínea durante el episodio de agudización que requirió ingreso hospitalario (V1, durante las primeras 72 horas de hospitalización) y una vez alcanzada la estabilidad clínica, al menos 2 meses después del alta (V2).

Por último, se realizaron estimulaciones de células sanguíneas periféricas de pacientes con EPOC, fumadores sin limitación al flujo aéreo y controles sanos recogidos prospectivamente en el Hospital Clínico de Barcelona (Figura 9).

		No fumador	Fumador	EPOC	EPOC Agudizado	EPOC Recuperado
EPOC	Estables	Pulmón	15	15	38	
		SP	13	13	26	
	Agudizados				56	41
	Estimulaciones	11	9	16	10	7

Figura 9 Distribución de las muestras incluidas en el estudio.

SP: sangre periférica

5.3 Obtención de muestras

5.3.1 Función pulmonar

La espirometría forzada se realizó en todos los participantes de acuerdo con las directrices internacionales(129). Los valores de referencia espirométricos corresponden a los de la población mediterránea (130).

5.3.2 Muestras sanguíneas

Las muestras sanguíneas se obtuvieron mediante venopunción y fueron recolectadas en dos tubos EDTA: 1) fue centrifugado a 400G durante 6 minutos y se recolectó el plasma que fue alícuotado y almacenado a -70°C hasta su análisis. 2) se usó para determinaciones hematológicas del número de leucocitos, linfocitos, monocitos y neutrófilos. Se recogió un tubo de suero adicional para las determinaciones de la PCR ultrasensible, y de citocinas inflamatorias

5.3.3 Esputo

El esputo espontáneo se obtuvo durante la agudización y se cultivó para bacterias habituales según la metodología habitual(131). La presencia de virus respiratorios en el esputo se analizó mediante el kit de arrays clínicos Pneumovir (CLART Pneumovir, Genómica, España). Todas las determinaciones de PCR se centralizaron en el Institut de Recerca en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol, Badalona, España. Los ácidos nucleicos totales (RNA) se extrajeron mediante el kit QIAamp Viral RNA Mini kit (Qiagen, Alemania) a partir de un volumen inicial de 200 µl con una elución de 50 µl.

5.3.4 Muestras pulmonares

La recolección de muestras pulmonares, la congelación, preservación en RNAlater o inclusión en parafina se llevó a cabo por la Plataforma de Biobanco Pulmonar del Centro de Investigación Biomédica en Red, de la manera descrita por Villena C.(132) (<https://biobancopulmonar.ciberes.org/>).

5.4 Mediciones

5.4.1 Concentración de citocinas en suero

- 1) Las concentraciones de IL-1RA, Caspasa-1, IL-1 α e IL-18 se midieron mediante ELISA (R&D systems, USA & MBL International, USA, respectivamente).
- 2) Las concentraciones de IL-1 β , IL-8, IL-6 mediante ensayo con Luminex según las instrucciones del fabricante (R&D) usando un citómetro de flujo modificado (Luminex X100) y microesferas teñidas con fluoresceína (Fluorokine MAP human base kit A, R&D, EE. UU.).

5.4.2 Niveles de IL-1, IL-18 y de caspasa-1 en pulmón y esputo

Se extrajo la proteína total de las muestras congeladas (flash frozen) de pulmón utilizando el reactivo de extracción de proteína tisular TPER (Pierce, Rockford, USA) con las tabletas completas Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets (Roche, Germany), lisando el tejido con un aparato GentelMacs, programa de tejido pulmonar. Los lisados se centrifugaron a 4,000 xG durante 5 minutos a 4°C para eliminar el tejido no digerido y entonces los sobrenadantes se centrifugaron a 10,000 xG durante 5 minutos a 4°C. Los sobrenadantes que contenían proteínas solubles se congelaron a -80°C hasta su utilización. El sobrenadante del esputo se almacenó a -80°C hasta su análisis. Todas las muestras y estándares se midieron por duplicado y se utilizaron los valores medios para el análisis estadístico.

Los niveles de caspasa-1 y de IL-18 en los lisados de tejido pulmonar y en el sobrenadante de esputo, se midieron por ELISA tal y como se ha descrito en suero. La concentración de IL-1 β se determinó por Luminex tal y como se ha descrito también en suero. Los ensayos de determinación de CASP-1, IL- 18 e IL-1 β determinaron tanto la proforma como la forma madura. Para evitar un sesgo a la baja, se empleó un nivel nominal de la mitad del límite

inferior de la cuantificación en individuos con valores por debajo del límite inferior de cuantificación.

5.4.3 Actividad de caspasa 1 en sangre periférica

Se determinó la actividad de caspasa-1 en células mononucleadas circulantes mediante citometría de flujo utilizando carboxyfluorescein-YVAD-cmk (FLICA, Sigma Aldrich, EE. UU.), tanto basalmente como tras la estimulación con diferentes ligandos del inflammasoma NLRP3: ATP, nigericina y CSM (Cigarette smoke medium). Se siguió el protocolo descrito por el fabricante para la utilización del reactivo.

5.4.4 Expresión de mRNA de pulmón

El RNA total fue extraído a partir de tejido preservado en RNAlater utilizando el minikit de RNA Purelink (Invitrogen, Thermo Fischer Scientific, EE. UU.) y se sintetizó cDNA con transcriptasa inversa Transcriptor (Roche, Mannheim, Alemania).

La concentración de RNA, su pureza e integridad se obtuvieron mediante espectrofotometría utilizando Nanodrop (Thermo Fisher Scientific, EE. UU.) y el kit Eukaryote Total RNA nano Bioanalyzer (Agilent Technologies, EE. UU.). La expresión de CASP-1, NLRP3, IL18, TGF- β 1, CD68, CCL20 e IL1 β se analizó por reacción en cadena de polimerasa cuantitativa (qPCR) en tiempo real (RTR, Roche, Mannheim, Alemania) en un LightCycler[®] 480 (Roche, Mannheim, Alemania). CD4, CD69, IL6, IL8, IL2, ELANE e IL1A fueron amplificados utilizando SybrGreen (Roche, Mannheim, Alemania) y los primers descritos en la Tabla 1 utilizando un LightCycler[®] 480 (Roche, Mannheim, Alemania). Se utilizó una mezcla de todos los cDNAs como calibrador y se utilizó en todas las reacciones. Los resultados se expresan como la ratio de la expresión de la muestra con la expresión GAPDH (RQ).

Gene	Cebador	Secuencia
GAPDH	Fw	TCTTCTTTTGCCTCGCCAG
	Rv	AGCCCCAGCCTTCTCCA
IL6	Fw	GGCACTGGCAGAAAACAACC
	Rv	GCAAGTCTCCTCATTGAATCC
ELANE	Fw	CGTCTGCACTCTCGTGAGG
	Rv	GAGGCAATTCCGTGGATTAG
IL2	Fw	AACTCACCAGGATGCTCACATTTA
	Rv	TCCCTGGGTCTTAAGTGAAAGTTT
CD69	Fw	GGAGAGTGGACAAGAAAATGAT
	Rv	AGGACAGGAACTTGGGAAGGA
IL8	Fw	TCCTTGTTCCACTGTGCCTTG
	Rv	TGCTTCCACATGTCCTCACAA
IL1A	Fw	GAGATGCCTGAGATACCCAA
	Rv	TAGTTCTTAGTGCCGTGAGTTT
CD4	Fw	GCGAAAACAGGAAAGTTGCAT
	Rv	GTCAAATTTTCTGGAGCTGAGT

Tabla 1 Cebadores utilizados para la cuantificación de SybrGreen

5.4.5 Evaluación de la activación del inflamasoma

La presencia de oligómeros de caspasa-1 y ASC se evaluó por Western blot utilizando el anticuerpo anti-caspasa-1 sc-515 (Santa Cruz Biotechnology, CA, EE. UU.), que detecta los fragmentos de caspasa-1 activa (10 kDa, p10) y del precursor inactivo no escindido (45 kDa, p45), o el anticuerpo anti-ASC (AL177, Adipogen, Suiza), que identifica los monómeros ASC (22 kDa) y los oligómeros cuando se emplean geles nativos. De manera resumida, se transfirieron 20 µg del homogeneizado de tejido congelado o 20 µl del sobrenadante del esputo se sometieron a SDS-PAGE (Mini-protean TGX gels, Biorad), y transferidos a una membrana PVDF de 0.2µm (Biorad, EE. UU.), bloqueados con 5% de leche seca no grasa en PBS/Tween-20 0.3%

(PBST) e incubados a lo largo de la noche a 4°C con un anticuerpo primario específico a 1:1000 en el 5% BSA-PBST. Se lavaron los blots e incubaron en una dilución 1:500 del anticuerpo secundario HRP-goat anti-rabbit (Molecular probes, Invitrogen, EE. UU.) y Luminata Crescendo (Millipore, EE. UU.). Las señales de quimioluminiscencia se adquirieron en un equipo LAS4000 (Fujifilm, Japón) y analizaron mediante imageJ.

5.4.6 Distribución de la caspasa-1 y el ASC en tejido pulmonar

La distribución de Caspasa-1 se determinó por inmunohistoquímica usando el anticuerpo AHP963 anti- caspasa-1 (Bio-Rad, California EE. UU.). En el caso de ASC, la distribución se evaluó por inmunofluorescencia con un anticuerpo anti-ASC (AL177, (AdipoGen SA Suiza).

De manera resumida, las secciones de tejido fijadas con formalina en tejido embebido con parafina fueron desparafinadas, rehidratadas y sometidas a un paso de recuperación antigénica, bloqueadas con 0.1% BSA (Sigma Aldrich, EE. UU.) y 1% de suero de cabra o mono, lavadas e incubadas toda la noche a 4°C con 1:200 de anticuerpos anticaspasa o 1:100 de anticuerpo antiASC. Se detectó tinción específica con anticuerpos secundarios biotinilados de cabra anticonejo (BA-1000, Abd-Serotec, Kidlington, Reino Unido) seguido de un reactivo Vectorstain ABC Elite y sustrato de peroxidasa DAB (Vector laboratories, Burlingame, EE. UU.) y contrateñido con hematoxilina para la tinción de caspasa-1. Para la tinción secundaria de ASC se utilizaron anticuerpos de mono anti-conejo Alexa-647 (Life technologies, EE. UU.) y las láminas fueron amontonadas con prolong Gold con DAPI (Life technologies, EE. UU.) y analizadas en un microscopio confocal TCS-SP5 (Leica Microsystems, Alemania).

5.4.7 Respuesta funcional in vitro del inflammasoma NLRP3

Las células mononucleares periféricas (PBMCs) fueron aisladas mediante centrifugación con un gradiente de densidad Ficoll-Hystopaque (SigmaAldrich, EE. UU.) según el protocolo de la casa comercial. Posteriormente fueron re suspendidas a una densidad de 2×10^6 células/ml en medio libre de suero optimem con glutamax (Invitrogen, EE. UU.) suplementado con antibióticos (0,1mg/ml de penicilina y 100U/ml de estreptomina (Sigma Aldrich, EE. UU.). Posteriormente fueron incubados durante 6 horas a 37°C con 5% de CO₂ sólo o tras la adición de 5 µl ATP (5mM), 2µl Nigericina (20µg/ml), o 2 µl of LPS (1 µg/ml). Se recogió el sobrenadante y se utilizaron los niveles de Caspasa-1, IL1β, IL-1RA, NLRP3 e IL-18 secretados como marcador de la activación del inflammasoma NALP3 y se cuantificaron mediante un

ensayo de citocinas de acuerdo con las instrucciones del fabricante (MILLIPLEX MAG Cytokine Magnetic Bead Panel). Se obtuvieron los niveles por duplicados y se utilizó el valor medio para el análisis.

5.4.8 Microbiología

Las muestras de esputo fueron cultivadas. Se consideró una agudización infecciosa si se aislaron *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus viridans*, *Pseudomonas aeruginosa* o *Citrobacter spp*. Las determinaciones se hicieron en el servicio de microbiología. Adicionalmente, la detección de virus respiratorio se realizó mediante el array® Pneumovir kit (CLART Pneumovir, Genómica, España) basado en la PCR. La determinación de proteína C reactiva (PCR) se realizó en el Institut de Recerca en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol, Badalona, España. Se extrajeron los ácidos nucleicos (RNA) totales bacterianos y víricos mediante el kit QIAamp Viral RNA Mini kit (Qiagen, Alemania) a partir de un volumen inicial de 200 µl y con una elución de 50 µl.

5.5 Análisis estadístico

Los resultados se muestran como media \pm desviación estándar o mediana según se indique. Se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis, seguido por el contraste post-hoc de Mann-Whitney cuando fuera apropiado para comparar variables continuas entre grupos, mientras que las variables categóricas se compararon empleando el test de χ^2 . Los resultados durante la AGUDIZACIÓN y la recuperación se compararon mediante la prueba de Wilcoxon de pares emparejados. Las correlaciones entre las variables de interés se exploraron usando la prueba de Rho de Spearman. Se consideró una p menor de 0.05 (dos colas) como estadísticamente significativa.

6 RESULTADOS

Los resultados de este trabajo fueron parcialmente publicados en el ERJ Open Research (Anexo 6).

6.1 Papel del inflammasoma en la EPOC Estable

Como punto de partida se planteó investigar el estado de activación del inflammasoma y sus citocinas asociadas en tejido pulmonar de pacientes con EPOC estable.

6.1.1 Tejido pulmonar

6.1.1.1 Características generales de los pacientes a estudio

Se incluyeron pacientes de los tres grupos de estudio: 15 no fumadores, 15 fumadores con función pulmonar preservada y 38 pacientes con EPOC con diferentes grados de severidad. Sus características generales se reflejan en la Tabla 2.

PULMÓN			
	No fumadores	Fumadores	EPOC
Sujetos	15	15	38
Edad en años	66±1.4	60±2.0	62±1.2
IMC kg·m⁻²	27.1±0.8	24.6±1.4	26.2±0.8
Índice tabáquico acumulado	0	52.8±5.7*	61.3±4.7*
Estado tabáquico ex/activo	0	0/15	26/12
FEV1%[#]	94.3±5.2	82.4±3.6	42.4±2.9*
FEV1/FVC %[#]	76.4±1.7	83.0±0.6	44.1±2.4*

Tabla 2 Características clínicas principales de los pacientes con EPOC estudiados a nivel pulmonar.

*Los datos se presentan como media±DE, salvo explícitamente señalado. EPOC: Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica; IMC: índice de masa corporal; FEV1%: forced expiratory volume in 1 s; #Los valores de FVC (forced vital capacity), FEV1% % referencia y FEV1%/FVC son prebroncodilatación en los no fumadores y fumadores y postbroncodilatación en los pacientes con EPOC. * p<0,05*

Papel del Inflamasoma en la EPOC estable y agudizada

6.1.1.2 Expresión de caspasa-1 en tejido pulmonar

Inicialmente, en una selección de pacientes de los tres grupos a estudio (n=15 no fumadores, n=15 fumadores y n=38 EPOC), se evaluó la expresión de caspasa-1 en tejido pulmonar mediante. Se identificó expresión de caspasa-1 en células del epitelio pulmonar y en células inflamatorias (principalmente macrófagos y linfocitos) (Figura 10). Se observó un patrón de expresión de caspasa-1 similar en los pulmones de controles no fumadores y de pacientes con EPOC.

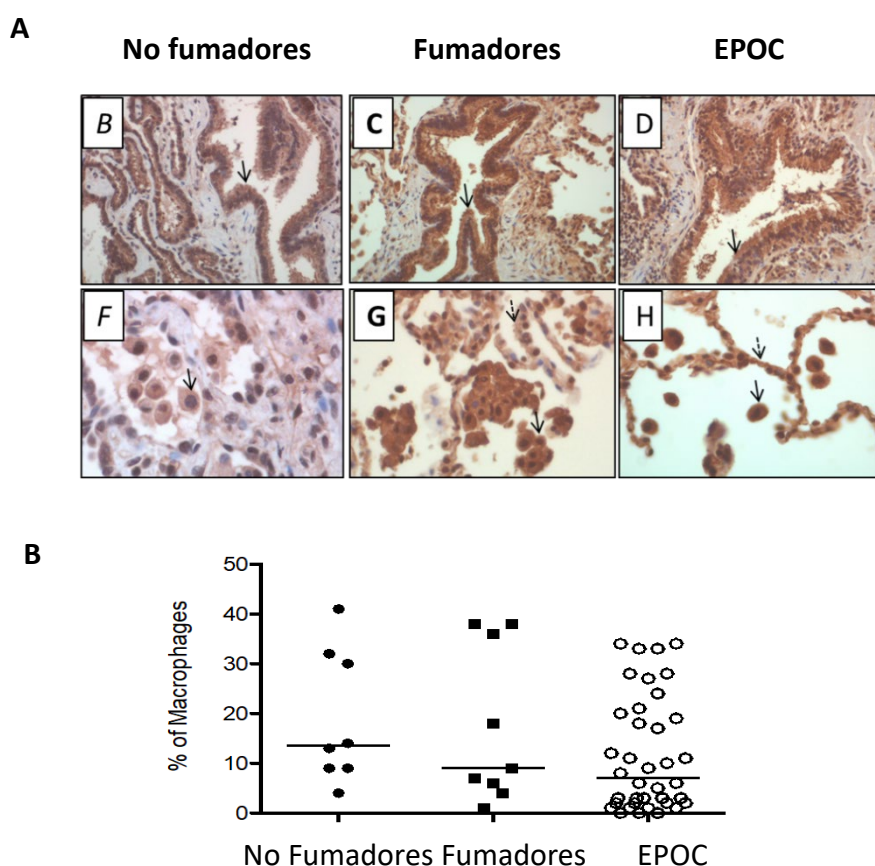


Figura 10 a) Expresión de caspasa-1 en células del epitelio pulmonar y en células inflamatorias. b) Porcentaje de macrófagos teñidos por Caspasa-1 en los diferentes grupos de pacientes. No se observaron diferencias significativas

6.1.1.3 Expresión del inflamasoma a nivel de mRNA en pulmón

Después de determinar que la caspasa 1 se encuentra en el tejido pulmonar en los tres grupos de pacientes se procedió a evaluar la expresión de los componentes del inflamasoma y sus citocinas asociadas en tejido de pulmón. Para ello se utilizó RNA total aislado del tejido de pulmón de los tres grupos de individuos a estudio, y se cuantificaron los niveles de expresión de mRNA de: NLRP3, Caspasa-1, IL-1 β , IL-1RA, IL-18 por qPCR cuantitativa.

Se observó que los niveles de mRNA de NLRP3 fueron significativamente superiores en los pulmones de los pacientes con EPOC comparado con nunca fumadores y con fumadores con espirometría normal (Figura 11), no se observaron diferencias para los demás componentes del inflammasoma o las citocinas asociadas. La transcripción de IL-1 β tendía a aumentar en fumadores y, todavía más en pacientes EPOC estables comparados con no fumadores (figure 2a), aunque las diferencias no alcanzaron la significación estadística (test Kruskal–Wallis test, $p=0.06$).

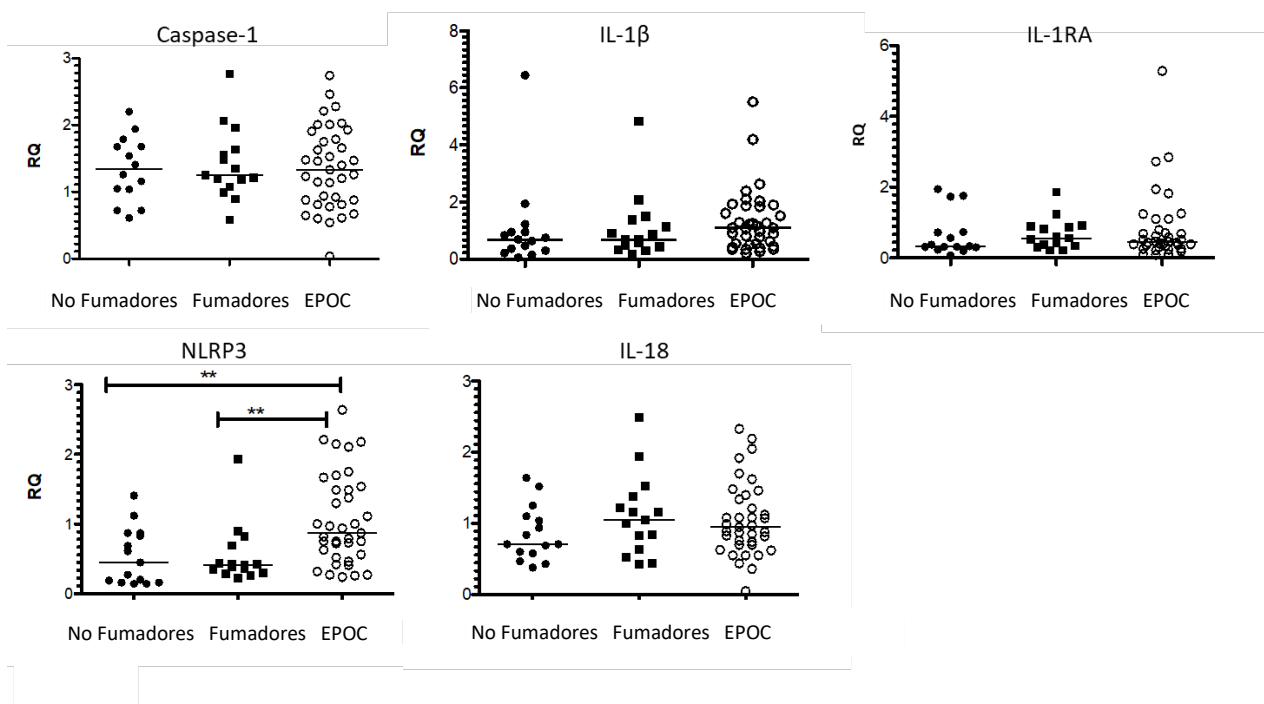


Figura 11 Expresión Caspasa-1, IL1 β , IL-1RA, NLRP3 e IL-18 en tejido pulmonar.

Niveles de transcripción relativa en tejidos de no fumadores, fumadores o pacientes con EPOC (cuantificación relativa de los niveles de mRNA en relación con la expresión de glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, normalizada entre muestras con un calibrador). Los datos se presentan como datos individuales y mediana de expresión relativa, de 15 no fumadores, 15 fumadores y 38 EPOC; **: $p<0.005$.

Adicionalmente se observó que la mayor expresión de en NLRP3 en EPOC es independiente del estado tabáquico del paciente (fumador activo frente exfumador) (Figura 12).

Papel del Inflamasoma en la EPOC estable y agudizada

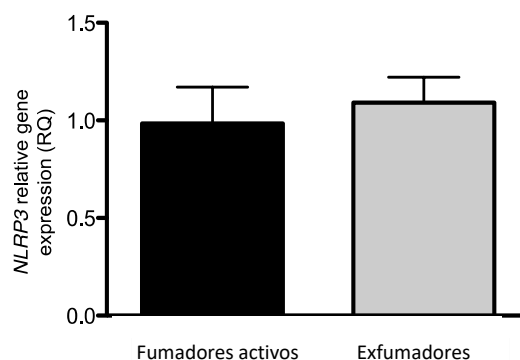


Figura 12. La expresión de NLRP3 en pacientes con EPOC tanto fumadores activos como exfumadores.

6.1.1.4 Correlación con la limitación al flujo aéreo

Se observó que la expresión de NLRP3, e IL-1 β se correlacionaba con la severidad de la limitación al flujo aéreo presente (Figura 13).

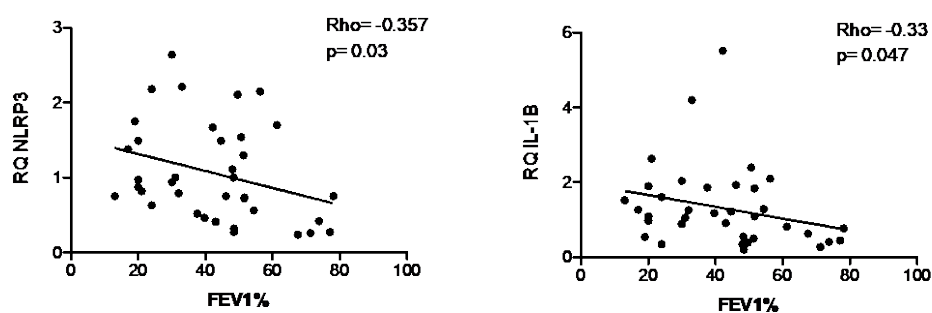


Figura 13 Correlación de Spearman de los niveles de expresión del mRNA NLRP3 y de IL1B en el pulmón de pacientes con EPOC estable con el volumen espirado en el primer segundo (FEV1% % del teórico).

Cada punto representa un paciente.

6.1.1.4.1 Correlación de los componentes del inflamasoma y con otros mediadores inflamatorios

Debido a que la activación del inflamasoma tiene un papel central en la regulación de la inflamación, se investigó la correlación entre los componentes del inflamasoma y diferentes mediadores inflamatorios canónicos y no canónicos al inflamasoma (Figura 14A). Se observó

una correlación positiva entre los niveles de NLRP3: 1) con citocinas asociadas al inflamasoma IL-1 α , IL-1 β , y IL-18 (Figura 5C); y 2) con IL-8, Neutrófilo Elastasa (ELANE), CCL20, IL-2 y CD68 (Figura 14 C). Indicando así que otros tipos celulares (Neutrófilos y macrófagos) pueden estar correlacionados con el nivel de expresión del inflamasoma NLRP3. Los niveles de los mediadores estudiados solo fueron significativos entre grupos en el nivel de expresión de CD68 (macrófagos) (Figura 14 B).

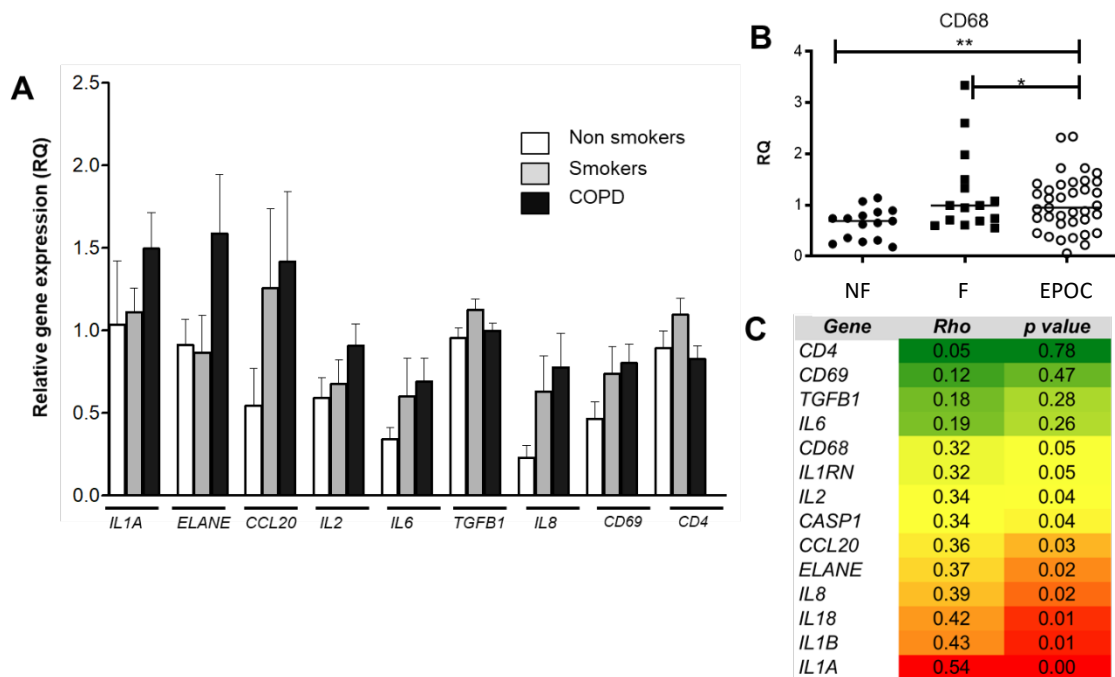


Figura 14 Niveles de expresión de los mediadores relativos del inflamasoma y mediadores inflamatorios.

A) expresión de los niveles en relación con GAPDH (RQ) de los siguientes mediadores inmunológicos: IL1, ELANE, CCL20, IL2, IL6, TGF TGF- β 1, IL8, CD68, CD69 y CD4 en los tres grupos estudiados. Los resultados se presentan como media \pm DE de los 15 no fumadores, 15 fumadores y 38 EPOC. B) correlación de Spearman de mRNA NLRP3 con los mediadores inmunológicos estudiados, los valores de p y Rho se muestran en el texto. Rojo indica una correlación positiva y verde indica ausencia de correlación. NF: no fumadores; F: fumadores.

6.1.1.5 Expresión del inflamasoma a nivel proteico en tejido de pulmón

Tanto los componentes del inflamasoma como sus citocinas asociadas, están regulados a nivel de post-transcripción. Por ello a continuación se estudiaron sus niveles a nivel proteico en tejido pulmonar.

Papel del Inflamasoma en la EPOC estable y agudizada

6.1.1.5.1 Niveles proteicos de IL-1 β , IL-18, Caspasa-1 e IL-1RA

Los niveles de las proteínas IL-1 β , IL-18 e IL1RA en tejido pulmonar estaban aumentados en fumadores y pacientes EPOC comparados con los controles no fumadores, pero estas diferencias solo alcanzaron la significación estadística en fumadores (Figura 15). Los niveles de caspasa-1 no fueron diferentes entre grupos.

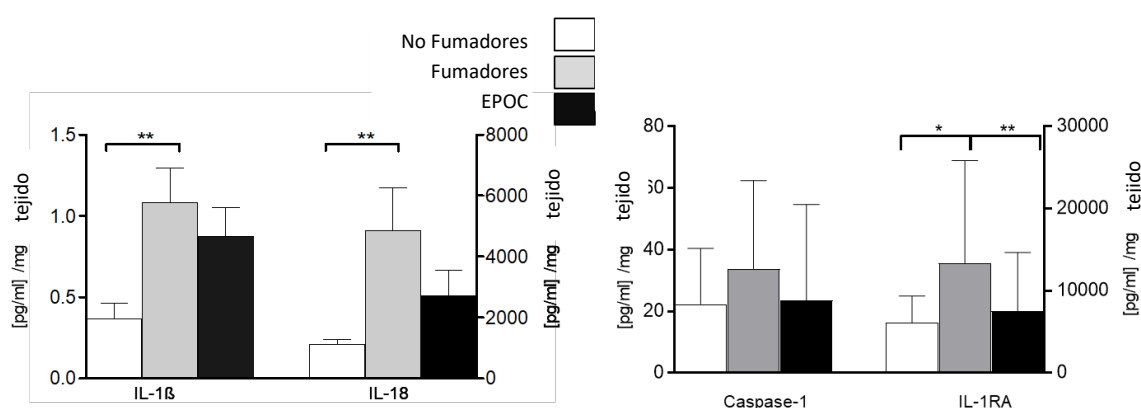


Figura 15 Valores proteicos en tejido de pulmón de Interleucina (IL)-1 β , IL-18, caspasa-1 e IL-1RA.

Se representa la media \pm SD. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.005$.

Al encontrar diferencias con los fumadores, se planteó evaluar si en los pacientes con EPOC había diferencias según el hábito tabáquico. Pero como se muestra en la Figura 16, no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre pacientes EPOC en relación con su hábito tabáquico (activos frente a exfumadores). Estos resultados concuerdan con lo observado a nivel de mRNA.

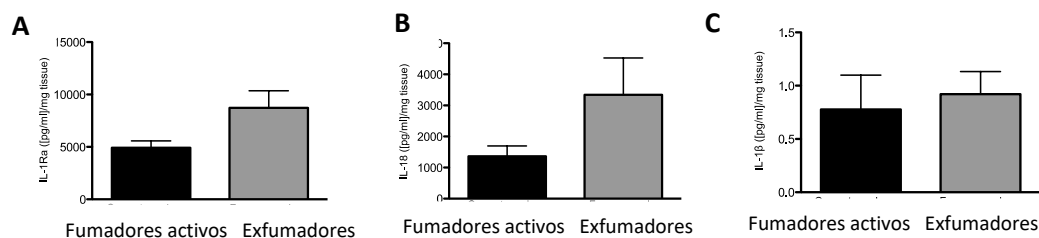


Figura 16 Impacto del estado tabáquico de los pacientes con EPOC en los niveles de citocinas mediadas por el inflamasoma.

A) niveles de la proteína IL-1RA en tejido pulmonar de fumadores activos como exfumadores. B) niveles de la proteína IL-18 en tejido pulmonar de fumadores activos como exfumadores. C) niveles de la proteína IL-1 β en tejido pulmonar de fumadores activos como exfumadores.

De manera similar, no se encontraron diferencias significativas entre los pacientes tratados con y sin corticoides inhalados (Tabla 3).

	EPOC con Cis	EPOC sin Cis	Valor p
CASP-1	12.68±8.85	9.79±7.23	0.479
IL-1β	0.00035±0.0038	0.0005±0.00066	0.782
IL-18	1.313±1.368	1.18±1.26	0.442
IL-1RA	4.031±1.74	3.511±1.878	0.518

Tabla 3 Valores proteicos en tejido de pulmón de Interleucina caspasa-1, IL-1 β , IL-18, e IL-1RA en función de si los pacientes recibían o no tratamiento con corticoides inhalado.

Cis: corticoides inhalados.

6.1.1.6 Activación del Inflamasoma

Las caspasas son sintetizadas en forma inactiva, y necesitan un corte proteolítico para dar lugar a la forma activa, que posteriormente es secretada a nivel extracelular. Tanto la tinción en parafina como las determinaciones de ELISA reconocen tanto la forma activa como inactiva de Caspasa-1. Por ello, a continuación, se cuantificó el nivel de caspasa-1 activa en tejido pulmonar.

6.1.1.6.1 Caspasa-1 activa en pulmón

El análisis de Western Blot, con un anticuerpo capaz de diferenciar las dos subunidades de la forma activa de Caspasa-1, mostró que, en el tejido pulmonar, la caspasa-1 se encontraba mayoritariamente en su forma inactiva (p45) (Figura 17A). La banda correspondiente a la subunidad pequeña activa de la caspasa-1 (p10) sólo se detectó en el 29% de los pacientes EPOC, 20% de los no fumadores y 27% de los fumadores (Figura 17B).

Papel del Inflamasoma en la EPOC estable y agudizada

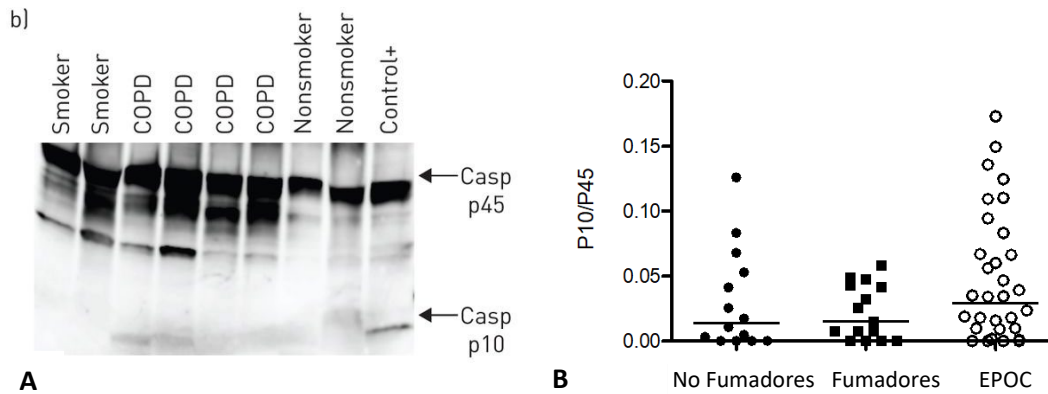


Figura 17 El inflamasoma no está activado en la EPOC estable.

A) Representación del análisis Western Blot para caspasa-1: el control positivo (+) en un lisado de células mononucleares de sangre periférica humana tratado con nigericina 10 μM que es un activador del inflamasoma.

B) Los niveles de proteína caspasa-1 medidos mediante ELISA y la expresión relativa de mRNA medida con PCR cuantitativa (QPCR) en muestras pulmonares de pacientes con EPOC. Los resultados se presentan como media±DE de 14 no fumadores, 15 fumadores y 38 EPOC

6.1.1.6.2 Oligómeros de ASC

La activación del inflamasoma comporta la formación de oligómeros de gran tamaño de ASC. Por Western Blot, se evaluó la presencia de oligómeros de ASC, observando que estaba principalmente en estado monomérico en pacientes EPOC y en no fumadores. También se detectaron oligómeros débiles para ASC en pacientes EPOC y en controles (Figura 18D). Las especies oligoméricas de ASC fueron revertidas cuando las muestras se trataron con un agente reductor previo a resolverse con SDS-PAGE (Figura 18D). De manera complementaria, los oligómeros de ASC se pueden observar por Inmunofluorescencia. En este estudio los oligómeros de ASC se detectaron en algunos macrófagos (Figura 18 ABC), pero la mayoría de la inmunotinción de ASC se detectó como una tinción uniforme en el citosol de la célula, correspondiendo a la forma monomérica de ASC.

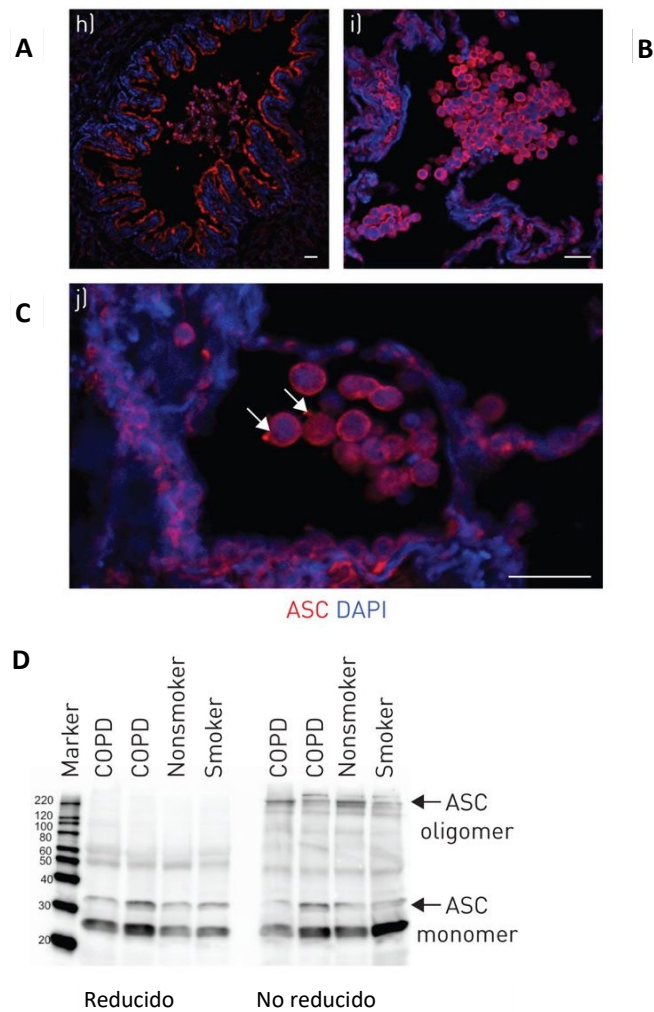


Figura 18 El inflammasoma no está activado en EPOC estable.

A-B-C) Tinción de inmunohistoquímica de ASC (rojo) y del núcleo (azul) en muestras tisulares pulmonares representativas de un paciente EPOC. A) células epiteliales alveolares y macrófagos, B) células epiteliales bronquiales y C) macrófagos. Las flechas en C) representan macrófagos con speck detectable de ASC. DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole. Escala de las barras: 36 μm . D) Western Blot para ASC en representación de las muestras pulmonares de dos pacientes con EPOC, un no fumador (NS) y un fumador (S), denotando el ASC monomérico (22kDa) y oligomérico (20 kDa). Los complejos oligoméricos ASC no se detectaron cuando las muestras se procesaron mediante condiciones simplificadas.

6.1.2 Papel del inflammasoma en EPOC estable a nivel periférico

A continuación, la contribución del inflammasoma en la inflamación sistémica de la EPOC, se evaluó tanto en suero como por estimulaciones de PBMCs. Para ello, se utilizó tanto suero de los pacientes analizados a nivel pulmonar, como una nueva cohorte de pacientes para la determinación de la función del inflammasoma en células circulantes (PBMCs) a través de estimulaciones. Los detalles de dicha población se describen en la Tabla 4.

Papel del Inflamasoma en la EPOC estable y agudizada

SANGRE Estimulaciones			
	No fumador	Fumador Sano	EPOC Estable
Número	11	9	16
Edad	58,8	59,3	68,8 *
Genero (H/M)	7/4	3/4	12/1
Fumador (Si/No)	0/11	8/0	1/12
IMC	23	26	26,8
Charlson	0,22	0,13	1,3
FEV1%	100,51	95,58	45,04*

Tabla 4 Características clínicas principales de los pacientes con EPOC estudiados a nivel periférico, subgrupo de estimulaciones.

Los datos se presentan como media±DE, salvo explícitamente señalado. EPOC: Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica; IMC: índice de masa corporal; FEV1%: forced expiratory volume in 1 s; #Los valores de FVC (forced vital capacity), FEV1% % referencia y FEV1%/FVC son prebroncodilatación en los no fumadores y fumadores y postbroncodilatación en los pacientes con EPOC. * $p < 0,05$

6.1.2.1 Niveles de caspasa-1 y citocinas relacionadas en suero

En la mayoría de los casos el nivel de IL-1 β fue menor a 0.1pg/ml (límite de detección del método de cuantificación utilizado) y por tanto se consideró no detectable, por ello se utiliza la concentración de IL-1RA como marcador de la activación de inflamasoma ya que se secreta en respuesta a la secreción de IL-1 β . La caspasa a nivel extracelular también se considera un marcador de activación del inflamasoma, ya que es liberada al exterior de la célula solo tras la activación del inflamasoma. La Figura 19A incluye las concentraciones de Caspasa-1, IL-1RA, IL-18 en suero. No se objetivaron diferencias significativas en sus concentraciones en suero entre grupos, aunque hay una clara tendencia a mayor expresión en pacientes con EPOC.

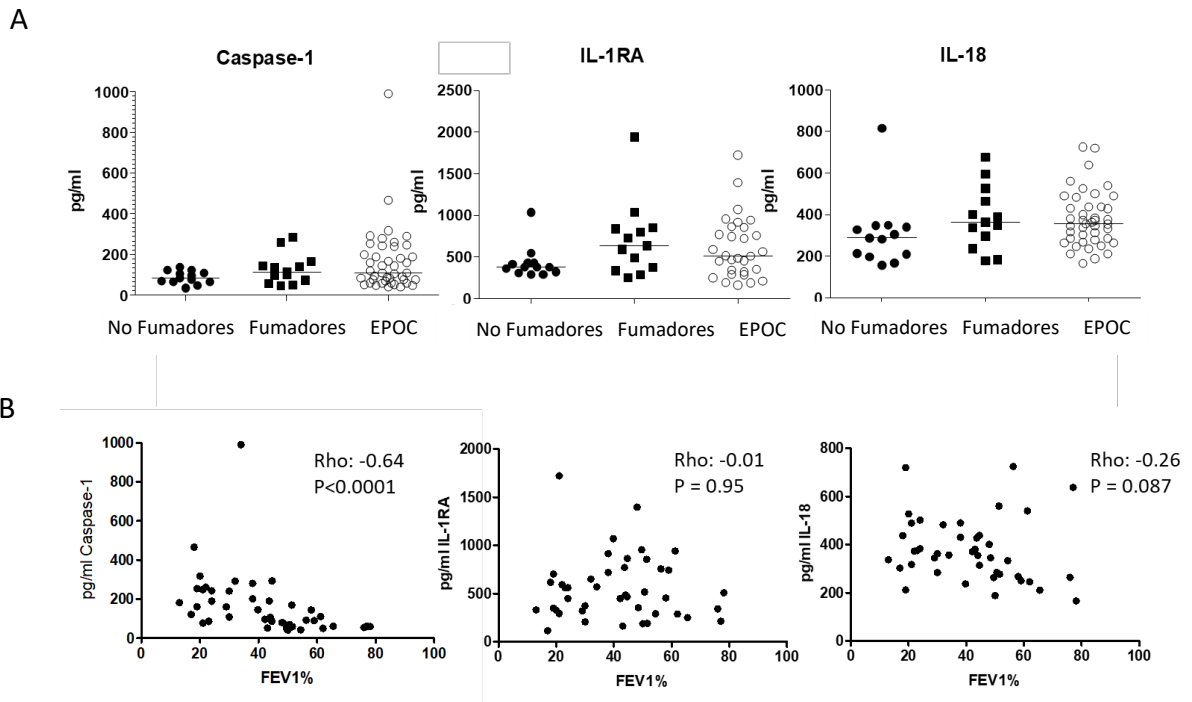


Figura 19 A) Mediadores del inflammasoma en suero y B) su correlación con los niveles de FEV1%.

Se observó una buena correlación entre los niveles en suero de Caspasa-1 y el grado de limitación al flujo aéreo, y una tendencia con los niveles de IL-18 (Figura 19B).

Finalmente, en el conjunto de muestras que tenían tanto suero como tejido de pulmón se pudo observar que los niveles de caspasa-1 estaban correlacionados en ambos compartimentos (Figura 20).

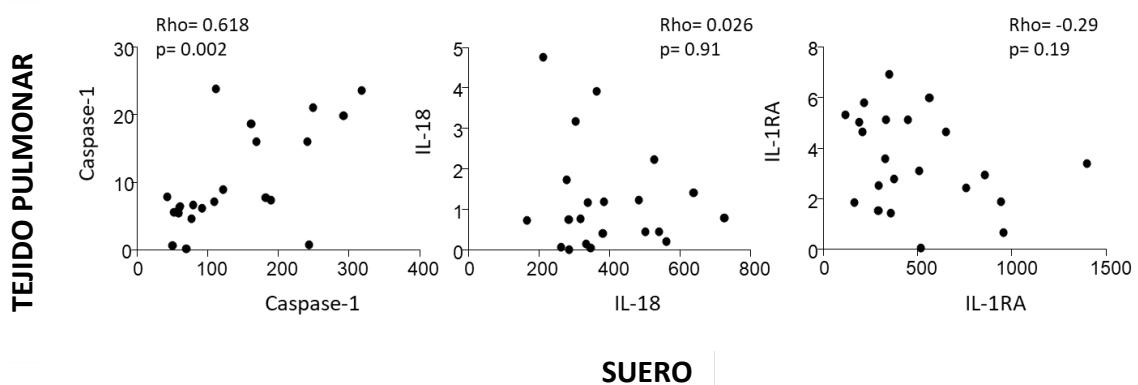


Figura 20 Correlación de los marcadores del inflammasoma en sangre y tejido pulmonar.

Papel del Inflamasoma en la EPOC estable y agudizada

6.1.2.2 Niveles de Activación del inflamasoma en sangre periférica

A continuación, se evaluó la activación del inflamasoma en linfocitos y monocitos de sangre periférica en los tres grupos a estudio, tanto a nivel basal, como en respuesta a activadores del inflamasoma como son ATP y Nigericina. No se observó una mayor capacidad de respuesta a activadores de NLRP3 en pacientes con EPOC, pero de acuerdo con los resultados de incremento de caspasa en suero periférica, sí se observó una menor activación basal del inflamasoma en pacientes con EPOC (Figura 21).

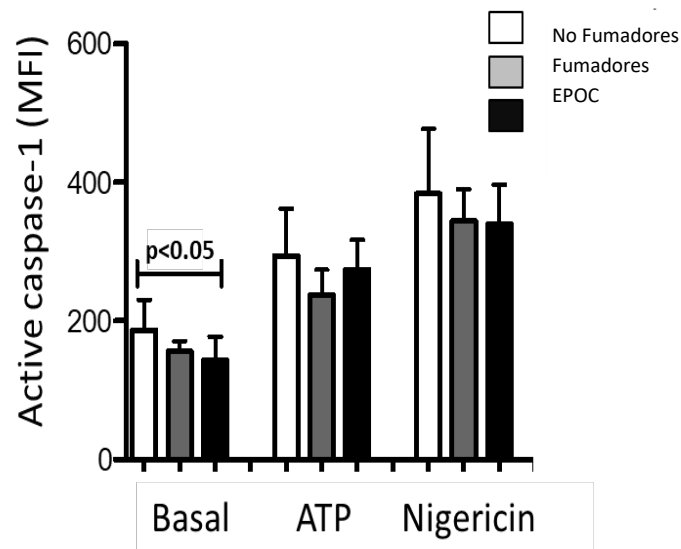


Figura 21 Actividad del inflamasoma en PBMCS.

6.2 Inflamasoma en EPOC Agudizado

6.2.1 Características generales de la muestra

Se incluyeron 56 sujetos del total de 86 pacientes del estudio ECOS. La selección se hizo en base a poder disponer de muestra de esputo y plasma para su análisis(128). Los pacientes fueron reclutados en fase de agudización durante las primeras 72 horas de su hospitalización, y 41 de ellos fueron revalorados tres meses después durante la fase de estabilidad. Sus características generales se reflejan en la Tabla 5. En líneas generales se trata de pacientes con un índice acumulado tabáquico importante, la mayoría todavía fumadores activos y con una limitación al flujo aéreo en grado severo. Durante los episodios de agudización se observó un incremento de la inflamación con presencia de leucocitosis, neutrofilia, linfopenia y elevación de la PCR (Tabla 6).

	Agudización	Recuperación	Valor-p
Sujetos	56	41	ns
Edad en años	68.9±1.2	68.1±1.3	ns
IMC kg·m⁻²	26.5±0.8	26.3±0.8	ns
Índice tabáquico acumulado	72.9±4.8	72.7±5.3	ns
Estado tabáquico ex/activo	21/35	19/29	ns
FEV1%#	44.4±2.8	44.4±2.8	ns
FEV1/FVC %#	46.7±2.0	47.1±2.3	ns
Leucocitos ×10³ μL⁻¹	11.59±0.47	8.67±0.3	<0.0001
Neutrófilos ×10³ μL⁻¹	85.4±1.3	62.6±1.6	<0.0001
Linfocitos ×10³ μL⁻¹	9.3±0.6	24.35±1.0	<0.0001
Proteína C Reactiva mg·dL⁻¹	6.5±0.9	1.1±0.3	<0.0001

Tabla 5 Características generales de los pacientes estudiados durante la agudización.

Los datos se presentan como media±DE, salvo especificación. Los datos se compararon usando la prueba de Mann-Witney.

Papel del Inflamasoma en la EPOC estable y agudizada

	AGUDIZACIÓN	RECUPERACIÓN	VALOR P
SUJETOS	56	41	
LEUCOCITOS ×103 ML⁻¹	11.59±0.47	8.67±0.3	<0.0001
NEUTRÓFILOS ×103 ML⁻¹	85.4±1.3	62.6±1.6	<0.0001
LINFOCITOS ×103 ML⁻¹	9.3±0.6	24.35±1.0	<0.0001
PROTEÍNA C REACTIVA MG·DL⁻¹	6.5±0.9	1.1±0.3	<0.0001

Tabla 6 Niveles de leucocitos, neutrófilos, linfocitos y proteína C reactiva durante la agudización y en la recuperación.

Los datos se presentan como n o media ± SEM, a menos que se indique lo contrario. Los datos se compararon mediante una prueba de Mann-Witney. FEV1%: forced expiratory volume in 1 s

6.2.2 Mediadores del inflamasoma: Agudización vs Recuperación

En toda la muestra de pacientes con EPOC estudiada la concentración de caspasa-1, IL-1 β e IL-18 liberadas en esputo y en plasma fueron similares durante la agudización y durante la recuperación (Figura 22).

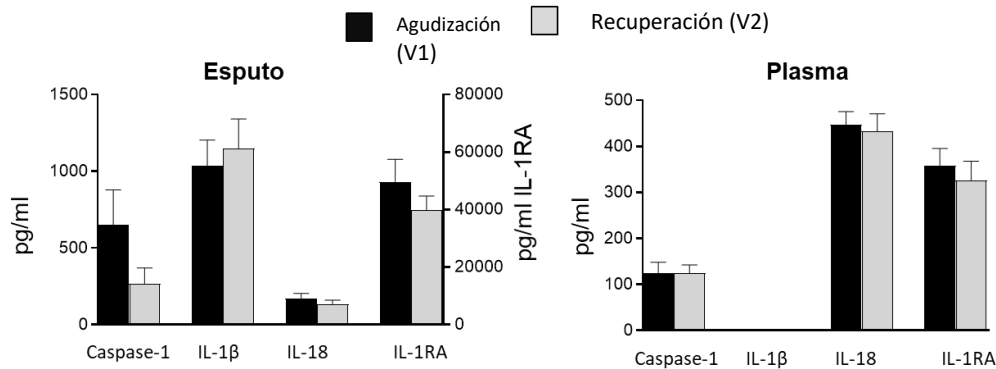


Figura 22 Mediadores del inflamasoma en esputo y plasma de pacientes durante la agudización y estabilidad.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

6.2.3 Correlación entre marcadores en plasma y suero

Al igual que en las determinaciones en pulmón y suero hechas en pacientes estables descritas anteriormente, en este punto se investigó la relación entre los niveles de mediadores del

inflammasoma en esputo y plasma en fase de agudización. Encontramos una relación significativa entre los niveles plasmáticos y de esputo para caspasa-1 (Rho 0.291, p=0.035) y para IL-1 β (Rho 0.335, p=0.012) durante la agudización (Figura 23).

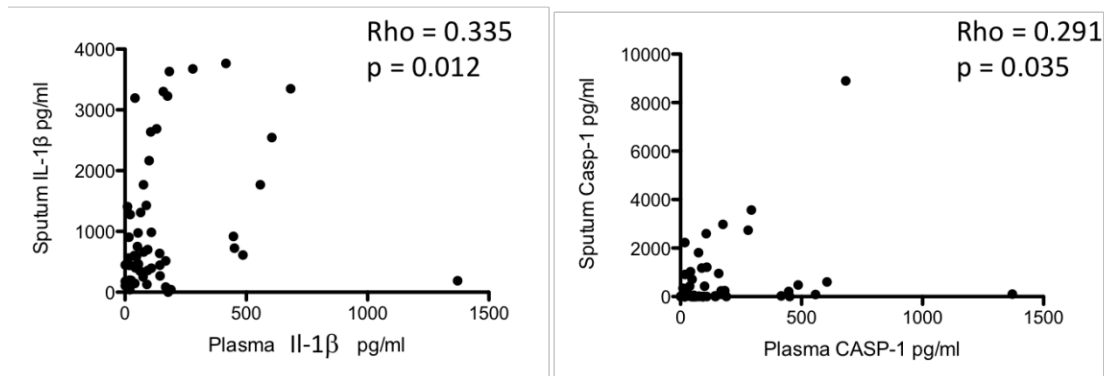


Figura 23 Correlación de los mediadores del inflammasoma en suero y esputo en fase de agudización

6.2.4 Correlación entre los distintos marcadores de activación del inflammasoma
 Encontramos una correlación significativa y positiva entre la mayoría de los marcadores de la activación del inflammasoma (Tabla 7).

	IL-1 β	IL-18	Casp-1	IL-1 α	IL-1ra
IL-1 β					
IL-18	0.331				
Casp-1	0.495	0.493			
IL-1ra		0.611	0.276	0.578	

Tabla 7 Valores de Rho en las relaciones entre distintos marcadores de activación del inflammasoma

6.2.5 Marcadores de inflammasoma según la naturaleza de la agudización
 En las agudizaciones infecciosas de EPOC el 53% de los casos mostraron un origen vírico, el 41% fueron bacterianas y sólo el 6% mostraron ambas causas. Se consideró la agudización como no infecciosa cuando tanto la PCR vírica como el cultivo bacteriano fueron negativos.

Papel del Inflamasoma en la EPOC estable y agudizada

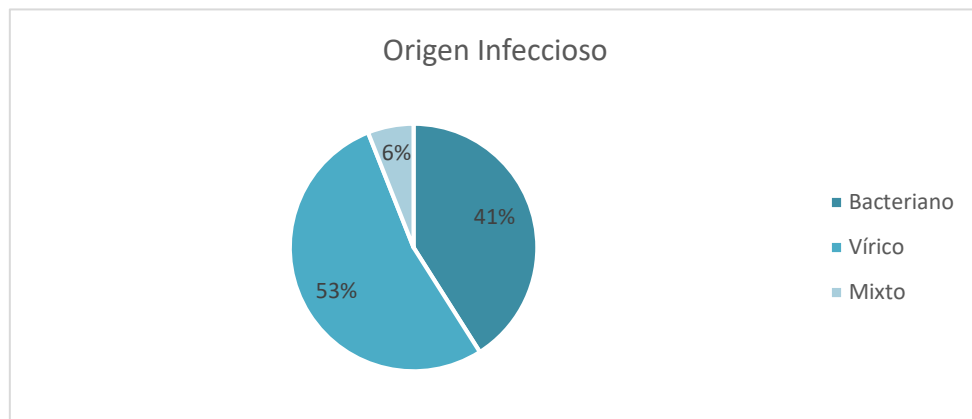


Figura 24 Distribución de las agudizaciones infecciosas en función de su etiología

6.2.6 Niveles de caspasa-1, IL-1 β e IL-18 en esputo

Observamos que las concentraciones en esputo de caspasa-1, IL-1 β , IL-1RA e IL-18 fueron significativamente mayores cuando la infección estaba presente (Figura 25).

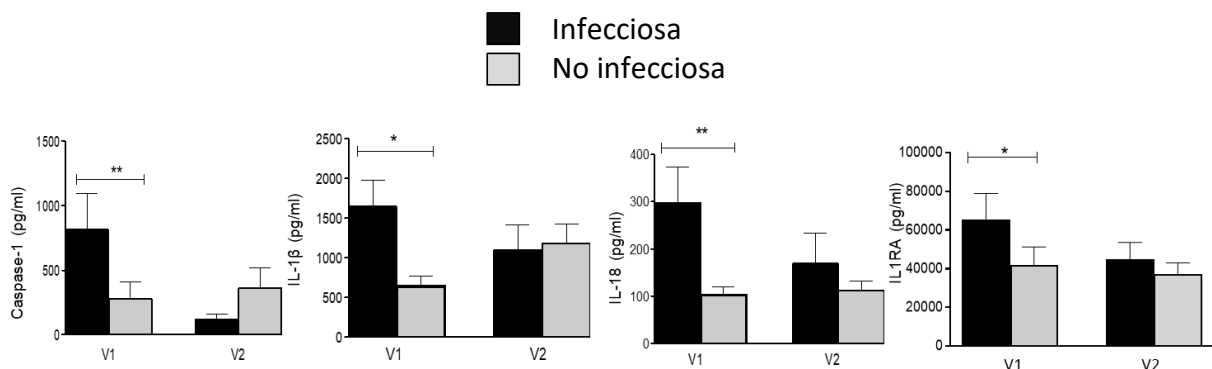


Figura 25 Niveles de mediadores del inflamasoma según el tipo de agudización

. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$

Debido a que el número de pacientes con infección vírica o bacteriana pura era muy pequeño no se pudo comparar el efecto de ambas por separado en el incremento de mediadores del inflamasoma.

6.2.7 ASC

Durante la agudización de EPOC detectamos ASC oligomérico en esputo, un marcador de la activación del inflamasoma, indicando que los oligómeros extracelulares de ASC están presentes durante la agudización de EPOC. Como control metodológico, mostramos que estos oligómeros de ASC desaparecieron cuando las muestras se redujeron antes del análisis (Figura 26).

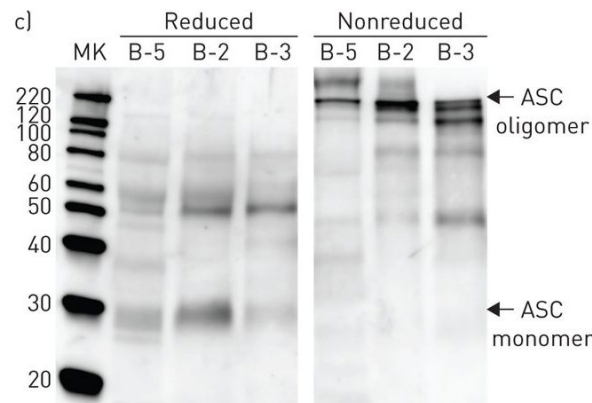


Figura 26 Western blot representativo de ASC para muestras de esputo de paciente agudizados.

Denotan los complejos ASC oligoméricos, un sello distintivo de la activación del inflamasoma. Los complejos oligoméricos ASC no se detectaron cuando las muestras se procesaron mediante condiciones simplificadas. MK: marcador

6.3 Capacidad funcional de respuesta a ligandos infecciosos y activación del inflamasoma

Para medir la respuesta funcional in-vitro a los agonistas del inflamasoma, así como a diferentes estímulos víricos y bacterianos de la respuesta inmune innata, se aislaron PBMCs de controles y pacientes en fase de agudización y estabilidad. Los PBMCs fueron estimulados con ligandos del inflamasoma, TLRs y NLRs, y medidas las concentraciones de distintas citocinas en el sobrenadante del cultivo. Para estos experimentos se reclutaron prospectivamente en nuestro hospital los pacientes detallados en la Tabla 8. Los pacientes reclutados durante la agudización fueron visitados 3 meses post alta, una vez en fase de estabilidad.

Brevemente los pacientes con EPOC eran mayores que el resto de los grupos y sin diferencias en la distribución por sexos y el IMC.

Papel del Inflamasoma en la EPOC estable y agudizada

	Control	Fumador Sano	EPOC Estable	EPOC Agudizado	Agudizados estabilizados
Numero	11	9	16	10	7
Edad	58,8	59,3	68,8 *	64,9	64,7
Genero (H/M)	7/4	3/4	12/1	8/2	5/2
Fumador (Si/No)	0/11	8/0	1/12	5/5	5/2
IMC	23	26	26,8	28	28,9
Charlson	0,22	0,13	1,3	1,8	2,14
FEV1%	100,51	95,58	45,04 [§]	44,33 ^{&}	44,16 [%]

Tabla 8 Características generales de la muestra incluida para el estudio de la Capacidad funcional de respuesta a ligandos infecciosos y activación del inflamasoma. *P<0,05

* EPOC estable vs. Controles. § EPOC estable vs. Control; & EPOC agudizado vs. Control; % EPOC agudizado y estabilizado vs. Control. FEV1%: forced expiratory volume in 1 s

6.3.1 Respuesta a Ligandos de Inflamasoma

Inicialmente se testó la capacidad de respuesta de los PBMCs a los agonistas del inflamasoma NLRP3 (i.e. ATP y Nigericina). Incluyendo los 5 grupos a estudio no se observaron diferencias significativas en la comparación de las medianas (Figura 27). Sí se observó que el inflamasoma era más capaz de responder a ATP en los pacientes estabilizados, indicando que el Inflamasoma ya había estado activado durante la agudización, y por ello presentaba menor capacidad de respuesta (Figura 27). Esta observación está de acuerdo con el incremento de caspasa en suero observado, y en los menores niveles de activación de caspasa-1 en PBMCs.

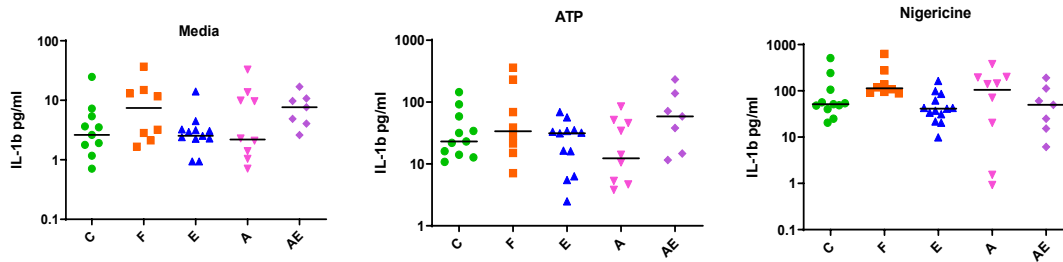


Figura 27 Capacidad de respuesta del inflammasoma medida como producción de IL-1 β en los diferentes grupos a estudio.

C= control; F= fumador; E: EPOC estable; A: EPOC agudizado; AE= Agudizado tras estabilización

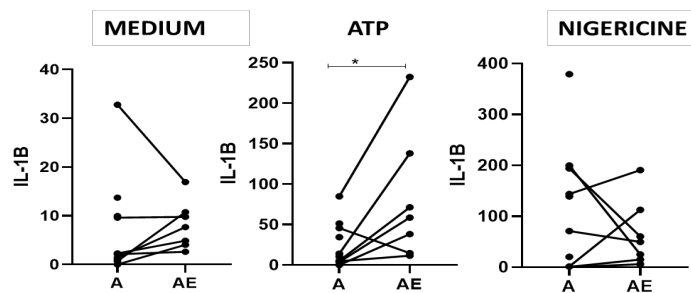


Figura 28 Diferencias en la producción de IL-1 β en respuesta a Agonistas del inflammasoma en agudización vs. Estabilidad.

*P<0.05 Agudizados vs. Estabilizados ATP

6.3.2 Respuesta a Agonistas de TLRs y NLRs.

Dada la observación de una diferente respuesta del inflammasoma en función de la tipología de la agudización, se exploró la capacidad de respuesta a antígenos víricos y/o bacterianos vía TLRs y NLRs (específicamente NOD1 y NOD2).

Papel del Inflamasoma en la EPOC estable y agudizada

6.3.2.1 Producción de IL-1 β

Sin estimulación (medio) no se observaron diferencias significativas en la producción de IL-1 β entre los diferentes grupos.

Sí se obtuvieron diferencias entre grupos en la producción de IL-1 β tras la estimulación de PBMCs con C12-IE-DAP (estimulador vía NOD1) y MDP (estimulador vía NOD2), pero no con LPS (TLR 4), PAM 3CSK4 (TLR1/2) y flagelina (St-FLA, TLR5) (Figura 29). Tanto para los agonistas de NOD1 como NOD2, se observó una disminución de la capacidad de producción de IL-1 β durante la agudización respecto a la fase estable, que fue recuperada posteriormente, aunque siendo solo significativo el cambio en el caso de los agonistas de NOD2 (Figura 30).

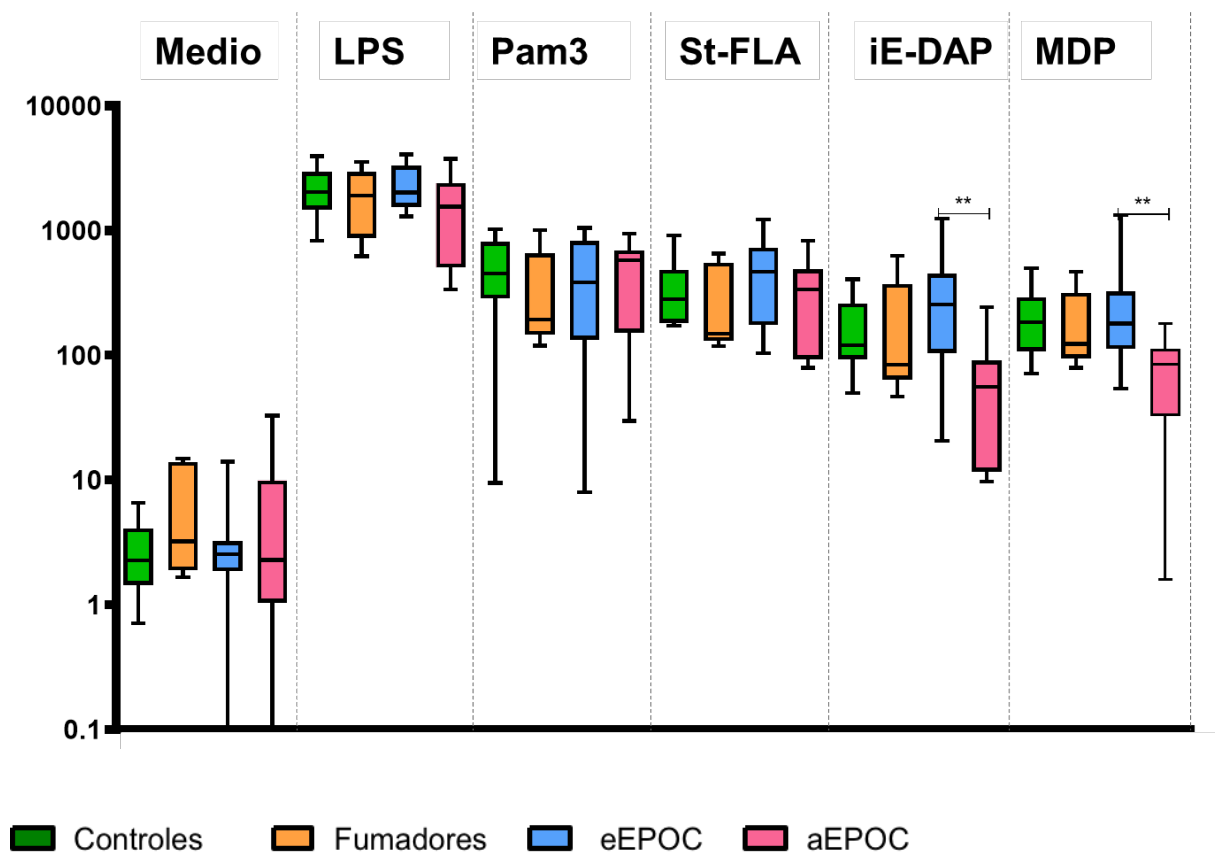


Figura 29 Diferencias en la producción de IL-1 β en respuesta a Agonistas de TLRs, NOD1 y NOD2.

**= $P < 0.001$ Agudizados vs. Estables

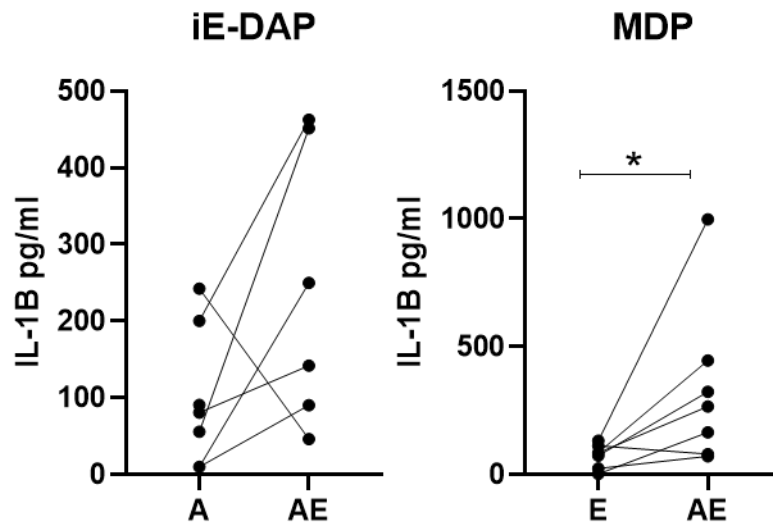


Figura 30 Diferencias en la producción de IL-1 β en respuesta a Agonistas de NOD1 y NOD2.

*= $P < 0.05$ Estables vs. Agudizados MDP

6.3.2.2 Producción de IL-6

Se observaron diferencias en la producción de IL-6 entre grupos en situación basal y tras estimulación con LPS, St-FLA, iE-DAP y MDP. En todos los casos fue debido a una menor producción de IL-6 de los PBMCs obtenidos de pacientes agudizados tras la estimulación con los diferentes agonistas, aunque solo se observaron diferencias significativas con C12-iE-DAP (estimulador vía NOD1), MDP (estimulador vía NOD2), flagelina (St-FLA, TLR5). En este caso se observó una recuperación de la capacidad de producción de IL-6 tras la estimulación en la fase de recuperación, que no fue significativa para ninguno de los estímulos (Figura 31).

Papel del Inflamasoma en la EPOC estable y agudizada

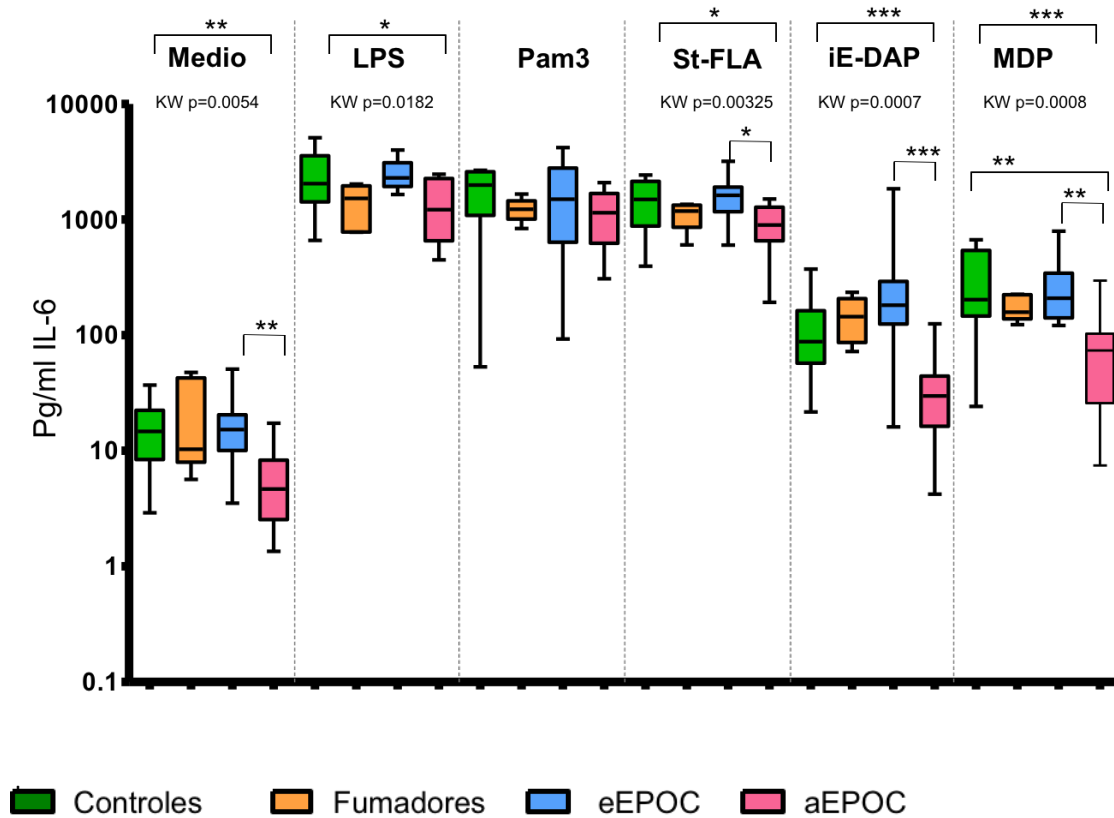


Figura 31 Diferencias en la producción de IL-6 en respuesta a Agonistas de TLRs, NOD1 y NOD2.

*= $P < 0.05$ **= $P < 0.001$ Agudizados vs. Estables

6.3.2.3 Producción de TNF- α

No se obtuvieron diferencias en los niveles de TNF- α entre los distintos grupos tras la estimulación con distintas sustancias (Figura 32).

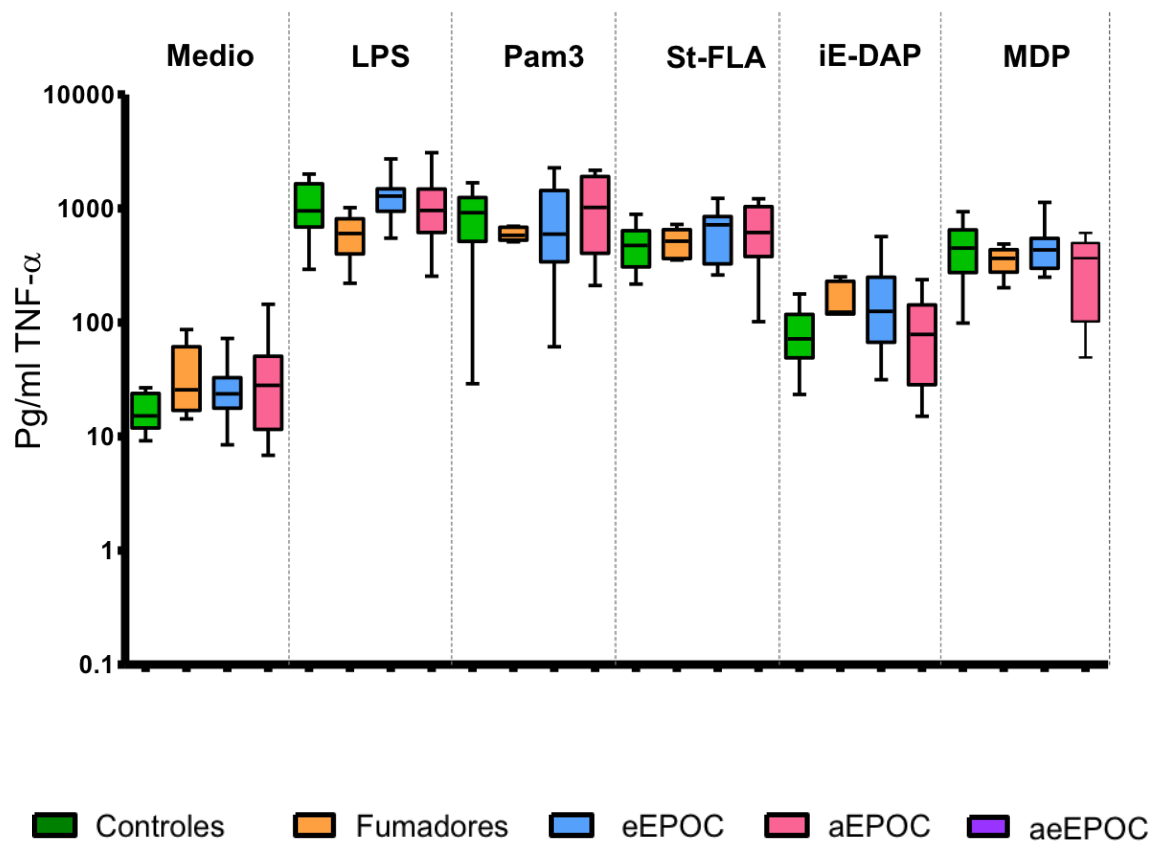


Figura 32 Diferencias en la producción de TNF- α en respuesta a Agonistas de TLRs, NOD1 y NOD2.

6.3.2.4 Producción de distintas citocinas en función del grado de obstrucción

Finalmente se observó una mayor producción de IL-1 β tras la estimulación con C12-iE-DAP en los pacientes con EPOC y una limitación al flujo aéreo más severa tras la administración de c12-iE-DAP.

La mayor producción de IL-1 β en GIII-IV se dio solo en respuesta a estímulos procedentes de bacterias Gramnegativas (Figura 33).

Papel del Inflamasoma en la EPOC estable y agudizada

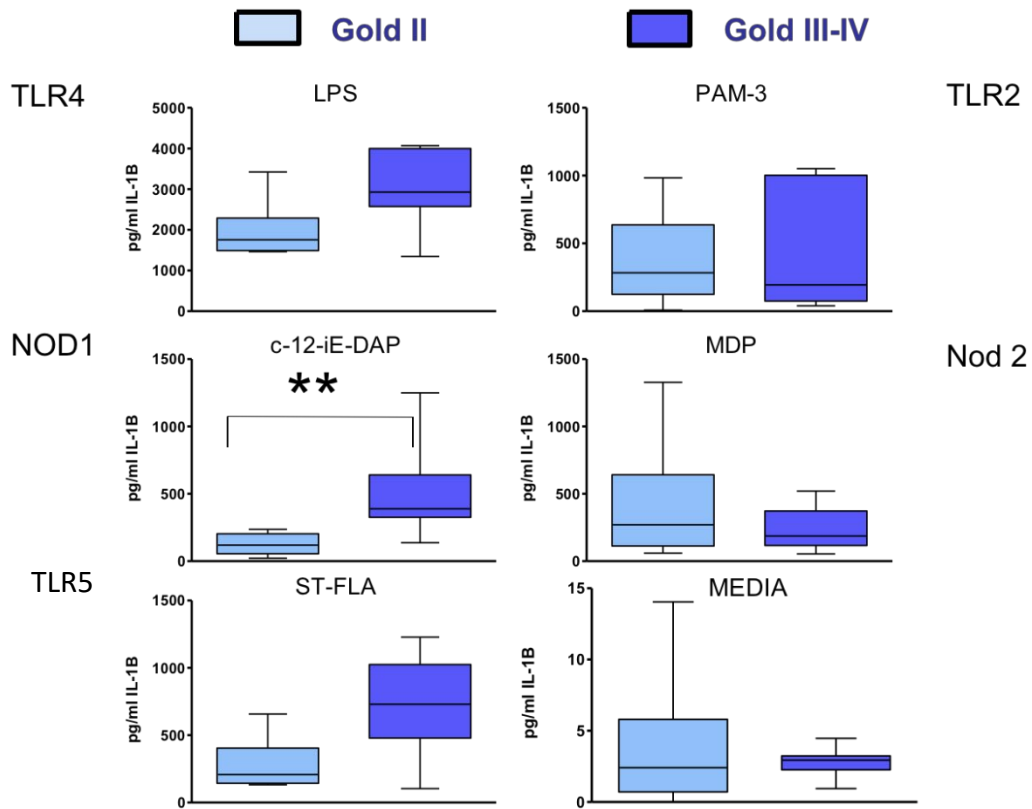


Figura 33 Diferencias en la producción de IL1β en respuesta a Agonistas de TLRs, NOD1 y NOD2 en pacientes EPOC con obstrucción moderada vs. Severa y muy severa, ** p<0.01

7 DISCUSIÓN

7.1 Principales resultados

Los resultados principales que este estudio muestra se resumen en los siguientes puntos:

1. Observamos un incremento en el mRNA de NLRP3 e IL-1 β en el tejido pulmonar de los pacientes con EPOC estable comparados con controles, dicho incremento está directamente correlacionado con el nivel de FEV1%. Pero no observamos diferencias a nivel proteico, y tanto la caspasa-1 como ASC se encontraban mayormente en sus formas inactivas. Estos resultados sugieren que en la EPOC estable el inflamasoma NLRP3 está pre-activado, a nivel pulmonar. Es decir, listo para ser activado por una segunda señal, pero no activo.
2. Durante las agudizaciones infecciosas de la EPOC encontramos a nivel extracelular (esputo) niveles incrementados de: caspasa 1 y la ASC oligomérica y las citocinas asociadas (IL-1 β e IL-18), indicando que el inflamasoma está activo en estas circunstancias. Así, es probable que en este escenario el episodio infeccioso sea la segunda señal que determina la activación del inflamasoma.
3. Hay diferencias en la capacidad de respuesta celular a los agonistas de NLRs y TLRs en fase de estabilidad y agudización. En las agudizaciones, observamos una menor actividad intracelular y mayor cantidad de caspasa-1 extracelular, indicando una menor capacidad de respuesta debido a que ya ha sido activado de manera reciente, que se recupera en la fase de estabilidad.
4. Finalmente, observamos que, en los pacientes con EPOC estable, la mayor capacidad de respuesta de los linfocitos circulantes, a antígenos de bacterias gramnegativas se asociada a la severidad del flujo aéreo.

7.2 Estudios previos

Los inflamasomas forman una familia de complejos proteicos intracelulares multiméricos que la mayoría de las veces incluyen un NLR como molécula sensora y, en algunos casos, una proteína adaptadora asociada a apoptosis speck-like que contiene un dominio de reclutamiento de caspasa (ASC) y procaspasa 1 (83,91). El inflamasoma mejor caracterizado es el NLRP3, que se activa en respuesta a diferentes patógenos, partículas y señales de peligro (83,91). La activación completa del inflamasoma NLRP3 requiere dos pasos biológicos

secuenciales. El primero (paso de cebado) incrementa los niveles de pro-IL-1 β y la transcripción de NLRP3, y el segundo (paso de activación) induce el plegado del inflamasoma activando la caspasa-1 y procesando y liberando las citocinas proinflamatorias IL-1 β e IL-18 (83,91). El cebado está relacionado con la presencia de inflamación o señales de peligro o daño mientras que la activación sólo ocurre tras la exposición a señales de peligro específicas (133). La activación conlleva la oligomerización del NLRP3 con ASC, en un gran complejo tipo-fibra llamado “speck” que puede detectarse mediante inmunofluorescencia o mediante unión cruzada de ASC en Western blots(90). Generalmente los niveles de mRNA de NLRP3 e IL-1 β se consideran marcadores de cebado de la inflamación, mientras que la oligomerización del NLRP3 y ASC y la presencia de caspasa-1 activa son marcadores de la activación del inflamasoma (88,95–97,103,134).

A lo largo de los últimos años, el conocimiento sobre la función del inflamasoma en diferentes condiciones inflamatorias ha aumentado de manera exponencial, principalmente como resultado de estudios en ratones knockout, ensayos celulares in vitro y el análisis molecular/funcional de las enfermedades autoinflamatorias producidas por la deficiencia de estos genes en humanos (85,101,135). Aquí hay que comentar que los resultados de esta tesis fueron obtenidos y publicados en el año 2016, siendo pioneros en este campo en las enfermedades respiratorias, cuando muchos de estos estudios posteriores que han citado nuestro trabajo no estaban publicados. A continuación, se detallan las principales asociaciones descritas hasta el momento.

7.2.1 Inflamasoma, tabaco y modelos animales

La relación del inflamasoma y el tabaco es controvertida. En modelos animales, la inhalación experimental de tabaco conjuntamente con inhibidores de caspasa-1 disminuye de manera significativa la inflamación de la vía aérea (111) lo que podría indicar un posible papel del inflamasoma en la patogénesis de la EPOC. Aun así, el extracto de cigarrillo (CSM) aplicado directamente en las células no activa el inflamasoma(136), sino que lo inhibe, por lo que la activación del inflamasoma en los modelos animales, puede deberse a un daño secundario mediado por el tabaco. De manera contradictoria, otro grupo demostró que la estimulación de PBMCs con partículas ultrafinas procedentes de fumadores, liberaron niveles más elevados de citocinas dependientes del NLRP3. (137).

En concordancia con estas observaciones, los ratones NLRP3 knockout expuestos al humo de tabaco muestran niveles más bajos de inflamación. Este descenso se ha asociado a la menor activación de caspasa-1 y la consecuente liberación reducida de IL-1 β /IL-18 y el flujo de neutrófilos en el BAL(138). También se ha observado una mayor concentración en el BAL de oligómeros de ASC de los ratones expuestos a tabaco(98). Este estudio postula que dichos oligómeros generan una amplificación de la respuesta inflamatoria de manera dependiente del inflamasoma. Complementariamente, Pauwels et al. demostraron que la inflamación pulmonar en ratones expuestos al humo de tabaco era dependiente de IL-1R1 y podría estar significativamente atenuada mediante la neutralización de IL-1 α o IL-1 β (139). En este caso, la inflamación producida por el humo del tabaco era independiente de la activación de IL-1 β a través del eje Nlrp3/caspasa-1 (139), en concordancia con las observaciones de inhibición de NLRP3 por parte de CSM.

Otro estudio llevado a cabo en ratones expuestos al humo de tabaco (140) mostró la importancia de IL-1 α y su receptor análogo IL-1R1 en la inflamación de la vía aérea inducida por el humo del tabaco y en la agudización del proceso inflamatorio durante la infección viral. Demostró que esta respuesta era dependiente de caspasa-1 y, por tanto, independiente de la señal IL-1 β de su receptor.

A nivel pulmonar, las células que expresan niveles elevados de mRNA de NLRP3 son los macrófagos alveolares, las células dendríticas y las células epiteliales(141). En todos estos tipos celulares, se puede inducir una respuesta proinflamatoria por determinados estímulos (por ejemplo tras el daño celular inducido por el humo del tabaco)(142). En esta línea, en un modelo animal de agudización de EPOC inducida por tabaco, la neutrofilia era dependiente de la liberación de IL-1 β /IL-18 (de manera dependiente de NLRP3/ASC y caspasea1/11); mientras que IL-1 α parecía dependiente de caspasa 1/11 independientemente de IPAF, AIM2 y NLRP3(143), implicando la dependencia de otros inflamasomas(86,143).

La IL-18 es otra interleucina que se activa a través del inflamasoma NLRP3. Su sobreexpresión vía inducción de Caspasa-1/11 mediante humo de tabaco en modelos pulmonares murinos produce inflamación pulmonar, enfisema y remodelamiento de la vía aérea y parece estar ligada a la sobre expresión vía inducción de caspasa 1/11 por el humo de tabaco que conlleva al desarrollo en pulmones murinos de inflamación, enfisema y remodelación de las vías aéreas pulmonares(144,145). Así, los ratones IL18R α knock out no muestran inflamación ni enfisema comparado con ratones salvajes y están parcialmente protegidos frente al daño pulmonar

producido por el tabaco(144). Es más, la expresión de IL18 en ratones expuestos al humo del tabaco se asocia con células CD4+/CD8+/CD19+/NK1¹⁺ que contribuyen al desarrollo de enfermedad pulmonar similar a la EPOC(145).

Así, en resumen, los modelos animales de EPOC inducida por tabaco muestran que el inflamasoma NLRP3 y sus citocinas asociadas, juegan un papel en el desarrollo de la inflamación, aunque no está claro cuál es el estímulo que inicia la activación del inflamasoma.

7.2.2 Inflamasoma y EPOC

En pacientes con EPOC, en contraste con nuestros resultados, Franklin et al. con un número limitado de individuos (n=4), observaron en el BAL oligómeros de ASC, lo que indicaría una activación de caspasa-1 y del inflamasoma en fase estable, pudiendo ser esta activación responsable de la liberación de IL-1 β (98). Cabe decir que el número de pacientes estudiados impide poder generalizar los resultados, de hecho, nosotros observamos caspasa-1 activa en tejido de pulmón en un 29% de los pacientes, no en todos. Nosotros demostramos que el mRNA pulmonar y los niveles de proteína caspasa-1 (tanto total como activa) eran similares entre fumadores, no fumadores y pacientes con EPOC. Sin embargo, el mRNA de NLRP3 era más elevado en pacientes con EPOC. En contraste con estos datos, Di Stefano et al. (146) no encontraron relación entre NLRP3, caspasa 1 e IL-1 β cuando compararon pacientes EPOC estables con fumadores. Cabe decir que en su estudio los niveles de NLRP3 fueron medidos por inmunohistoquímica, mientras que nosotros medimos los mediadores de mRNA indicadores del estado de cebado del inflamasoma.

Otros estudios han reportado niveles más elevados de IL-1 β en muestras de esputo e IL-1 α en muestras de tejido de pulmón de pacientes con EPOC cuando se comparaban con sujetos nunca fumadores(147,148) sugiriendo que no sólo debería considerarse la IL-1 β sino también la IL-1 α como un marcador importante en la inflamación inducida por humo del tabaco en pacientes con EPOC(139), destacar que la IL-1 es una citocina que puede procesarse independientemente del inflamasoma(120).

Por otro lado, los niveles de IL-18, así como la expresión de IL-1Ra en linfocitos CD8 son significativamente superiores en esputo y en células sanguíneas periféricas de pacientes con EPOC, comparados con sujetos sanos fumadores y no fumadores, lo que sugiere que el sistema IL-18/IL-1Ra está involucrado en la fase estable de la enfermedad(149). Sin embargo, la concentraciones de IL18 en el BAL son similares entre pacientes EPOC, fumadores y no

fumadores (146), aunque nosotros sí observamos algunas discrepancias en la transcripción del mRNA de IL-18 entre estos sujetos. En contraste, algunos estudios han demostrado que la producción de IL-18 por células T CD8+ se incrementaba en los pulmones de pacientes con EPOC (150) y la IL-18 se expresaba en el 80% de las células del epitelio bronquial y alveolar, incluyendo macrófagos pulmonares(151). Por tanto, existen controversias en este campo, sobre todo debidas a temas técnicos y/o la naturaleza de las muestras biológicas relacionadas con EPOC. La mayoría de estos estudios, sin embargo, tienen tamaños muestrales limitados y, de manera contraria a nuestro estudio, no analizaron si el inflammasoma estaba primado o activado. Debe tenerse en cuenta, igualmente, que los pacientes con EPOC suelen estar en tratamiento corticoideo, lo que podría reducir la actividad IL1 β debido a una mayor inducción de IL-1RA(152). Adicionalmente, la carga microbiana y el estatus de colonización de estos pacientes en fase estable no ha sido reportado en todos estos estudios, pudiendo ser también causa de las inconsistencias observadas.

7.2.3 Inflammasoma y exacerbaciones de la EPOC

En relación con las agudizaciones de la EPOC, nuestro trabajo fue el primero en reportar una activación del inflammasoma a nivel pulmonar en los episodios de origen infeccioso, que se evidenciaba por un incremento de IL-1 β , IL-18, Caspasa-1 y oligómeros de ASC en esputo. Un trabajo posterior encontró niveles significativamente más altos de ARNm de NLRP3, Casp-1, ASC, IL-18, IL-1 β y niveles más altos de IL-18 e IL-1 β en pacientes con agudización comparados con fumadores. Vieron además que estos mediadores del inflammasoma NLRP3 disminuyeron significativamente cuando los pacientes con EPOC del mismo grupo se estabilizaron clínicamente. Estos resultados concuerdan con los reportados en nuestra población de estudio.

7.3 Interpretación de resultados

En línea con estudios previos que mostraban una asociación de IL-1 β con la EPOC(153–155), nosotros encontramos una transcripción incrementada en los pulmones de los pacientes con EPOC estable. De manera añadida, también encontramos que la expresión de mRNA del NLRP3 se correlaciona de manera positiva con la severidad a la limitación al flujo aéreo y con la expresión del mRNA de IL-1 α , IL-18, IL-1 β , IL-8 y neutrófilo elastasa. Sin embargo, no

encontramos que Caspasa-1 esté en su forma activa durante la fase estable de la enfermedad. Estos resultados se encuentran en línea con los reportados por Di Stefano et al.(156) , pero en contra de los de Eltom et al.(156) , que mostraron un aumento en la actividad de caspasa 1 en tejido pulmonar de pacientes con enfisema. Aunque observamos niveles aumentados de las proteínas IL-1 β and IL-18 en fumadores activos con espirometría normal, el tabaquismo activo no influyó en los niveles de estas proteínas en pacientes con EPOC. De manera similar, estos resultados sugieren que la producción de IL-1 β e IL-18 se produce por un mecanismo diferente en esta situación, por ejemplo, en asociación con la actividad de la Neutrófilo elastasa. Cabe destacar que ninguno de los estudios anteriores ha analizado si el inflamasoma estaba primado o activado, ni si sus citocinas estaban en la forma activa, como hemos hecho nosotros en este trabajo.

Las agudizaciones de EPOC, según las define la ERS se caracterizan por disnea, tos y producción de esputo con un impacto negativo en la calidad de vida de los pacientes, provocando la progresión de la enfermedad, ingresos hospitalarios y aumento de la mortalidad. Estos síntomas son dependientes de mediadores proinflamatorios, por ejemplo la bradikinina, cuyo receptor B1R está aumentada e inducida por IL-1 β y LPS(157). El estudio de Di Stefano et al. sugería (en análisis llevado a cabo por inmunohistoquímica) que este complejo multimérico podría jugar un papel clave durante la fase de estabilidad de la enfermedad, como sugiere la ineficacia del Canakinumab, que es un anticuerpo bloqueante de IL-1 β , en pacientes EPOC estables(79). Nuestros resultados indican que en fase estable hay una preactivación de las citocinas asociadas al inflamasoma, y que en las agudizaciones infecciosas se da la segunda señal necesaria para activar el inflamasoma. Podría pensarse que el papel del inflamasoma durante las agudizaciones de la enfermedad podría deberse a una mayor liberación de ATP, estrés oxidativo y de los antígenos víricos y bacterianos. Todos estos factores, activan el inflamasoma y es plausible que sean la segunda señal necesaria para la producción y liberación de IL-1 β e IL-18 activas.

En este respecto, cabe destacar también el posible papel del microbioma. Se sabe que los pacientes EPOC poseen un 25% de bacterias durante la fase de estabilidad de la enfermedad que aumenta a un 50% durante las agudizaciones, lo que explicaría la mayor tasa de infecciones que pueden llevar a la agudización. Entre las bacterias se detectan H. influenza, S. pneumoniae, *Moraxella Catarrhalis*. De manera similar, las infecciones virales se encuentran en el 10% de los pacientes estables comparado con el 30-60% en pacientes severos o

exacerbados. Por tanto, parece plausible que el reconocimiento de estas bacterias y virus a través de PRRs lleve a la segunda señal necesaria para la activación del inflamasoma con la posterior liberación de IL-1 β en el esputo y tejido pulmonar de pacientes EPOC exacerbados(122). Así, nosotros describimos, por primera vez, que el inflamasoma se activa en los pulmones humanos durante las agudizaciones infecciosas de EPOC. Esto se evidenció por un aumento en las concentraciones en esputo de caspasa-1, IL-1 β e IL-18 que se observaron durante las agudizaciones infecciosas de la enfermedad (comparado con las no infecciosas).

El hecho de que encontráramos estas citocinas en el sobrenadante del esputo indica que estas proteínas se habían liberado de las células, sugiriendo que corresponden a sus formas activas(95,96). En consonancia con esta interpretación se encuentra el hecho de que encontramos oligómeros de ASC en esputo durante las agudizaciones infecciosas de EPOC. El hecho de que se han observado células sin partículas oligoméricas de ASC en el BAL en pequeñas series de pacientes con EPOC apoya aún más estos hallazgos(158).

Finalmente, nuestros resultados también concuerdan con los reportados por Bafadhel et al.(36) que identificaban diferentes patrones de respuesta inflamatoria durante las agudizaciones de EPOC y mostraban que el biomarcador que mejor identificaba la agudización de origen bacteriano era la concentración de IL-1 β . Se debería investigar de manera más concisa si esta respuesta del inflamasoma durante las agudizaciones infecciosas juega un papel protector o dañino. Los resultados de nuestro estudio muestran que el inflamasoma juega un papel inductor o si es un daño colateral de las mismas. Los resultados de nuestro estudio muestran que el inflamasoma juega un papel en la respuesta inflamatoria de las agudizaciones infecciosas de EPOC, sugiriendo que una inhibición de la señalización vía mediante Canakinumab podría ser beneficiosa para contrarrestar el incremento de citocinas que se ha reportado en las agudizaciones, y que puede desencadenar el daño pulmonar y pérdida de función observados tras los episodios de agudización.

En este sentido nuestros resultados de estimulaciones de PBMCs, también nos indican que en la fase de agudización ya se ha activado el inflamasoma, pues su capacidad de respuesta a la estimulación in vitro es menor, y se recupera cuando los pacientes alcanzan la fase de recuperación. Una limitación importante de estas observaciones es que los pacientes durante la agudización fueron tratados con corticoides, lo que podría haber inducido una menor capacidad de respuesta del inflamasoma in vitro. Aun así, nuestras pruebas in vitro con

estimulación de PBMCs con agonistas del inflamasoma en presencia de metilprednisolona no mostraron una disminución directa de la capacidad de respuesta del inflamasoma (Anexos 7 y 8).

Finalmente, nuestro trabajo sugiere que, en pacientes estables, en relación con la gravedad del flujo aéreo hay una mayor capacidad de producción de IL-1 β frente a antígenos reconocidos por TLR4, NOD1 y TLR5. Estos receptores son mayoritariamente responsables de responder a PRR provenientes de bacterias gramnegativas, y se pueden encontrar en proteobacterias que se han reportado asociadas a la disbiosis que se observa en la EPOC. En este sentido, nuestros resultados preliminares indicarían un posible efecto sistémico de esta disbiosis, que se tendría que comprobar en un estudio posterior que incluyera la determinación del microbioma pulmonar y el análisis de las manifestaciones sistémicas.

7.4 Fortalezas y Limitaciones

Este es el estudio más extenso dirigido a investigar la participación del inflamasoma NLRP3 en muestras de tejido pulmonar de pacientes con EPOC (y controles apropiados) y el primero en demostrar su potencial participación durante los episodios de agudización.

Tiene, sin embargo, algunas limitaciones. Debido a limitaciones clínicas, fuimos incapaces de obtener todas las mediciones en todos los pacientes y las muestras de tejido pulmonar no fueron accesibles durante las agudizaciones. Las muestras sanguíneas y de esputo durante las agudizaciones se recogieron durante las primeras 72 horas de la hospitalización, pero no fue posible obtener información al alta o durante su recuperación. Finalmente la definición de agudización que empleamos (basada en cultivo bacteriano y/o qPCR vírica), aunque se ha empleado previamente en otros estudios (36) puede llevar de manera potencial a sobre o infra diagnóstico.

7.5 Implicaciones clínicas

Nuestro estudio sugiere que la regulación del inflamasoma farmacológica durante los episodios de agudización, podría resultar en un descenso de la inflamación durante las agudizaciones infecciosas. Hasta el momento, se han llevado a cabo algunos ensayos clínicos randomizados en pacientes con EPOC estable (en estadios moderados y severos) que tenían como diana los efectores relacionados con el inflamasoma (es decir, IL-1 α e IL-1 β).

Como informa ClinicalTrials.gov, de 2007 a 2011 Novartis lanzó un estudio fase 1/2 (NCT00581945; estudio exploratorio, randomizado, doble ciego, controlado con placebo) para evaluar la severidad y tolerabilidad y eficacia de múltiples dosis de Canakinumab, un anticuerpo monoclonal anti- IL-1 β (159), versus placebo administrado vía intravenosa. Se evaluó la función pulmonar de los pacientes con EPOC. Desafortunadamente los resultados de estos ensayos clínicos no mostraron diferencias estadísticamente significativas en FEV1% y FVC entre los pacientes de ambos brazos del estudio.

Otro estudio (clinical trial: NCT01448850) analizó un anticuerpo monoclonal humano IgG2 contra IL-1R1 (MEDI8968), capaz de unirse tanto a IL-1 α como a IL-1 β en pacientes con EPOC estable con grado de obstrucción moderado, severo y muy severo. Se administraron bien 600 mg de manera intravenosa o 300 mg de manera subcutánea. Este estudio tampoco mostró efectos beneficiosos en estos pacientes durante las fases de agudización(160).

De manera similar, en otro estudio (clinical trial: NCT01322594) se valoró la eficacia y seguridad de MEDI2338, un anticuerpo monoclonal IgG1 que se une a IL1. Una vez más no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el brazo activo y el placebo.

Todos estos resultados clínicos concuerdan con las observaciones de nuestro estudio, donde vemos que el inflammasoma está primado pero no activo en fase estable. Sin embargo, estos ensayos no se han llevado a cabo durante las fases de agudización de la enfermedad, o en relación con el número de episodios infecciosos en estos pacientes tratados ni al nivel inflamatorio durante las agudizaciones, o su consecuente pérdida en función pulmonar (FEV1%) tras la agudización.

8 CONCLUSIONES

Nuestros resultados indican que el NLRP3 está cebado en los pulmones de los pacientes con EPOC durante las fases de estabilidad clínica y que las agudizaciones infecciosas constituyen una segunda señal robusta que dispara la activación del inflamasoma.

Los pacientes con EPOC presentan el inflamasoma en estado cebado pero no activado durante la fase de estabilidad de la enfermedad. Es decir, el inflamasoma NLRP3 en pacientes con EPOC estable está listo para ser activado por una segunda señal, pero no activo.

Durante las agudizaciones infecciosas el inflamasoma se activa, probablemente porque los estímulos infecciosos son esa segunda señal necesaria para su activación. Esto no ocurre en las agudizaciones no infecciosas

La capacidad de respuesta celular a distintos agonistas del inflamasoma también es distinta en las fases de estabilidad y agudización. Hay una menor capacidad de respuesta durante la agudización debido a que se ha activado recientemente. Tras dicho episodio recupera su estado basal.

Los pacientes con EPOC con mayor limitación al flujo aéreo tienen menor capacidad de respuesta a antígenos de bacterias gramnegativas.

Papel del Inflamasoma en la EPOC estable y agudizada

9 BIBLIOGRAFÍA

1. Rabe KF, Hurd S, Anzueto A, Barnes PJ, Buist SA, Calverley P, et al. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007;176(6):532–55.
2. Eisner MD, Balmes J, Katz PP et al. Lifetime environmental tobacco smoke exposure and the risk of chronic obstructive pulmonary disease. *Env Heal*. 2005;
3. Gall ET, Carter EM, Earnest CM, Stephens B. Indoor air pollution in developing countries: Research and implementation needs for improvements in global public health. *Am J Public Health*. 2013;
4. American thoracic society statement: Occupational contribution to the burden of airway disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2003.
5. Bush A. COPD: A pediatric disease. *COPD: Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*. 2008.
6. Who. WHO | Burden of COPD. Online. 2013.
7. Murray CJL, Lopez AD. Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: Global Burden of Disease Study. *Lancet*. 1997;
8. Lopez AD, Shibuya K, Rao C, Mathers CD, Hansell AL, Held LS, et al. Chronic obstructive pulmonary disease: current burden and future projections. *Eur Respir J*. 2006;
9. Soriano JB, Alfageme I, Miravittles M, de Lucas P, Soler-Cataluña JJ, García-Río F, et al. Prevalence and Determinants of COPD in Spain: EPISCAN II. *Arch Bronconeumol*. 2020;
10. Tirimanna PRS, Van Schayck CP, Den Otter JJ, Van Weel C, Van Herwaarden CLA, Van Den Boom G, et al. Prevalence of asthma and COPD in general practice in 1992: Has it changed since 1977? *Br J Gen Pract*. 1996;
11. Pena VS, Miravittles M, Gabriel R, Jimenez-Ruiz CA, Villasante C, Masa JF, et al. Geographic variations in prevalence and underdiagnosis of COPD: results of the IBERPOC multicentre epidemiological study. *Chest*. 2000 Oct;118(4):981–9.
12. Soriano JB, Miravittles M, Borderías L, Duran-Tauleria E, García Río F, Martínez J, et al. Diferencias geográficas en la prevalencia de EPOC en España: relación con hábito tabáquico, tasas de mortalidad y otros determinantes. *Arch Bronconeumol*. 2010;
13. Ko FWS, Hui DSC. Outdoor air pollution: Impact on chronic obstructive pulmonary disease patients. *Current Opinion in Pulmonary Medicine*. 2009.
14. Org WWVA, Arnedillo A, Noz M. El infradiagnóstico de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica en mujeres. ¿Otra tarea pendiente? The Underdiagnosis of Chronic Obstructive Pulmonary Disease in Women. Another Pending Task? *Arch Bronconeumol*. 2013;
15. Alonso T, Sobradillo P, de Torres JP. Chronic obstructive pulmonary disease in Women. Is it Different? *Arch Bronconeumol*. 2017 Apr;53(4):222–7.
16. Faner R, Sibila O, Agustí A, Bernasconi E, Chalmers JD, Huffnagle GB, et al. The microbiome in respiratory medicine: Current challenges and future perspectives. In: *European Respiratory Journal* [Internet]. European Respiratory Society; 2017 [cited 2021 Apr 23]. Available from: <https://doi.org/10.1183/13993003.02086-2016>
17. Berg G, Rybakova D, Fischer D, Cernava T, Vergès MCC, Charles T, et al. Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges. *Microbiome* [Internet]. 2020 Jun 30 [cited 2021 Nov 21];8(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32605663/>
18. Erb-Downward JR, Thompson DL, Han MK, Freeman CM, McCloskey L, Schmidt LA, et al. Analysis of the Lung Microbiome in the “Healthy” Smoker and in COPD. *Bereswill S*,

- editor. PLoS One [Internet]. 2011 Feb 22 [cited 2021 Apr 23];6(2):e16384. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0016384>
19. Nguyen NP, Warnow T, Pop M, White B. A perspective on 16S rRNA operational taxonomic unit clustering using sequence similarity. NPJ biofilms microbiomes [Internet]. 2016 Apr 20 [cited 2021 Nov 16];2. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28721243/>
 20. Rogers GB, Wesselingh S. Precision respiratory medicine and the microbiome. Vol. 4, The Lancet Respiratory Medicine. 2016. p. 73–82.
 21. Sethi S, Maloney J, Grove L, Wrona C, Berenson CS. Airway inflammation and bronchial bacterial colonization in chronic obstructive pulmonary disease. Am J Respir Crit Care Med [Internet]. 2006 May 1 [cited 2021 Apr 23];173(9):991–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16474030/>
 22. Sethi S, Murphy TF. Infection in the Pathogenesis and Course of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. N Engl J Med [Internet]. 2008 Nov 27 [cited 2021 Apr 23];359(22):2355–65. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19038881/>
 23. Dy R, Sethi S. The lung microbiome and exacerbations of COPD [Internet]. Vol. 22, Current Opinion in Pulmonary Medicine. Lippincott Williams and Wilkins; 2016 [cited 2021 Apr 23]. p. 196–202. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26964078/>
 24. Hilty M, Burke C, Pedro H, Cardenas P, Bush A, Bossley C, et al. Disordered microbial communities in asthmatic airways. PLoS One. 2010 Jan 5;5(1).
 25. Dickson RP, Erb-Downward JR, Freeman CM, McCloskey L, Beck JM, Huffnagle GB, et al. Spatial variation in the healthy human lung microbiome and the adapted island model of lung biogeography. Ann Am Thorac Soc [Internet]. 2015 Jun 1 [cited 2021 Apr 23];12(6):821–30. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25803243/>
 26. Cabrera-Rubio R, Garcia-Núñez M, Setó L, Antó JM, Moya A, Monsó E, et al. Microbiome diversity in the bronchial tracts of patients with chronic obstructive pulmonary disease. J Clin Microbiol [Internet]. 2012 Nov [cited 2021 Apr 23];50(11):3562–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22915614/>
 27. Rodriguez-Roisin R. Toward a consensus definition for COPD exacerbations. Chest. 2000;
 28. Ministerio de Sanidad Servicios Sociales e Igualdad. Guía de Práctica Clínica para el Tratamiento de Pacientes con Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC). GRAFO, S.A.; 2012.
 29. Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of COPD, Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD). 2017 Report.
 30. Miravittles M, Soler-Cataluña JJ, Calle M, Molina J, Almagro P, Quintano JA, et al. Guía española de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (GesEPOC) 2017. Tratamiento farmacológico en fase estable. Arch Bronconeumol. 2017;53:324–35.
 31. Pavord ID, Jones PW, Burgel P-R, Rabe KF. Exacerbations of COPD. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis. 2016;(Spec Iss):21–30.
 32. Esteban C, Quintana JM, Aburto M, Moraza J, Egurrola M, España PP, et al. Predictors of mortality in patients with stable COPD. J Gen Intern Med. 2008;23(11):1829–34.
 33. Soler-Cataluña JJ, Martínez-García MA, Román Sánchez P, Salcedo E, Navarro M, Ochando R. Severe acute exacerbations and mortality in patients with chronic obstructive pulmonary disease. Thorax. 2005;60(11):925–31.
 34. Soler-Cataluña J, Martinez-Garcia M, Sanchez L, Tordera M, Sanchez P. Severe

- exacerbations and BODE index: Two independent risk factors for death in male COPD patients. *Respir Med*. 2009;103(5):692–9.
35. Soler-Cataluña JJ, Martínez-García MÁ, Serra PC. Impacto multidimensional de las exacerbaciones de la EPOC. *Arch Bronconeumol*. 2010;
 36. Bafadhel M, McKenna S, Terry S, Mistry V, Reid C, Haldar P, et al. Acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease: identification of biologic clusters and their biomarkers. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011 Sep;184(6):662–71.
 37. Wedzicha JA. Exacerbations: etiology and pathophysiologic mechanisms. *Chest* [Internet]. 2002 [cited 2021 Nov 16];121(5 Suppl):136S-141S. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12010842/>
 38. Chin CL, Manzel LJ, Lehman EE, Humlicek AL, Shi L, Starner TD, et al. Haemophilus influenzae from patients with chronic obstructive pulmonary disease exacerbation induce more inflammation than colonizers. *Am J Respir Crit Care Med* [Internet]. 2005 Jul 1 [cited 2021 Apr 23];172(1):85–91. Available from: </pmc/articles/PMC2718449/>
 39. Hunt BC, Stanford D, Xu X, Li J, Gaggar A, Rowe SM, et al. Haemophilus influenzae persists in biofilm communities in a smoke-exposed ferret model of COPD. *ERJ open Res* [Internet]. 2020 Jul [cited 2021 Nov 16];6(3):00200–2020. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32802827/>
 40. Huang YJ, Sethi S, Murphy T, Nariya S, Boushey HA, Lynch S V. Airway Microbiome Dynamics in Exacerbations of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2014 [cited 2021 Nov 22];52(8):2813. Available from: </pmc/articles/PMC4136157/>
 41. Wang Z, Bafadhel M, Haldar K, Spivak A, Mayhew D, Miller BE, et al. Lung microbiome dynamics in COPD exacerbations. *Eur Respir J* [Internet]. 2016 Apr 1 [cited 2021 Nov 22];47(4):1082–92. Available from: <https://erj.ersjournals.com/content/47/4/1082>
 42. Xu X, Wang L. Association of Indoor and Outdoor Particulate Level with Chronic Respiratory Illness. *Am Rev Respir Dis*. 1993;
 43. Celli BR, Barnes PJ. Exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* [Internet]. 2007 Jun 1 [cited 2021 Nov 16];29(6):1224–38. Available from: <https://erj.ersjournals.com/content/29/6/1224>
 44. Calle Rubio M, Chacón BM, Rodríguez Hermosa JL. Exacerbación de la EPOC. *Arch Bronconeumol*. 2010;46:21–5.
 45. Decramer ML, Chapman KR, Dahl R, Frith P, Devouassoux G, Fritscher C, et al. Once-daily indacaterol versus tiotropium for patients with severe chronic obstructive pulmonary disease (INVIGORATE): A randomised, blinded, parallel-group study. *Lancet Respir Med*. 2013;1(7):524–33.
 46. Durlak JA, Weissberg RP, Dymnicki AB, Taylor RD, Schellinger KB. The Impact of Enhancing Students' Social and Emotional Learning: A Meta-Analysis of School-Based Universal Interventions. *Child Dev*. 2011;82(1):405–32.
 47. Donaldson GC, Seemungal TAR, Bhowmik A, Wedzicha JA. Relationship between exacerbation frequency and lung function decline in chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax*. 2002 Oct;57(10):847–52.
 48. Wedzicha JA, Calverley PMA, Seemungal TA, Hagan G, Ansari Z, Stockley RA, et al. The prevention of chronic obstructive pulmonary disease exacerbations by salmeterol/fluticasone propionate or tiotropium bromide. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008 Jan;177(1):19–26.
 49. Sullivan SD, Ramsey SD, Lee T a. The Economic Burden of COPD * The Economic Burden

- of COPD. *Chest* [Internet]. 2000;117:5S-9S. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10673466>
50. Vo TQ, Phung TCN, Vu TQ, Tran TN, Vo TTT, Phan VHA, et al. Cost trend analysis of chronic obstructive pulmonary disease among Vietnamese patients: Findings from two provincial facilities 2015–2017. *J Clin Diagnostic Res*. 2018;12(6):LC92–8.
 51. Wacker ME, Jörres RA, Schulz H, Heinrich J, Karrasch S, Karch A, et al. Direct and indirect costs of COPD and its comorbidities: Results from the German COSYCONET study. *Respir Med* [Internet]. 2016 Feb 1 [cited 2021 Nov 16];111:39–46. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26725462/>
 52. Hilleman DE, Dewan N, Malesker M, Friedman M. Pharmacoeconomic evaluation of COPD. [see comments]. *Chest*. 2000;
 53. Toy EL, Gallagher KF, Stanley EL, Swensen AR, Duh MS. The economic impact of exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease and exacerbation definition: a review. *COPD*. 2010;
 54. Chapman KR, Mannino DM, Soriano JB, Vermeire PA, Buist AS, Thun MJ, et al. Epidemiology and costs of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J Off J Eur Soc Clin Respir Physiol*. 2006;
 55. Association AL. American Lung Association [updated 2011] COPD Fact Sheet.
 56. Agusti AGN. COPD, a multicomponent disease: Implications for management. *Respiratory Medicine*. 2005.
 57. Agusti A, Calverley PMA, Celli B, Coxson HO, Edwards LD, Lomas DA, et al. Characterisation of COPD heterogeneity in the ECLIPSE cohort. *Respir Res*. 2010;
 58. Ries a L, Kaplan RM, Limberg TM, Prewitt LM. Effects of pulmonary rehabilitation on physiologic and psychosocial outcomes in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Ann Intern Med*. 1995;
 59. Celli BR, Cote CG, Marin JM, Casanova C, Montes de Oca M, Mendez R a, et al. The body-mass index, airflow obstruction, dyspnea, and exercise capacity index in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med*. 2004;
 60. Jones RC, Donaldson GC, Chavannes NH, Kida K, Dickson-Spillmann M, Harding S, et al. Derivation and validation of a composite index of severity in chronic obstructive pulmonary disease: The DOSE index. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009;
 61. Puhan MA, Garcia-Aymerich J, Frey M, ter Riet G, Anto JM, Agusti AG, et al. Expansion of the prognostic assessment of patients with chronic obstructive pulmonary disease: the updated BODE index and the ADO index. *Lancet*. 2009;
 62. Puhan M a, Hansel NN, Sobradillo P, Enright P, Lange P, Hickson D, et al. Large-scale international validation of the ADO index in subjects with COPD: an individual subject data analysis of 10 cohorts. *BMJ Open* [Internet]. 2012;2(6). Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3533065&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 63. Agustí A, Celli B, Faner R. What does endotyping mean for treatment in chronic obstructive pulmonary disease? *Lancet (London, England)* [Internet]. 2017 Sep 2 [cited 2021 Nov 16];390(10098):980–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28872030/>
 64. Sobradillo P, García-Aymerich J, Agustí À. Clinical phenotypes of COPD. *Arch Bronconeumol*. 2010;46 Suppl 1:8–11.
 65. Sobradillo P, Pozo F, Agustí A. P4 medicine: the future around the corner. *Arch Bronconeumol*. 2011;47(1):35–40.

66. Agustí A, Sobradillo P, Celli B. Addressing the complexity of chronic obstructive pulmonary disease: From phenotypes and biomarkers to scale-free networks, systems biology, and P4 medicine. Vol. 183, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2011. p. 1129–37.
67. Cano E, Sobradillo P, González N. Recommended Reading from the Hospital Clinic (Barcelona, Spain) Pulmonary and Critical Care Fellows. *Am J Respir Crit Care Med* [Internet]. 2011;184(4):482–3. Available from: <https://doi.org/10.1164/rccm.201101-0153RR>
68. Burgel P-R, Paillasseur J-L, Janssens W, Piquet J, ter Riet G, Garcia-Aymerich J, et al. A simple algorithm for the identification of clinical COPD phenotypes. *Eur Respir J*. 2017;
69. Martínez-Aguilar NE, Vargas-Camaño ME, Hernández-Pliego RR, Chaia-Semerena GM, Pérez-Chavira M del R. Immunopathology of chronic obstructive pulmonary disease. *Rev Alerg Mex* [Internet]. 2017 Jul 1 [cited 2021 May 7];64(3):327–46. Available from: <http://www.revistaalergia.mx>
70. Holtzman MJ, Byers DE, Alexander-Brett J, Wang X. The role of airway epithelial cells and innate immune cells in chronic respiratory disease. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2014 Oct 11 [cited 2021 Nov 17];14(10):686–98. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25234144/>
71. Schleimer RP. Innate Immune Responses and Chronic Obstructive Pulmonary Disease: “Terminator” or “Terminator 2”? *Proc Am Thorac Soc* [Internet]. 2005 [cited 2021 Nov 16];2(4):342. Available from: </pmc/articles/PMC2713325/>
72. Keatings VM, Barnes PJ. Granulocyte activation markers in induced sputum: comparison between chronic obstructive pulmonary disease, asthma, and normal subjects. *Am J Respir Crit Care Med* [Internet]. 1997 [cited 2021 Nov 16];155(2):449–53. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9032177/>
73. Fahy J V., Dickey BF. Airway mucus function and dysfunction. *N Engl J Med* [Internet]. 2010 Dec 2 [cited 2021 Nov 16];363(23):2233–47. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21121836/>
74. Sapey E, Stockley JA, Greenwood H, Ahmad A, Bayley D, Lord JM, et al. Behavioral and structural differences in migrating peripheral neutrophils from patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* [Internet]. 2011 May 1 [cited 2021 Nov 16];183(9):1176–86. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21257786/>
75. Cazzola M, Ora J, Cavalli F, Rogliani P, Matera MG. An Overview of the Safety and Efficacy of Monoclonal Antibodies for the Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Biologics* [Internet]. 2021 [cited 2021 Nov 17];15:363–74. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34475751/>
76. Jackute J, Zemaitis M, Pranys D, Sitkauskiene B, Miliauskas S, Sakalauskas R. The prognostic influence of tumor infiltrating M1 and M2 phenotype macrophages in resected non-small cell lung cancer. *Eur Respir J* [Internet]. 2016 Sep 1 [cited 2021 Nov 17];48(suppl 60):OA1775. Available from: https://erj.ersjournals.com/content/48/suppl_60/OA1775
77. Cruz T, López-Giraldo A, Noell G, Casas-Recasens S, Garcia T, Molins L, et al. Multi-level immune response network in mild-moderate Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD). *Respir Res* [Internet]. 2019 Jul 12 [cited 2021 Nov 22];20(1):1–9. Available from: <https://respiratory-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12931-019-1105-z>

78. Vlahos R, Bozinovski S. Role of Alveolar Macrophages in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Front Immunol* [Internet]. 2014 [cited 2021 Nov 16];5(SEP). Available from: [/pmc/articles/PMC4160089/](#)
79. Barnes PJ. Inflammatory mechanisms in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. 2016 Jul 1 [cited 2021 Nov 16];138(1):16–27. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27373322/>
80. Cosio MG, Saetta M, Agusti A. Immunologic Aspects of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. <http://dx.doi.org/101056/NEJMra0804752> [Internet]. 2009 Dec 10 [cited 2021 Nov 21];360(23):2445–54. Available from: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/nejmra0804752>
81. Tashkin DP, Wechsler ME. Role of eosinophils in airway inflammation of chronic obstructive pulmonary disease. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* [Internet]. 2018 Jan 17 [cited 2021 Nov 17];13:335. Available from: [/pmc/articles/PMC5777380/](#)
82. Charles A Janeway J, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ. Receptors of the innate immune system. 2001 [cited 2021 Nov 17]; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27129/>
83. Schroder K, Tschopp J. The Inflammasomes [Internet]. Vol. 140, *Cell. Cell*; 2010 [cited 2020 Nov 17]. p. 821–32. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20303873/>
84. Martinon F, Tschopp J. Inflammatory caspases and inflammasomes: master switches of inflammation. *Cell Death Differ* [Internet]. 2007 Jan [cited 2021 Nov 17];14(1):10–22. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16977329/>
85. Baroja-Mazo A, Martín-Sánchez F, Gomez AI, Martínez CM, Amores-Iniesta J, Compan V, et al. The NLRP3 inflammasome is released as a particulate danger signal that amplifies the inflammatory response. *Nat Immunol*. 2014;
86. Birrell MA, Eltom S. The role of the NLRP3 Inflammasome in the pathogenesis of airway disease [Internet]. Vol. 130, *Pharmacology and Therapeutics*. Elsevier Inc.; 2011 [cited 2020 Nov 17]. p. 364–70. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21421008/>
87. Gross O, Thomas CJ, Guarda G, Tschopp J. The inflammasome: an integrated view. *Immunol Rev*. 2011 Sep;243(1):136–51.
88. Baroja-Mazo A, Martín-Sánchez F, Gomez AI, Martínez CM, Amores-Iniesta J, Compan V, et al. The NLRP3 inflammasome is released as a particulate danger signal that amplifies the inflammatory response. *Nat Immunol* [Internet]. 2014 [cited 2020 Nov 17];15(8):738–48. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24952504/>
89. Montañó Estrada LF, Fortoul Van der Goes T, Rendón Huerta EP. ¿Qué son los inflamosomas? El NLRP3 como por ejemplo. *Rev la Fac Med*. 2017;60(1):42–9.
90. Lugrin J, Martinon F. Detection of ASC Oligomerization by Western Blotting. *Bio-protocol* [Internet]. 2017 [cited 2021 Nov 19];7(10). Available from: [/pmc/articles/PMC5660620/](#)
91. Latz E, Xiao TS, Stutz A. Activation and regulation of the inflammasomes [Internet]. Vol. 13, *Nature Reviews Immunology*. NIH Public Access; 2013 [cited 2020 Nov 17]. p. 397–411. Available from: [/pmc/articles/PMC3807999/?report=abstract](#)
92. De Nardo D, De Nardo CM, Latz E. New insights into mechanisms controlling the NLRP3 inflammasome and its role in lung disease. *Am J Pathol* [Internet]. 2014 Jan [cited 2021 Nov 17];184(1):42–54. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24183846/>
93. Cheon SY, Kim J, Kim SY, Kim EJ, Koo BN. Inflammasome and Cognitive Symptoms in Human Diseases: Biological Evidence from Experimental Research. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2020 Feb 1 [cited 2021 Nov 19];21(3). Available from:

- /pmc/articles/PMC7036918/
94. Eltom S, Stevenson CS, Rastrick J, Dale N, Raemdonck K, Wong S, et al. P2x7 receptor and caspase 1 activation are central to airway inflammation observed after exposure to tobacco smoke. *PLoS One*. 2011;
 95. Laliberte RE, Egger J, Gabel CA. ATP treatment of human monocytes promotes caspase-1 maturation and externalization. *J Biol Chem* [Internet]. 1999 Dec 24 [cited 2020 Nov 17];274(52):36944–51. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10601248/>
 96. Sarkar A, Mitra S, Mehta S, Raices R, Wewers MD. Monocyte derived microvesicles deliver a cell death message via encapsulated caspase-1. *PLoS One* [Internet]. 2009 Sep 25 [cited 2020 Nov 17];4(9):7140. Available from: </pmc/articles/PMC2744928/?report=abstract>
 97. Lee JK, Kim SH, Lewis EC, Azam T, Reznikov LL, Dinarello CA. Differences in signaling pathways by IL-1 β and IL-18. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2004 Jun 8 [cited 2020 Nov 17];101(23):8815–20. Available from: </pmc/articles/PMC423278/?report=abstract>
 98. Franklin BS, Bossaller L, De Nardo D, Ratter JM, Stutz A, Engels G, et al. The adaptor ASC has extracellular and “prionoid” activities that propagate inflammation. *Nat Immunol*. 2014;
 99. Sutterwala FS, Ogura Y, Zamboni DS, Roy CR, Flavell RA. NALP3: a key player in caspase-1 activation. *J Endotoxin Res* [Internet]. 2006 Aug [cited 2021 Nov 17];12(4):251–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16953978/>
 100. Yazdi AS, Guarda G, Riteau N, Drexler SK, Tardivel A, Couillin I, et al. Nanoparticles activate the NLR pyrin domain containing 3 (Nlrp3) inflammasome and cause pulmonary inflammation through release of IL-1 and IL-1 β . *Proc Natl Acad Sci*. 2010;
 101. Franchi L, Núñez G. The Nlrp3 inflammasome is critical for aluminium hydroxide-mediated IL-1 β secretion but dispensable for adjuvant activity. *Eur J Immunol*. 2008;
 102. Boyden ED, Dietrich WF. Nalp1b controls mouse macrophage susceptibility to anthrax lethal toxin. *Nat Genet* [Internet]. 2006 Feb [cited 2021 Nov 24];38(2):240–4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16429160/>
 103. Franklin BS, Bossaller L, De Nardo D, Ratter JM, Stutz A, Engels G, et al. The adaptor ASC has extracellular and “prionoid” activities that propagate inflammation. *Nat Immunol* [Internet]. 2014 [cited 2020 Nov 17];15(8):727–37. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24952505/>
 104. Bauernfeind F, Bartok E, Rieger A, Franchi L, Núñez G, Hornung V. Cutting edge: reactive oxygen species inhibitors block priming, but not activation, of the NLRP3 inflammasome. *J Immunol* [Internet]. 2011 Jul 15 [cited 2021 Nov 24];187(2):613–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21677136/>
 105. Guarda G, Braun M, Staehli F, Tardivel A, Mattmann C, Förster I, et al. Type I interferon inhibits interleukin-1 production and inflammasome activation. *Immunity* [Internet]. 2011 Feb 25 [cited 2021 Nov 24];34(2):213–23. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21349431/>
 106. dos Santos G, Kutuzov MA, Ridge KM. The inflammasome in lung diseases. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol* [Internet]. 2012 [cited 2021 Nov 24];303(8):627–33. Available from: <https://journals.physiology.org/doi/abs/10.1152/ajplung.00225.2012>
 107. Singanayagam A, Glanville N, Walton RP, Aniscenko J, Pearson RM, Pinkerton JW, et al. A short-term mouse model that reproduces the immunopathological features of rhinovirus-induced exacerbation of COPD. *Clin Sci (Lond)* [Internet]. 2015 [cited 2021 Nov 24];129(3):245–58. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25783022/>

108. Wright JL, Cosio M, Churg A. Animal models of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* [Internet]. 2008 Jul [cited 2021 Nov 24];295(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18456796/>
109. Beckett EL, Stevens RL, Jarnicki AG, Kim RY, Hanish I, Hansbro NG, et al. A new short-term mouse model of chronic obstructive pulmonary disease identifies a role for mast cell tryptase in pathogenesis. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. 2013 [cited 2021 Nov 24];131(3). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23380220/>
110. Eltom S, Stevenson CS, Rastrick J, Dale N, Raemdonck K, Wong S, et al. P2X7 receptor and caspase 1 activation are central to airway inflammation observed after exposure to tobacco smoke. *PLoS One* [Internet]. 2011 [cited 2021 Nov 19];6(9). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21915284/>
111. Churg A, Zhou S, Wang X, Wang R, Wright JL. The role of Interleukin-1 p in murine cigarette smoke-induced emphysema and small airway remodeling. *Am J Respir Cell Mol Biol* [Internet]. 2009 Apr 1 [cited 2020 Nov 17];40(4):482–90. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18931327/>
112. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *The Adaptive Immune System*. 2002 [cited 2021 Nov 17]; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21070/>
113. Baraldo S, Olliani KL, Turato G, Zuin R, Saetta M. The Role of Lymphocytes in the Pathogenesis of Asthma and COPD. *Curr Med Chem* [Internet]. 2007 Aug 30 [cited 2021 Nov 17];14(21):2250–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17896974/>
114. Polverino F, Seys LJM, Bracke KR, Owen CA. B cells in chronic obstructive pulmonary disease: moving to center stage. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* [Internet]. 2016 [cited 2021 Nov 17];311(4):L687–95. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27542809/>
115. Sarir H, Henricks PAJ, van Houwelingen AH, Nijkamp FP, Folkerts G. Cells, mediators and Toll-like receptors in COPD. *Eur J Pharmacol*. 2008 May 13;585(2–3):346–53.
116. Barnes PJ. Mediators of chronic obstructive pulmonary disease. *Pharmacol Rev* [Internet]. 2004 Dec [cited 2021 Nov 17];56(4):515–48. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15602009/>
117. Rovina N, Koutsoukou A, Koulouris NG. Inflammation and immune response in COPD: where do we stand? *Mediators Inflamm* [Internet]. 2013 [cited 2021 Nov 16];2013. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23956502/>
118. Wei J, Xiong XF, Lin YH, Zheng BX, Cheng DY. Association between serum interleukin-6 concentrations and chronic obstructive pulmonary disease: A systematic review and meta-analysis. *PeerJ* [Internet]. 2015 [cited 2021 Nov 17];2015(8). Available from: [/pmc/articles/PMC4556145/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27734407/)
119. Barnes PJ, Shapiro SD, Pauwels RA. Chronic obstructive pulmonary disease: Molecular and cellular mechanisms. *Eur Respir J*. 2003 Oct 1;22(4):672–88.
120. Yazdi AS, Ghoreschi K. The interleukin-1 family. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology* [Internet]. Springer New York LLC; 2016 [cited 2020 Nov 17]. p. 21–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27734407/>
121. Gea J, Barreiro E, Orozco-Levi M. Systemic inflammation in COPD. *Clin Pulm Med* [Internet]. 2009;16(5):233–42. Available from: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-70349662322&partnerID=40&md5=659a4583228978db24ee066ba5f7cb2e>
122. Rovina N, Koutsoukou A, Koulouris NG. Inflammation and immune response in COPD:

- Where do we stand? [Internet]. Vol. 2013, Mediators of Inflammation. Mediators Inflamm; 2013 [cited 2020 Nov 17]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23956502/>
123. Barnes PJ. Senescence in COPD and Its Comorbidities. *Annu Rev Physiol* [Internet]. 2017 Feb 10 [cited 2021 Nov 17];79:517–39. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27959617/>
 124. Rahman I. The role of oxidative stress in the pathogenesis of COPD: implications for therapy. *Treat Respir Med* [Internet]. 2005 [cited 2021 Nov 17];4(3):175–200. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15987234/>
 125. Garcia-Rio F, Miravittles M, Soriano JB, Muñoz L, Duran-Tauleria E, Sánchez G, et al. Systemic inflammation in chronic obstructive pulmonary disease: A population-based study. *Respir Res* [Internet]. 2010 May 25 [cited 2021 Nov 17];11(1):1–15. Available from: <https://respiratory-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/1465-9921-11-63>
 126. Calvano SE, Xiao W, Richards DR, Felciano RM, Baker H V., Cho RJ, et al. A network-based analysis of systemic inflammation in humans. *Nature*. 2005 Oct 13;437(7061):1032–7.
 127. Agustí A, Edwards LD, Rennard SI, MacNee W, Tal-Singer R, Miller BE, et al. Persistent Systemic Inflammation is Associated with Poor Clinical Outcomes in COPD: A Novel Phenotype. *PLoS One* [Internet]. 2012 May 18 [cited 2021 Nov 17];7(5):e37483. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0037483>
 128. Noell G, Cosío BG, Faner R, Monsó E, Peces-Barba G, de Diego A, et al. Multi-level differential network analysis of COPD exacerbations. *Eur Respir J*. 2017;50(3).
 129. Crapo O, Hankinson JL, Irvin C, MacIntyre NR, Voter KZ, Wise RA, et al. Standardization of spirometry: 1994 Update [Internet]. Vol. 152, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. American Thoracic Society; 1995 [cited 2020 Nov 17]. p. 1107–36. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7663792/>
 130. Spirometric reference values from a Mediterranean population - PubMed [Internet]. [cited 2020 Nov 17]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3730638/>
 131. Guiot J, Demarche S, Henket M, Paulus V, Graff S, Schleich F, et al. Methodology for sputum induction and laboratory processing. *J Vis Exp* [Internet]. 2017 Dec 17 [cited 2020 Nov 17];2017(130):56612. Available from: <https://www.jove.com/doi/10.1038/56612>
 132. Villena C, Pozo F, Barberà JA, Vaquer P, Agusti A. The CIBERES Pulmonary Biobank Consortium: An opportunity for cooperative international respiratory research [Internet]. Vol. 37, *European Respiratory Journal*. Eur Respir J; 2011 [cited 2020 Nov 17]. p. 204–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21205714/>
 133. Cheon SY, Kim J, Kim SY, Kim EJ, Koo B-N. Molecular Sciences Inflammasome and Cognitive Symptoms in Human Diseases: Biological Evidence from Experimental Research. [cited 2021 Nov 19]; Available from: www.mdpi.com/journal/ijms
 134. Eltom S, Stevenson CS, Rastrick J, Dale N, Raemdonck K, Wong S, et al. P2x7 receptor and caspase 1 activation are central to airway inflammation observed after exposure to tobacco smoke. *PLoS One* [Internet]. 2011 [cited 2020 Nov 17];6(9). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21915284/>
 135. Franchi L, Eigenbrod T, Nunez G. Cutting Edge: TNF- Mediates Sensitization to ATP and Silica via the NLRP3 Inflammasome in the Absence of Microbial Stimulation. *J Immunol*.

- 2009;
136. Buscetta M, Di Vincenzo S, Miele M, Badami E, Pace E, Cipollina C. Cigarette smoke inhibits the NLRP3 inflammasome and leads to caspase-1 activation via the TLR4-TRIF-caspase-8 axis in human macrophages. *FASEB J* [Internet]. 2020 Jan 8 [cited 2020 Nov 17];34(1):1819–32. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1096/fj.201901239R>
 137. De Falco G, Terlizzi M, Sirignano M, Commodo M, D’Anna A, Aquino RP, et al. Human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from smokers release higher levels of IL-1-like cytokines after exposure to combustion-generated ultrafine particles. *Sci Rep*. 2017;
 138. Hirota JA, Hirota SA, Warner SM, Stefanowicz D, Shaheen F, Beck PL, et al. The airway epithelium nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat protein 3 inflammasome is activated by urban particulate matter. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. 2012 [cited 2020 Nov 17];129(4). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22227418/>
 139. Pauwels NS, Bracke KR, Dupont LL, Van Pottelberge GR, Provoost S, Vanden Berghe T, et al. Role of IL-1 and the Nlrp3/caspase-1/IL-1 axis in cigarette smoke-induced pulmonary inflammation and COPD. *Eur Respir J*. 2011;
 140. Botelho FM, Bauer CMT, Finch D, Nikota JK, Zavitz CCJ, Kelly A, et al. IL-1 α /IL-1R1 expression in chronic obstructive pulmonary disease and mechanistic relevance to smoke-induced neutrophilia in mice. *PLoS One*. 2011;
 141. Heng TSP, Painter MW, Elpek K, Lukacs-Kornek V, Mauermann N, Turley SJ, et al. The immunological genome project: Networks of gene expression in immune cells [Internet]. Vol. 9, *Nature Immunology*. *Nat Immunol*; 2008 [cited 2020 Nov 17]. p. 1091–4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18800157/>
 142. Peeters PM, Perkins TN, Wouters EFM, Mossman BT, Reynaert NL. Silica induces NLRP3 inflammasome activation in human lung epithelial cells. *Part Fibre Toxicol*. 2013 Feb;10:3.
 143. Eltom S, Belvisi MG, Stevenson CS, Maher SA, Dubuis E, Fitzgerald KA, et al. Role of the inflammasome-caspase1/11-IL-1/18 axis in cigarette smoke driven airway inflammation: an insight into the pathogenesis of COPD. *PLoS One* [Internet]. 2014 Nov 18 [cited 2021 Nov 19];9(11). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25405768/>
 144. Kang M-J, Homer RJ, Gallo A, Lee CG, Crothers KA, Cho SJ, et al. IL-18 Is Induced and IL-18 Receptor α Plays a Critical Role in the Pathogenesis of Cigarette Smoke-Induced Pulmonary Emphysema and Inflammation. *J Immunol* [Internet]. 2007 Feb 1 [cited 2020 Nov 17];178(3):1948–59. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17237446/>
 145. Kang MJ, Choi JM, Kim BH, Lee CM, Cho WK, Choe G, et al. IL-18 induces emphysema and airway and vascular remodeling via IFN- γ , IL-17A, and IL-13. *Am J Respir Crit Care Med* [Internet]. 2012 Jun 1 [cited 2020 Nov 17];185(11):1205–17. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22383501/>
 146. Di Stefano A, Caramori G, Barczyk A, Vicari C, Brun P, Zanini A, et al. Innate immunity but not NLRP3 inflammasome activation correlates with severity of stable COPD. *Thorax*. 2014;
 147. Gessner C, Scheibe R, Wötzel M, Hammerschmidt S, Kuhn H, Engelmann L, et al. Exhaled breath condensate cytokine patterns in chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Med* [Internet]. 2005 Oct [cited 2020 Nov 17];99(10):1229–40. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16140223/>

148. Chung KF. Cytokines in chronic obstructive pulmonary disease. In: *European Respiratory Journal, Supplement*. 2001.
149. Wang J, Liu X, Xie M, Xie J, Xiong W, Xu Y. Increased expression of interleukin-18 and its receptor in peripheral blood of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *COPD*. 2012 Aug;9(4):375–81.
150. Dima E, Koltsida O, Katsaounou P, Vakali S, Koutsoukou A, Koulouris NG, et al. Implication of Interleukin (IL)-18 in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Cytokine*. 2015 Aug;74(2):313–7.
151. Imaoka H, Hoshino T, Takei S, Kinoshita T, Okamoto M, Kawayama T, et al. Interleukin-18 production and pulmonary function in COPD. *Eur Respir J*. 2008;
152. Hallegua DS, Weisman MH. Potential therapeutic uses of interleukin 1 receptor antagonists in human diseases. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2002.
153. Riteau N, Gasse P, Fauconnier L, Gombault A, Couegnat M, Fick L, et al. Extracellular ATP is a danger signal activating P2X7 receptor in lung inflammation and fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med [Internet]*. 2010 Sep 15 [cited 2021 Nov 19];182(6):774–83. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20522787/>
154. Gasse P, Mary C, Guenon I, Noulin N, Charron S, Schnyder-Candrian S, et al. IL-1R1/MyD88 signaling and the inflammasome are essential in pulmonary inflammation and fibrosis in mice. *J Clin Invest [Internet]*. 2007 Dec [cited 2021 Nov 19];117(12):3786–99. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17992263/>
155. Yazdi AS, Guarda G, Riteau N, Drexler SK, Tardivel A, Couillin I, et al. Nanoparticles activate the NLR pyrin domain containing 3 (Nlrp3) inflammasome and cause pulmonary inflammation through release of IL-1 α and IL-1 β . *Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]*. 2010 Nov 9 [cited 2021 Nov 19];107(45):19449–54. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20974980/>
156. Di Stefano A, Caramori G, Barczyk A, Vicari C, Brun P, Zanini A, et al. Innate immunity but not NLRP3 inflammasome activation correlates with severity of stable COPD. *Thorax [Internet]*. 2014 [cited 2021 Nov 19];69(6):516–24. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24430176/>
157. Talbot S, Lin JCJ, Lahjouji K, Roy JP, Sénécal J, Morin A, et al. Cigarette smoke-induced kinin B1 receptor promotes NADPH oxidase activity in cultured human alveolar epithelial cells. *Peptides [Internet]*. 2011 Jul [cited 2020 Nov 17];32(7):1447–56. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21600945/>
158. Franchi L, Núñez G. The Nlrp3 inflammasome is critical for aluminum hydroxide-mediated IL-1 β secretion but dispensable for adjuvant activity. *Eur J Immunol [Internet]*. 2008 Aug [cited 2020 Nov 17];38(8):2085–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18624356/>
159. Rogliani P, Calzetta L, Ora J, Matera MG. Canakinumab for the treatment of chronic obstructive pulmonary disease [Internet]. Vol. 31, *Pulmonary Pharmacology and Therapeutics*. Academic Press; 2015 [cited 2020 Nov 17]. p. 15–27. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25660162/>
160. Calverley PMA, Sethi S, Dawson M, Ward CK, Finch DK, Penney M, et al. A randomised, placebo-controlled trial of anti-interleukin-1 receptor 1 monoclonal antibody MEDI8968 in chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Res [Internet]*. 2017 Aug 9 [cited 2020 Nov 17];18(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28793896/>

10 ANEXOS

Journal Pre-proof



Sex differences between women and men with COPD: A new analysis of the 3CIA study

Tamara Alonso Pérez, Elena García Castillo, Julio Ancochea, Maria Teresa Pastor Sanz, Pere Almagro, Pablo Martínez-Cambor, Marc Miravittles, Mónica Rodríguez-Carballeira, Annie Navarro, Bernd Lamprecht, Ana S. Ramirez-Garcia Luna, Bernhard Kaiser, Inmaculada Alfageme, Ciro Casanova, Cristobal Esteban, Juan J. Soler-Cataluña, Juan P. de-Torres, Bartolome R. Celli, Jose M. Marin, Jose L. López-Campos, Gerben ter Riet, Patricia Sobradillo, Peter Lange, Judith Garcia-Aymerich, Josep M. Anto, Alice M. Turner, MeiLan K. Han, Arnulf Langhammer, Alice Sternberg, Linda Leivseth, Per Bakke, Ane Johannessen, Toru Oga, Borja Cosío, Andres Echazarreta, Nicolas Roche, Pierre-Régis Burgel, Don D. Sin, Milo A. Puhan, Joan B. Soriano, for the 3CIA collaboration

PII: S0954-6111(20)30245-6

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2020.106105>

Reference: YRMED 106105

To appear in: *Respiratory Medicine*

Received Date: 4 December 2019

Revised Date: 27 July 2020

Accepted Date: 28 July 2020

Please cite this article as: Pérez TA, Castillo ElenaGarcí, Ancochea J, Pastor Sanz MT, Almagro P, Martínez-Cambor P, Miravittles M, Carballeira MóRodrí-, Navarro A, Lamprecht B, Ramirez-Garcia Luna AS, Kaiser B, Alfageme I, Casanova C, Esteban C, Soler-Cataluña JJ, de-Torres JP, Celli BR, Marin JM, López-Campos JL, Riet Gt, Sobradillo P, Lange P, Garcia-Aymerich J, Anto JM, Turner AM, Han MK, Langhammer A, Sternberg A, Leivseth L, Bakke P, Johannessen A, Oga T, Cosío B, Echazarreta A, Roche N, Burgel Pierre-Ré, Sin DD, Puhan MA, Soriano JB, for the 3CIA collaboration, Sex differences between women and men with COPD: A new analysis of the 3CIA study, *Respiratory Medicine* (2020), doi: <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2020.106105>.

This is a PDF file of an article that has undergone enhancements after acceptance, such as the addition of a cover page and metadata, and formatting for readability, but it is not yet the definitive version of

Papel del Inflamasoma en la EPOC estable y agudizada

record. This version will undergo additional copyediting, typesetting and review before it is published in its final form, but we are providing this version to give early visibility of the article. Please note that, during the production process, errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

© 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.

CRedit Author Statement

Tamara Alonso, Elena García, María Teresa Pastor, Julio Ancochea, Joan B Soriano: Conceptualization, Methodology, Software

Tamara Alonso, Elena García, María Teresa Pastor, Joan B Soriano: Data curation, Writing- Original draft preparation

Julio Ancochea, Joan B Soriano: Supervision

All the authors: Visualization, Investigation.

All the authors: Writing- Reviewing and Editing,

Journal Pre-proof

Sex differences between women and men with COPD: A new analysis of the 3CIA study

Tamara Alonso Pérez,* Elena García Castillo,* Julio Ancochea, Maria Teresa Pastor Sanz, Pere Almagro, Pablo Martínez-Camblor, Marc Miravittles, Mónica Rodríguez- Carballeira, Annie Navarro, Bernd Lamprecht, Ana S Ramirez-Garcia Luna, Bernhard Kaiser, Inmaculada Alfageme, Ciro Casanova, Cristobal Esteban, Juan J Soler-Cataluña, Juan P de-Torres, Bartolome R Celli, Jose M Marin, Jose L López-Campos, Gerben ter Riet, Patricia Sobradillo, Peter Lange, Judith Garcia-Aymerich, Josep M Anto, Alice M Turner, MeiLan K Han, Arnulf Langhammer, Alice Sternberg, Linda Leivseth, Per Bakke, Ane Johannessen, Toru Oga, Borja Cosío, Andres Echazarreta, Nicolas Roche, Pierre-Régis Burgel, Don D Sin, Milo A Puhan, Joan B Soriano & for the 3CIA collaboration.

* Shared first authors

Address for correspondence:

Dr. Joan B Soriano

Hospital Universitario de la Princesa, Diego de León 62, Neumología 6ª planta, 28006-Madrid, Spain

Email: jbsoriano2@gmail.com

Cellular: +34 618 86 77 69

File information:

Date: December, 2019

Word count: 2,502 words

References: 33 references

Illustrations: Three tables and 2 figures

Keywords: COPD, female, sex, survival

Abstract:

Background: There is partial evidence that COPD is expressed differently in women than in men, namely on symptoms, pulmonary function, exacerbations, comorbidities or prognosis. There is a need to improve the characterization of COPD in females.

Methods: We obtained and pooled data of 17 139 patients from 22 COPD cohorts and analysed the clinical differences by sex, establishing the relationship between these characteristics in women and the prognosis and severity of the disease. Comparisons were established with standard statistics and survival analysis, including crude and multivariate Cox-regression analysis.

Results: Overall, 5,355 (31.2%) women were compared with men with COPD. Women were younger, had lower pack-years, greater FEV₁%, lower BMI and a greater number of exacerbations (all $p < 0.05$). On symptoms, women reported more dyspnea, equal cough but less expectoration ($p < 0.001$). There were no differences in the BODE index score in women (2.4) versus men (2.4) ($p = 0.5$), but the distribution of all BODE components was highly variable by sex within different thresholds of BODE. On prognosis, 5-year survival was higher in COPD females (86.9%) than in males (76.3%), $p < 0.001$, in all patients and within each of the specific comorbidities that we assessed. The crude and adjusted RR and 95% C.I. for death in males was 1.82 (1.69-1.96) and 1.73 (1.50-2.00), respectively.

Conclusions: COPD in women has some characteristic traits expressed differently than compared to men, mainly with more dyspnea and COPD exacerbations and less phlegm, among others, although long-term survival appears better in female COPD patients.

Abstract word count: 250 words

INTRODUCTION

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is a respiratory condition characterized by chronic, progressive and mostly irreversible airflow limitation, associated with exposure to tobacco smoke, inhalation of occupational or environmental toxins or biomass combustion products^{1,2}. COPD is a complex and heterogeneous disease associated with high morbidity and mortality. According to the latest update of the Global Burden of Disease Study, the prevalence of COPD in 2017 was 174 million people worldwide³ and it was estimated that it became the third most common cause of death globally since 2012, after ischemic heart disease and cerebrovascular disease⁴.

Population aging, a phenomenon more seen in women due to their longer longevity than men, and massive female uptake of smoking, has led to an increase in respiratory diseases associated with smoking in women, especially in the middle-aged, which has increased not only the prevalence, but also the associated morbidity and mortality. In the USA, COPD is already the leading cause of death among female smokers⁵. Since 2000, the number of women dying from COPD in the USA surpassed the number of men⁶, and an assessment of mortality rates due to COPD showed a smaller decrease in the mortality rate among women with moderate or severe COPD than among men⁷.

Despite this evidence, COPD is still considered mainly a “men's disease” by some clinicians, associated with a diagnostic bias that contributes to under-diagnosis in women⁸. Two similar studies, one conducted in the USA and Canada,⁹ and the other in Spain¹⁰, concluded that diagnosis of COPD was biased according to the sex of the patient. The results showed that given equivalent clinical conditions, men have a 1.5-fold chance of receiving a provisional diagnosis of COPD, a bias that is significantly reduced when abnormal spirometry results are available. Spirometry testing and referral to a pulmonologist are less common for women,¹¹ who suffer a significant delay in the diagnosis of COPD, explainable by voluntary postponement of access to

a consultation, or in some patients by the prevalence of symptoms of fatigue or depression that point to a different type of treatment.

Although data are limited, some studies have suggested that COPD is expressed differently in women than in men in relation to symptoms, pulmonary function, exacerbations or comorbidities^{12,13,14,15} such that there is a need to improve the characterization of the disease in females in order to optimize the therapeutic approach of these patients. To address this issue, we obtained and pooled data of 17 139 patients from 22 COPD cohorts from seven countries and analysed the clinical differences of COPD by sex, establishing the relationship between these characteristics and the prognosis and severity of the disease.

METHODS

Study population

In this international study, we analysed patients from the COPD Cohorts Collaborative International Assessment (3CIA) initiative¹⁶. We obtained individual pooled data from 22 prospective cohort studies that systematically recruited patients with COPD in publicly-funded hospitals, except for the Copenhagen City Heart Study (CCHS)¹⁷ and the HUNT study¹⁸, which were population-bases studies. Details of each individual study have been published previously. All patients had a definition of COPD characterized by a post-bronchodilator ratio between the forced expiratory volume in the first second (FEV₁) and the forced vital capacity (FVC) of less than 0.7. Spirometry was performed using the standards provided by the American Thoracic Society and European Respiratory Society¹⁹. We obtained a minimum individual dataset including the vital status (up to death, right truncation or 2017), age, sex, smoking status, pre-bronchodilator and post-bronchodilator FEV₁ and FVC, and dyspnea measured with the modified Medical Research Council (mMRC) scale²⁰. The primary investigators of each of the

participating 3CIA cohorts provided individual patient data for pooled analysis. All participants provided informed written consent, and each study was approved by the respective ethics committee.

We evaluated the study sample using prognostic parameters for COPD patients: age, dyspnea by mMRC scale, exercise capacity by the 6-min walk distance (6MWD), health-related quality of life by the Saint George's Respiratory Questionnaire (SGRQ) and BODE index score²¹. We also evaluated the presence of comorbidities by the Charlson index. Metabolic syndrome was defined as a cluster of three conditions: arterial hypertension, diabetes mellitus and obesity ($BMI \geq 30 \text{ kg/m}^2$). Participants were classified using the GOLD 2019 spirometric system into four grades (1-4) based on post-bronchodilator percent predicted FEV_1 as stage 1 ($FEV_1 \geq 80\%$), stage 2 ($FEV_1 79\%-50\%$), stage 3 ($FEV_1 30\%-49\%$) and stage 4 ($FEV_1 < 30\%$). Groups ABCD were defined by self-reported severity of dyspnea (mMRC) and severe exacerbations in the previous year¹.

3CIA was an observational study with variable follow-up. For the present analysis, follow up was censored five years after recruitment. During this follow up period, the principal investigators of each centre reported patient medical records, hospital admissions and deaths in a prospective manner.

Outcomes

The primary outcome was to better describe the clinical characteristics of women with COPD in a large international cohort of patients, evaluating the possible differential aspects of COPD versus men. Secondary outcomes were to analyse the mortality by all causes according to sex, as well as to evaluate the potential role of gender, among other variables, as a predictor of mortality in COPD.

Statistical analysis

The 3CIA database manager quality-controlled all data centrally and created a clean database with a data dictionary. All implausible or missing variables were queried with the original study investigators and removed the datum from the central database if errors could not be corrected. Because cohorts had different follow-up times, patients were censored at five years of follow-up.

Descriptive statistics used mean and standard deviation for continuous variables and counts with percentages for categorical variables. Comparisons between groups were performed with the chi-squared test for categorical variables and the ANOVA test for continuous variables. We estimated 5-year all-cause mortality by sex (total and by covariates), using Kaplan-Meier survival curves. We conducted both univariate and multivariate survival analyses based on the Cox proportional hazards model, using each of the potential predictors of mortality as independent variables and survival as the dependent variable. As per standard statistical practice, for the multivariate analysis, we only incorporated those variables significantly associated with mortality in the univariate analysis. Results were expressed as risk ratio (RR) with 95% confidence interval (CI). Alpha error was set at 0.05.

RESULTS

We pooled data from 22 COPD cohorts with a total of 17 139 patients. Table 1 shows demographic and clinical characteristics of patients by sex. Overall, 5,355 (31.2%) were women with a mean \pm SD age of 62.1 \pm 10.1 years, significantly younger than men (65.0 \pm 10.2, $p < 0.001$). Women had lower pack-years (33.3 vs 47.8, $p < 0.001$), greater FEV₁ (% predicted) (60.9% vs 56.2%, $p < 0.001$), lower body mass index (BMI; 26.4 vs 27.0, $p < 0.001$), and a greater number of exacerbations in the last year (1.2 vs 1.0, $p = 0.008$). Regarding symptoms, women reported higher grades of dyspnea by the mMRC scale (1.8 vs 1.7, $p = 0.002$), equal cough ($p=0.407$) but less expectoration (37.2% vs 45.9%, $p < 0.001$). Distribution of patients classified by the GOLD 2019 staging system was sex-dependent, but no differences were found

in the BODE index score in women versus men (2.4 in both groups, $p = 0.5$). Selected co-morbidities, such as arterial hypertension and cardiovascular disease, quality of life (SGRQ) and some respiratory medications (LAMA or LABA or LABA + ICS), were also similar between sexes, all with $p > 0.05$ (Table 1).

We then compared clinical and physiologic characteristics between women and men stratified by degree of airflow obstruction (FEV_1 , % of predicted) (Table 2). Women with severe or very severe airflow limitation ($< 50\%$ FEV_1 of predicted) were significantly younger, less smokers and had lower BMI than men, all with $p < 0.001$. They also reported higher grades of dyspnea and had more co-morbidities evaluated by the Charlson index (2.6 vs 2.3, $p = 0.003$). No gender differences were found in the number of exacerbations in the last year in these patients. Similarly, in the subgroup of patients with more preserved pulmonary function ($FEV_1 \geq 50\%$), women also were younger, less smokers and presented a higher degree of dyspnea and worse nutritional status (BMI) than men; however, these women had less co-morbidities evaluated by the Charlson index (1.7 vs 2.4, $p < 0.001$), a trend which was opposite to women with severe and very severe airflow limitation.

Figure 1 shows the relationship between BODE index score and its components [BMI, FEV_1 (% predicted), dyspnea (mMRC), 6MWD] by gender. Sex specific differences occurred in BMI at low BODE scores, MRC dyspnoea score in mid-range BODE scores (2-4), 6MWT distance at BODE scores ≤ 5 and FEV_1 at BODE scores ≤ 6 .

Figure 2 shows Kaplan-Meier curves for 5-year mortality (all-cause mortality) by sex and selected co-morbidities (asthma, arterial hypertension, diabetes mellitus, cardiovascular disease and metabolic syndrome). The Kaplan-Meier analysis showed that survival was significantly higher in females (86.9%) than in males (76.3%), $p < 0.001$. Survival remained better for women even when stratified by co-morbidities (asthma; 88.6% vs 83.1%, $p < 0.001$; cardiovascular comorbidities (hypertension, diabetes, cardiovascular disease or metabolic syndrome) all $p < 0.05$), albeit with smaller differences than the whole group analysis.

Finally, Table 3 presents the crude relative risks of determinants of mortality, and a multivariate model with an adjusted analysis. As expected COPD mortality in COPD was increased in male, current-smokers, and was increased with mMRC, number of exacerbations, Charlson index and presence of all co-morbidities explored, except for asthma. In contrast, COPD mortality in COPD had a significantly inverse association with BMI, % predicted FEV₁, and BMI. The most parsimonious multivariate model included sex, age and the single BODE components; as it can be seen, male sex was associated with increased mortality 1.73 (1.50-2.00) after adjustment.

DISCUSSION

Within this large, international study that includes a significant representation of women (31.2% of patients enrolled), we report that women with COPD develop a disease with a number of specific clinical characteristics, and better survival. Also, differences by sex occur in all four BODE components, especially in less severe COPD.

Several studies have previously reported sex-related differences in clinical manifestations of COPD, although our study has been carried out in a larger international cohort which brings both unprecedented precision and representativeness. Our results, aligned with previous publications^{8,12,14,22}, confirm that women with COPD were younger and require less cumulative smoking exposure than men. They presented a more symptomatic disease in terms of dyspnea, although they reported less sputum than males, with no differences in cough, as reported elsewhere²³. Regarding co-morbidities, the concomitant diagnosis of asthma in women (25.8%) was more frequent than in men (19.5%) $p < 0.001$. However, unlike the data obtained in the analysis of other cohorts, diabetes mellitus was more frequent in men, without significant differences in arterial hypertension or cardiovascular disease^{14,24}.

In terms of functional impairment, we saw that women had greater FEV₁ % than men. However, they had significantly worse exercise capacity (6MWD), lower BMI and higher

intensity of dyspnea (mMRC). Generally, for the same degree of airflow obstruction they were younger, less frequently current smokers, had lower BMI and higher dyspnea. Some studies suggest that other non-physiological factors, such as anxiety or depression, may be involved in the perception of dyspnea and should be systematically evaluated in female COPD patients²⁵.

In our study, we analysed the relationship between BODE index score and its components by sex. We found that women had better lung function (FEV₁%) than men with the same BODE score, as long as this score was not higher than 6 points (no sex-related differences in very severe patients). With regard to exercise capacity, on the other hand, women had lower 6MWD than men, except in patients with BODE score higher than 5 points (also very severe patients). In the case of nutritional status, women had lower BMI than men with the same BODE score, only in those cases with mild disease (BODE score less than 2 points). This evidence indicates that the differences by sex in either the contribution of each component of the BODE or in the total index score decrease as the severity of the disease increases, which is a novel finding. Since % predicted FEV₁, dyspnea score and exercise capacity each provide independent information regarding severity in patients with COPD, the multi-dimensional BODE index might have greater prognostic value in women with COPD than men²⁶. Our data suggested that the proportional weight of each of the components of the BODE index varied by sex, dyspnea by the mMRC scale and BMI being the most important parameters in women²⁷.

In terms of survival, population-based studies show that universally females live longer than males, but COPD epidemiological studies suggest that mortality rates are declining faster in men than in women with COPD^{7,28}. Indeed there are few clinical studies that determined sex-related differences in COPD survival, with contradictory results. Most of them included patients with severe disease and chronic respiratory failure^{29,30,31,32}, except for one based on a well phenotyped population with a wide range of COPD severity; this study showed that all-cause and respiratory mortality were lower in females than in males²⁶.

Our study results support a better survival of women with COPD compared to men (crudely and adjusted by demographic and clinical factors). Males were older, had greater smoking exposure and a higher Charlson index score than females, so all these factors could contribute to the sex differences in the mortality of these patients. In terms of prognosis, the study shows that, adjusted for all the significant prognostic variables, male sex remained an independent adverse prognostic factor. In fact, men had an adjusted all-cause mortality risk 1.73 times greater than women. Age and all four components of the BODE index also had an independent, deleterious effect on survival. Notably, the inverse association of BMI with mortality, both in the crude 0.98 (0.97-0.99), as well as the adjusted analyses 0.96 (0.95-0.97), further supports the so-called obesity paradox in COPD³³.

Our study has several limitations. Firstly, most of the patients were from hospital-based cohorts, and therefore may not represent the COPD population at large. Specifically, our study population could be affected by a well-described gender-bias in the diagnosis of COPD, which implies that women may, to some extent, be underrepresented. However, we do not consider that this fact distorts our findings or reduces its validity because our study includes a significant representation of women in a large cohort of patients with strict diagnostic criteria, which might be considered a strength. Secondly, only selected comorbidities were explored, so frequent diseases in women with COPD as anxiety, depression or osteoporosis were not objectively evaluated. Thirdly, the survival analysis evaluated all-cause mortality, as regrettably specific information about different causes of death was not collected consistently in all cohorts and participants.

To conclude, our results indicate that women with COPD were younger, less frequently smokers, and had better pulmonary function, but experienced more dyspnea and exacerbations. However, women with COPD had better survival than men. Our findings highlight the existence of significant sex-related differences in COPD risk and outcomes, supporting the importance of a better multidimensional approach to COPD in women.

REFERENCES

1. Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of COPD. Global Initiative for Chronic Obstructive Pulmonary Disease (GOLD) 2019. Disponible en: <https://goldcopd.org>
2. Hu G, Zhou Y, Tian J, Yao W, Li J, Li B, et al. Risk of COPD from exposure to biomass smoke: a meta-analysis. *Chest* 2010;138(1):3-6
3. Soriano JB, Abajobir AA, Abate KH, Abera SF, Agrawal A, Ahmed MB, et al. Global, regional and national deaths, prevalence disability-adjusted life years, and years lived with disability for chronic obstructive pulmonary disease and asthma, 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet Respir Med* 2017;5:691-706
4. Vos T, Flaxman AD, Naghavi M, Lozano R, Michaud C, Ezzati M, et al. Years lived with disability (YLDs) for 1160 sequelae of 289 diseases and injuries 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* 2012;380:2163-96
5. Thun MJ, Carter BD, Feskanich D, Freedman ND, Prentice R, López A, et al. 50-year trends in smoking-related mortality in the United States. *N Eng J Med* 2013;368:351-64
6. Mannino DM, Homa DM, Akinbami LJ, Ford ES, Redd SC. Chronic pulmonary disease surveillance-United States, 1971-2000. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2002;1:SS6
7. Ford ES, Mannino DM, Zhao G, Li C, Croft JB. Changes in mortality among US adults with COPD in two national cohort recruited from 1971-1975 and 1988-1994. *Chest* 2012;141:101-10
8. Ancochea J, Miravittles M, García Río F, Muñoz L, Sánchez G, Sobradillo V, et al. Infradiagnóstico de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica en mujeres: cuantificación del problema, determinantes y propuestas de acción. *Arch Bronconeumol* 2013;49(6):223-29

9. Chapman KR, Tashkin DP, Pye DJ. Gender bias in the diagnosis of COPD. *Chest* 2001;119:1691-95
10. Miravittles M, de la Roza C, Naberan K, Lamban M, Gobartt E, Martín A, et al. Problemas con el diagnóstico de la EPOC en atención primaria. *Arch Bronconeumol* 2006;42:3-8
11. Watson L, Vestbo J, Postma DS, Decramer M, Rennard S, Kiri VA, et al. Gender differences in the management and experience of chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Med* 2004;98:1207-13
12. De Torres JP, Casanova C, Hernández C, Abreu J, Aguirre-Jaime A, Celli BR. Gender and COPD in patients attending a pulmonary clinic. *Chest* 2005;128:2012-26
13. Celli B, Vestbo J, Jenkins CR, Jones PW, Ferguson GT, Calverley PM, et al. Sex differences in mortality and clinical expressions of patients with chronic obstructive pulmonary disease. The TORCH experience. *Am J Respir Crit Care Med* 2011;183(3):317-22
14. Agustí A, Calverley PM, Celli B, Coxson HO, Edwards LD, Lomas DA, et al. Characterisation of COPD heterogeneity in the ECLIPSE cohort. *Respir Res* 2010;11:122
15. Fernández-García S, Represas – Represas C, Ruano-Raviña A, Mosteiro-Añón M, Mouronte-Roibas C, Fernández-Villar A. Social Profile of Patients Admitted for COPD Exacerbations. A Gender Analysis. *Arch Bronconeumol*.2019 Apr 11. pii: S0300-2896(19)30120-6. doi: 10.1016/j.arbres.2019.03.009. [Epub ahead of print]
16. Soriano JB, Lamprecht B, Ramírez AS, Martínez Camblor P, Kaiser B, Alfageme I, et al. Mortality prediction in chronic obstructive pulmonary disease comparing the GOLD 2007 and 2011 staging systems: a pooled analysis of individual patient data. *Lancet Respir Med* 2015;3(6):443-50

17. Aguib Y, Al Suwaidi J. The Copenhagen City Heart Study (Østerbroundersogelsen). *Glob Cardiol Sci Pract* 2015;2015(3):33
18. Krokstad S, Langhammer A, Hveem K, Holmen TL, Midthjell K, Stene TR, et al. Cohort Profile: the HUNT Study. *Int J Epidemiol* 2013;42(4):968-77
19. Miller MR, Hankinson J, Brusasco V, Burgos F, Casaburi R, Coates A, et al. ATS/ERS Task Force. Standardisation of spirometry. *Eur Respir J* 2005;26:319-338
20. Bestall JC, Paul EA, Garrod R, Garnham R, Jones PW, Wedzicha JA. Usefulness of the Medical Research Council (MRC) dyspnea scale as a measure of disability in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 1999;54:581-586
21. Celli BR, Cote CG, Marin JM, Casanova C, Montes de Oca M, Mendez RA, et al. The body-mass index, airflow obstruction, dyspnea, and exercise capacity in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2004; 350(10):1005-12
22. Lopez Varela MV, Montes de Oca M, Halbert RJ, Muiño A, Perez-Padilla R, Tálamo C, et al. Sex-related differences in COPD in five Latin American cities: the PLATINO study. *Eur Respir J* 2010;36:1034-41
23. Lamprecht B, Vanfleteren LE, Studnicka M, Allison M, McBurnie MA, Vollmer WM, et al. Sex-related differences in respiratory symptoms: result from the BOLD study. *Eur Respir J* 2013; 42(3):858-60
24. Almagro P, López García F, Cabrera FJ, Montero L, Morchón D, Díez J, et al. Comorbidity and gender-related differences in patients hospitalized for COPD: the ECCO study. *Respir Med* 2010;104:253-9
25. De Torres JP, Casanova C, Montejo de Garcini A, Aguirre-Jaime A, Celli BR. Gender and respiratory factors associated with dyspnea in chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Res* 2007;8:18

26. De Torres JP, Cote CG, López MV, Casanova C, Díaz O, Marín JM, et al. Sex differences in mortality in patients with COPD. *Eur Respir J* 2009;33:528-35
27. De Torres JP, Casanova C, Montejo de Garcini A, Aguirre-Jaime A, Celli BR. COPD heterogeneity: Gender differences in the multidimensional BODE index. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 2007;2(2):151-55
28. Gershon A, Hwee J, Victor JC, Wilton A, Wu R, Day A, et al. Mortality trends in women and men with COPD in Ontario, Canada, 1996-2012. *Thorax* 2015;70:121-26
29. Miyamoto K, Aida A, Nishimura M, Aiba M, Kira S, Kawakami Y. Gender effect on prognosis of patients receiving long-term home oxygen therapy. The Respiratory Failure Research Group in Japan. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;152:972-6
30. Crockett AJ, Cranston JM, Moss JR, Alpers JH. Survival on long-term oxygen therapy in chronic airflow limitation: from evidence to outcomes in the routine clinical setting. *Intern Med J* 2001;31:448-54
31. Franklin KA, Gustafson T, Ranstam J, Strom K. Survival and future need of long-term oxygen therapy for chronic obstructive pulmonary disease-gender differences. *Respir Med* 2007;101:1506-11
32. Machado MC, Krishnan JA, Buist SA, Bilderbarck AL, Fazolo GP, Santarosa MG, et al. Sex differences in survival of oxygen-dependent patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Med* 2005;99:1546-54
33. Chittal P, Babu AS, Lavie CJ. Obesity paradox: does fat alter outcomes in chronic obstructive pulmonary disease? *COPD*. 2015 Feb;12(1):14-8

Papel del Inflamasoma en la EPOC estable y agudizada

Journal Pre-proof

Table 1. Demographic and clinical characteristics of COPD patients, by gender

Characteristics	Women 5,355 (31.2%)	Men 11,784 (68.8%)	p value
Age (years)	62.1 ± 10.1	65.0 ± 10.2	< 0.001
BMI (kg/m ²)	26.4 ± 6.1	27.0 ± 5.0	< 0.001
Pack-year index	33.3 ± 25.6	47.8 ± 28.7	< 0.001
GOLD 2019 group			< 0.001
A	34.9%	39.4%	
B	41.0%	37.2%	
C	5.6%	6%	
D	18.5%	17.4%	
GOLD spirometric staging			< 0.001
1	20.0%	14.5%	
2	47.1%	44.1%	
3	23.3%	29.8%	
4	9.5%	11.6%	
Number of exacerbations in the last year	1.2 ± 1.7	1.0 ± 1.5	0.008
Dyspnea mMRC (points)	1.8 ± 1.4	1.7 ± 1.3	0.002
Cough	52.5%	50.8%	0.407
Sputum	37.2%	45.9%	< 0.001
FEV ₁ (% of predicted)	60.9 ± 23.2	56.2 ± 21.9	< 0.001
6MWD	363.8 ± 120.2	396.3 ± 127.1	< 0.001
BODE index	2.4 ± 2.3	2.4 ± 2.1	0.503
SGRQ	38.9 ± 22.5	38.0 ± 21.9	0.098
Charlson index	2.1 ± 1.9	2.3 ± 2.0	< 0.001
Arterial hypertension	43.1%	43.1%	0.991
Diabetes mellitus	5.3%	11.2%	< 0.001
Cardiovascular disease	27.6%	29.9%	0.079
Asthma	25.8%	19.5%	< 0.001
Pharmacological treatment			

Journal Pre-proof

LAMA or LABA	20.1%	20.0%	0.349
LABA + LAMA	5.2%	7.7%	0.038
LABA + ICS	30.7%	30.5%	0.122
LABA+LAMA+ICS	44.0%	41.8%	0.014

Data are expressed as mean \pm SD or %. Abbreviations: BMI, body mass index; GOLD, global obstructive lung disease; mMRC, modified medical research council; FEV₁, forced expiratory volume in the first second; 6MWD, 6-minute walk distance; BODE body mass index, degree of airway obstruction, dyspnea and exercise capacity by 6MWD; SGRQ, St. George's Respiratory Questionnaire; LAMA, long acting muscarinic antagonist; LABA, long acting Beta 2 agonist; ICS: inhaled corticosteroids

Table 2. Comparison of clinical and physiologic characteristics between women and men stratified by degree of airflow obstruction (FEV₁, % of predicted)

Clinical characteristics	FEV ₁ ≥ 50%		p value	FEV ₁ < 50%		p value
	Women	Men		Women	Men	
	3,584 (34.3%)	6,879 (65.7%)		1,755 (26.6%)	4,851 (73.4)	
Age (years)	61.6 ± 10.5	64 ± 10.5	<0.001	63.1 ± 9.3	66.5 ± 9.4	<0.001
BMI (kg/m ²),	26.7 ± 5.9	27.4 ± 4.8	<0.001	25.6 ± 6.4	26.4 ± 5.3	<0.001
Pack-years,	32 ± 25	45.3 ± 28.1	<0.001	35.4 ± 26.3	51.2 ± 29.2	<0.001
Charlson index,	1.7 ± 1.8	2.4 ± 1.9	<0.001	2.6 ± 1.9	2.3 ± 2	0.003
Number of exacerbations in the last year,	1.1 ± 1.6	0.7 ± 1.3	<0.001	1.3 ± 1.8	1.3 ± 1.6	0.674
Dyspnea mMRC (points), n (%)						
0-1	60.1%	65.2%	<0.001	22.7%	27.3%	<0.001
2-4	39.9%	34.8%		77.3%	72.7%	

Data are expressed as mean ± SD or %. Abbreviations: BMI, body mass index; mMRC, modified medical research council

Table 3. Crude and multivariate analysis of predictors of mortality

	Crude RR and 95% C.I.	Adjusted RR and 95% C.I.
Sex, male	1.82 (1.69-1.96)	1.73 (1.50-2.00)
Age	1.07 (1.06-1.08)	1.04 (1.03-1.05)
Smoking status		
- Current	1.30 (1.14-1.49)	
- Former	1.42 (0.76-2.64)	
BMI	0.98 (0.97-0.99)	0.96 (0.95-0.97)
% predicted FEV ₁	0.97 (0.96-0.98)	0.98 (0.97-0.99)
mMRC	1.39 (1.36-1.42)	1.14 (1.08-1.21)
6-MWD	0.99 (0.99-0.99)	0.98 (0.97-0.99)
AECOPD	1.11 (1.07-1.14)	-
Charlson index	1.13 (1.10-1.15)	-
Hypertension	1.23 (1.04-1.46)	-
Diabetes	1.58 (1.35-1.86)	-
Cardiovascular Disease	1.32 (1.13-1.55)	-
Asthma	0.98 (0.88-1.09)	-

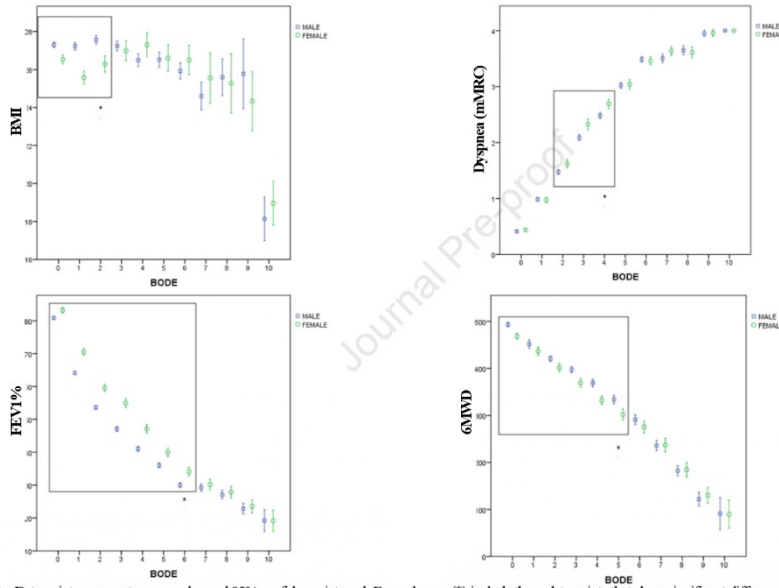
Note: For the multivariate analysis, we only incorporated those variables significantly associated with mortality in the univariate analysis.

Abbreviations: BMI: body mass index; 6-MWD: 6-minute walk distance; % predicted FEV₁: percent predicted forced expiratory volume in the first second; AECOPD: acute exacerbations of COPD; RR: relative risk

Papel del Inflamasoma en la EPOC estable y agudizada

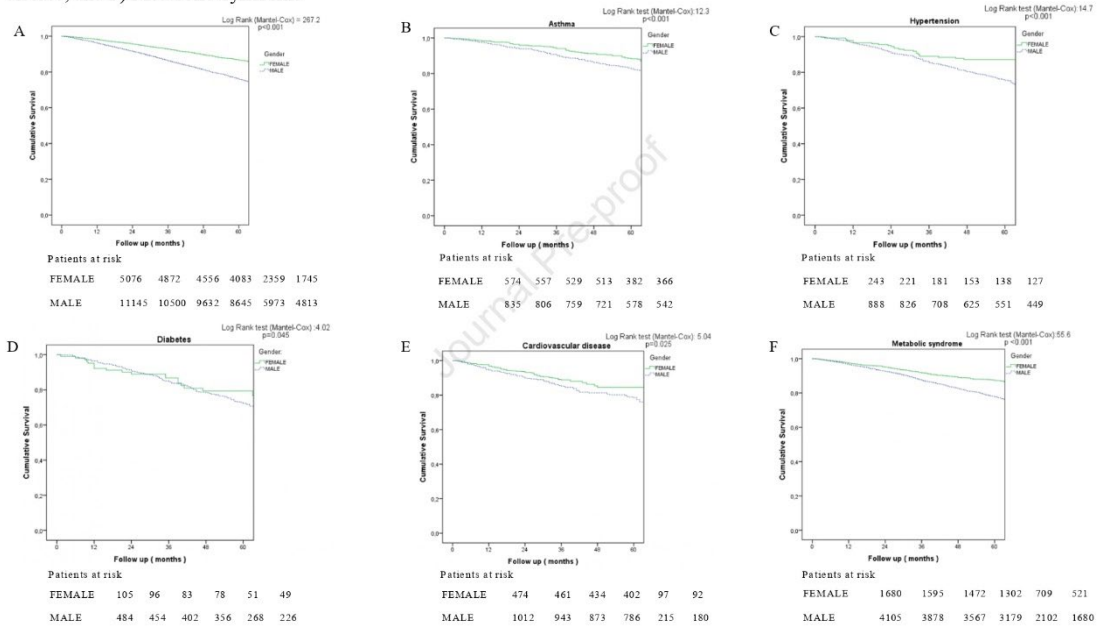
Journal Pre-proof

Figure 1. Relationship between BODE index score and its components [BMI, FEV1%, dyspnea (mMRC), 6MWD] by gender



Note: Data points represents mean value and 95% confidence interval. Framed areas (*) include those data points that show significant differences by gender ($p < 0.05$)
Abbreviations: BMI, body mass index; FEV1%, forced expiratory volume in one second; mMRC, modified medical research council; 6MWD, 6-minute walk distance

Figure 2. Five-year survival curves of COPD patients by gender in A) air, B) Asthma, C) hypertension; D) Diabetes; E) Cardiovascular disease; and F) Metabolic Syndrome



HIGHLIGHTS

- There are sex-related differences in COPD risk and outcomes.
- Women with COPD are younger, less frequently smokers and had better lung function, but experienced more dyspnea and more exacerbations.
- Our data suggest that the proportional weight of each of the components of the BODE index varied by sex.
- Women with COPD had better survival than men.

Journal Pre-proof

Declaration of interests

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

The authors declare the following financial interests/personal relationships which may be considered as potential competing interests:

Journal Pre-proof

Large-scale international validation of the ADO index in subjects with COPD: an individual subject data analysis of 10 cohorts

Milo A Puhan,^{1,2} Nadia N Hansel,³ Patricia Sobradillo,⁴ Paul Enright,⁵ Peter Lange,⁶ DeMarc Hickson,^{7,8} Ana M Menezes,⁹ Gerben ter Riet,¹⁰ Ulrike Held,² Antonia Domingo-Salvany,^{11,15} Zab Mosenifar,¹² Josep M Antó,^{11,13,14,15} Karel G M Moons,¹⁶ Alphons Kessels,¹⁷ Judith Garcia-Aymerich,^{11,13,14,15} for the International COPD Cohorts Collaboration Working Group

To cite: Puhan MA, Hansel NN, Sobradillo P, *et al*. Large-scale international validation of the ADO index in subjects with COPD: an individual subject data analysis of 10 cohorts. *BMJ Open* 2012;**2**:e002152. doi:10.1136/bmjopen-2012-002152

► Prepublication history and additional material for this paper are available online. To view these files please visit the journal online (<http://dx.doi.org/10.1136/bmjopen-2012-002152>).

Received 22 September 2012
Revised 6 November 2012
Accepted 12 November 2012

This final article is available for use under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial 2.0 Licence; see <http://bmjopen.bmj.com>

MAP and JGA contributed equally to this study.

For numbered affiliations see end of article.

Correspondence to
Dr Judith Garcia-Aymerich;
jgarcia@creal.cat

ABSTRACT

Background: Little evidence on the validity of simple and widely applicable tools to predict mortality in patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) exists.

Objective: To conduct a large international study to validate the ADO index that uses age, dyspnoea and FEV₁ to predict 3-year mortality and to update it in order to make prediction of mortality in COPD patients as generalisable as possible.

Design: Individual subject data analysis of 10 European and American cohorts (n=13 914).

Setting: Population-based, primary, secondary and tertiary care.

Patients: COPD GOLD stages I–IV.

Measurements: We validated the original ADO index. We then obtained an updated ADO index in half of our cohorts to improve its predictive accuracy, which in turn was validated comprehensively in the remaining cohorts using discrimination, calibration and decision curve analysis and a number of sensitivity analyses.

Results: 1350 (9.7%) of all subjects with COPD (60% male, mean age 61 years, mean FEV₁ 66% predicted) had died at 3 years. The original ADO index showed high discrimination but poor calibration (p<0.001 for difference between predicted and observed risk). The updated ADO index (scores from 0 to 14) preserved excellent discrimination (area under curve 0.81, 95% CI 0.80 to 0.82) but showed much improved calibration with predicted 3-year risks from 0.7% (95% CI 0.6% to 0.9%, score of 0) to 64.5% (61.2% to 67.7%, score of 14). The ADO index showed higher net benefit in subjects at low-to-moderate risk of 3-year mortality than FEV₁ alone.

Interpretation: The updated 15-point ADO index accurately predicts 3-year mortality across the COPD severity spectrum and can be used to inform patients about their prognosis, clinical trial study design or benefit harm assessment of medical interventions.

ARTICLE SUMMARY

Article focus

- We aimed to conduct a large international study to validate the ADO index that uses age, dyspnoea and FEV₁ to predict 3-year mortality and to update it in order to make prediction of mortality in chronic obstructive pulmonary disease (COPD) patients as generalisable as possible.

Key messages

- The updated 15-point ADO index accurately predicts 3-year mortality across the COPD severity spectrum (GOLD stage I–IV), settings (general population, primary care and specialised care) and geographical area.
- The updated ADO index can be used to inform patients, clinical trial study design and benefit harm assessment of medical interventions on a population level or individual level.
- In addition, the ADO index could serve as a reference standard for risk prediction against which the additional value of various biomarkers to predict mortality could be assessed.

Strengths and limitations of this study

- The study includes a large sample size from 10 European and American cohorts and covers the entire COPD severity spectrum, which increases external validity.
- The study uses information readily available in routine clinical practices.
- Focus on mortality and easily available predictors.

INTRODUCTION

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is among the leading causes of death worldwide.^{1 2} Although the substantial excess mortality associated with COPD is well

International validation of the ADO index in COPD

recognised from a public health standpoint, relatively little evidence is available on how to estimate the risk of mortality for an individual patient. Tools to accurately project the clinical course of the disease, including prediction of outcomes such as mortality, exacerbations or quality of life, would inform patients and their caregivers about prognosis and allow for a better understanding of the benefits and harms of possible treatments.³⁻⁶ Also, tools that incorporate prognostic information from easily available parameters could serve as reference against which the additional prognostic value of biomarkers could be assessed.

Current international COPD guidelines provide little guidance on how to assess a patient's prognosis.⁷⁻⁸ This is likely due, in large part, to the scarcity of evidence on how to accurately estimate prognosis in patients with COPD; however, this is in contrast to other chronic disease guidelines that have clear recommendations on the use of prognostic indices to inform patients and to guide treatment decisions.⁹⁻¹³ Prognostic indices for COPD have recently received increased attention, but have seen little application in clinical practice. This may be because indices, to date, have either required information not readily available in routine clinical practice,¹⁴ do not provide explicit outcome risks¹⁵⁻¹⁶ or have received minimal validation.¹⁵⁻¹⁷ A recently developed index, the ADO index, combines age, dyspnoea and airflow obstruction to predict the risk of mortality. It may have great potential for widespread application because of its simplicity. However, formal testing of its accuracy across a variety of COPD patient cohorts following standard methods has not yet been done.⁶⁻¹⁸⁻²¹ The original index was derived in a cohort of moderate-to-severe COPD patients from specialised care, therefore, it requires validation in larger and notably more diverse COPD populations. We conducted such large-scale international validation of the ADO index to determine how well it predicts mortality for individual subjects with COPD from diverse settings, and updated the index as needed.

METHODS

Cohorts and patients

Investigators from 10 COPD and population-based cohort studies in Europe and the Americas agreed to collaborate in the International COPD Cohorts Collaboration Working Group. These cohorts include the Barmelweid cohort (Switzerland, clinic based),¹⁷ the Basque study (Spain, clinic based),²² the Cardiovascular Health Study (CHS, USA, population based),²³ the Copenhagen City Heart Study (CCHS, Denmark, population based),²⁴ the Jackson Heart Study (JHS, USA, population based),²⁵ the Lung Health Study (LHS, USA, clinic based),²⁶ the cohort from which patients for the National Emphysema Treatment Trial were recruited (NETT, USA, clinic based),²⁷ the Phenotype and Course of COPD PAC-COPD Study (PAC-COPD, Spain, clinic

based),²⁸ the PLATINO study (Uruguay, population based),²⁹ and the Quality of Life of COPD Study Group (SEPOC, Spain, clinic based).³⁰ Details about the cohorts are provided in the online supplement (see online supplementary appendix 1). From this international pool of cohorts we selected participants with at least 40 years of age and with COPD defined by spirometry as a post-bronchodilator (BD) $FEV_1/FVC \leq 0.7$, except for the CHS and CCHS cohorts where post-BD was not available and pre-BD values were used. Thus, our large pool of cohorts represents a heterogeneous group of subjects, combining (1) COPD patients from clinical cohorts and (2) subjects with evidence of airway limitation from the population-based cohorts, but without a confirmed diagnosis of COPD. Ethics Board approval was obtained in all cohorts.

Mortality and candidate predictors of mortality

All-cause mortality at 3 years was defined as the outcome. It was obtained from personal follow-up of patients or relatives, national registries, or hospital records, yielding no missing information with respect to mortality. We considered potential predictors of mortality which are easy to obtain across diverse medical settings. These variables included age, sex, smoking status, prebronchodilator or postbronchodilator FEV_1 as available, dyspnoea score (Medical Research Council Dyspnea scale), respiratory signs and symptoms (cough, sputum and wheezing), body mass index (BMI), asthma and cardiovascular disease (CVD, which included ischaemic heart disease, stroke, congestive heart failure or peripheral vascular disease). As in previous analyses,¹⁷ we explicitly excluded potential predictors of mortality which are more burdensome to measure such as exercise capacity (eg, 6 min walked distance) or arterial blood gases, since these are unlikely to be available consistently in clinical practice outside academic centres. Missing values were imputed using 10-fold multiple imputation for each cohort, using the remaining variables as predictors.³¹⁻³² Methods used for collecting and harmonising data, and for handling missing data are detailed in the appendix (see online supplementary appendices 2-4).

Statistical analysis

A detailed version of statistical analysis including sample size assessment is available in the appendix (see online supplementary appendix 5).

We first validated the original ADO index¹⁷ through the assessment of its discrimination (area under curve) and calibration (comparison of predicted vs observed risk) properties in all subjects except for those included in the original derivation cohort (ie, the Barmelweid study).

In order to make the risk estimation tool as generalisable to different international populations as possible, we then updated the ADO index following standardised procedures that first included an updating or adjustment

of the intercept only followed by, if necessary, more extensive updates including model revision (refitting the predictor-outcome associations) and model extension (adding new predictors).^{21–32} Model refitting of the ADO index was performed using all subjects from the CCHS, LHS, NETT, PLATINO and PAC-COPD cohorts (update cohort, n=10 221), applying logistic regression with death as the outcome variable and age, dyspnoea and FEV₁ as predictors. Then the validation (discrimination and calibration) of the final updated ADO index was done with the subjects from the Barmelweid study, CHS, Basque Study, JHS and SEPOC cohorts (validation cohort, n=3693). Thus, both update and validation sets included a large number of subjects with COPD or airflow limitation, diverse in terms of disease severity (GOLD I–IV) and settings (general population, primary care and specialised care). We translated the final model into a simple-to-use 15-point scale.³³

To further quantify the accuracy of the updated ADO index, we performed a decision curve analysis that compares the net benefit of different approaches. Net benefit is defined as the difference between the proportion of subjects that are correctly identified to be at or above a certain risk threshold (eg, 5% risk) and the proportion of subjects incorrectly identified to be at or above that threshold. We focused on subjects with COPD at low-to-moderate risk for 3-year mortality (<20%) where most uncertainty about the balance between benefits and harms of treatments may exist so that risk thresholds may be specifically useful.^{34–35}

Finally, we explored whether adding new predictors (eg, CVD, BMI and sex) improved the updated (refitted) models' discrimination and calibration and we conducted three sensitivity analyses that tested how susceptible our results were to analytical approaches taken. All analyses were repeated: (1) using multilevel (rather than conventional) logistic regression analysis; (2) excluding subjects with mild COPD (GOLD stage I) and (3) excluding subjects with a physician diagnosis of asthma from cohorts where only prebronchodilator spirometry was available. We also considered restricting the analyses to subjects with an FEV₁/FVC ratio below their lower limit of normal level according to local prediction equations, but the number of subjects not fulfilling this criterion was very low (<1%).

We conducted all analyses using Stata for Windows (V.11.1, College Station, Texas, USA) and R, V.2.12 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2011).

RESULTS

In total, 13 914 subjects with COPD (60% men) were included in the analysis (table 1). On average, subjects were approximately 61 years old, with moderate airflow limitation and mild dyspnoea; however, there was a wide range of disease severity within and across cohorts. The majority of subjects were former or current smokers

(89%) and 22% had concomitant CVD. After 3 years 1350 (9.7%) subjects had died.

The original ADO index showed high discrimination (see online supplementary appendix 6) but poor calibration with a substantial mismatch between predicted and observed risks across the entire risk spectrum. Updating the intercept only did not substantially improve this miscalibration. Therefore, we decided to update the original ADO index.

In the update cohort, the updated ADO model showed very good agreement between predicted and observed 3-year mortality risk across 10 equally sized groups of subjects with increasing predicted risk (figure 1: mean predicted risk 9.1%). More importantly, in the validation cohort, the updated index still had good prediction across all risk categories, in particular in subjects at mortality risks below 20%. There was only a slight overprediction among subjects at very high risk. This validation did not indicate a need for further adjustment of the intercept or regression coefficients of the updated ADO model, which indicated good generalisability across countries and settings. Discrimination was, as expected, somewhat lower in the validation cohort but still 0.73 (95% CI 0.70% to 0.76%). Further extensions of the updated ADO index by adding CVD, BMI and sex did not substantially improve the model's discrimination or calibration, even though all three predictors were significantly associated with mortality in the multivariate model (all p values <0.05). The area under the curve remained 0.85 in the update cohort and 0.74 in the validation cohort, and the calibration also remained good (see online supplementary appendix 7).

Tables 2 and 3 show the updated ADO index where the strength of association of age, dyspnoea and FEV₁ with 3-year mortality is reflected in the regression coefficients and the corresponding integer point score. The 3-year risks of mortality associated with ADO scores are shown in table 4 and range from 0.7% (95% CI 0.6% to 0.9%) with a score of zero to 64.5% (95% CI 61.2% to 67.7%) at a point score of 14. The area under the curve of the updated ADO index is 0.81 (95% CI 0.80% to 0.82%).

Figure 2A shows that, from 1% to 20% risk of 3-year mortality, using the updated ADO index (regression equation) is consistently more accurate to classify patients correctly above or below certain risk thresholds than using either of the three predictors alone. Figure 2B shows the consequences of more accurate risk classification. For example at a risk threshold of 5%, using the ADO index would result in a reduction of the number of patients classified incorrectly to be above 5% by 33/100 subjects compared with considering all patients to be above 5% (ie, without using any predictors), and compared with using only FEV₁ (18 per 100 subjects), age (24 per 100 subjects) or dyspnoea (10 per 100 subjects). At higher risk thresholds, the updated ADO index and FEV₁ perform similarly.

Discrimination, calibration and the analysis of accuracy for risk thresholds remained essentially

Papel del Inflamasoma en la EPOC estable y agudizada

4

Pillay MA, Hansel NN, Sabatello P, et al. *BMJ Open* 2012;4(02):152. doi:10.1136/bmjopen-2012-002152

Table 1 Description of sociodemographic and clinical characteristics of 13 914 subjects with COPD from the cohorts

	Total n=13914	Barmelweid cohort	Basque study	Cardio-vascular Health Study	Copenhagen City Heart Study	Jackson Heart Study	Lung Health Study	National Emphysema Treatment Trial	PAC-COPD Study	PLATINO study	SEPOC study
		Switzerland, Europe n=231	Spain, Europe n=106	USA, North America n=2619	Denmark, Europe n=2287	USA, North America n=419	USA, North America n=5167	USA, North America n=2252	Spain, Europe n=342	Uruguay, South America n=173	Spain, Europe n=318
Age (years), mean (SD)	60.8 (11.6)	72.4 (8.8)	70.5 (8.9)	73.6 (5.9)	60.7 (9.4)	62.4 (11.0)	50.1 (5.7)	66.7 (6.3)	67.9 (8.6)	67.2 (11.3)	65.2 (9.2)
Sex: male, n (%)	8324 (60)	138 (60)	104 (98)	1341 (51)	1235 (54)	184 (44)	3223 (62)	1366 (61)	318 (93)	97 (56)	318 (100)
Working status: active, n (%)	5297 (38)	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	413 (99)	4538 (88)	178 (8)	61 (18)	63 (36)	51 (16)
Smoking											
Never, n (%)	1452 (11)	9 (5)	0 (0)	930 (36)	215 (9)	215 (52)	0 (0)	12 (1)	2 (1)	57 (33)	12 (5)
Former, n (%)	4751 (34)	138 (73)	82 (77)	1245 (48)	443 (19)	102 (25)	73 (1)	2240 (100)	220 (67)	60 (35)	148 (58)
Current, n (%)	7590 (55)	41 (22)	24 (23)	444 (17)	1626 (71)	99 (24)	5094 (99)	0 (0)	109 (33)	56 (32)	97 (38)
Body mass index(kg/m ²), mean(SD)	25.7 (4.5)	25.9 (6.1)	26.1 (4.9)	26.2 (4.8)	25.0 (4.2)	29.6 (7.5)	25.6 (3.9)	24.9 (4.2)	28.2 (4.7)	27.4 (5.3)	26.4 (4.2)
Dyspnoea (MRC, 0–4), mean (SD)	1.1 (1.3)	2.2 (1.2)	2.0 (0.6)	0.8 (1.1)	1.1 (1.3)	0.2 (0.6)	0.6 (0.8)	2.7 (1.0)	2.2 (1.0)	0.6 (0.6)	2.1 (1.5)
Cough, n (%)	4009 (59)	n.a.	n.a.	444 (17)	n.a.	108 (26)	3259 (100)	n.a.	138 (41)	60 (35)	n.a.
Sputum, n (%)	4289 (52)	n.a.	n.a.	656 (25)	908 (40)	107 (26)	2400 (100)	n.a.	172 (51)	46 (27)	n.a.
Wheeze, n (%)	4352 (53)	n.a.	n.a.	187 (9)	n.a.	73 (18)	3897 (75)	n.a.	125 (37)	70 (40)	n.a.
FEV ₁ (% pred), mean (SD)*	65.9 (24.8)	45.1 (16.1)	46.9 (11.4)	77.3 (22.4)	70.5 (23.7)	71.2 (20.5)	77.8 (9.1)	27.5 (8.9)	52.4 (16.2)	84.3 (18.1)	45.0 (18.3)
Inhaler steroid use, n (%)	1833 (33)	-	103 (100)	55 (2)	n.a.	n.a.	n.a.	1376 (61)	266 (79)	33 (19)	n.a.
6-min walk distance, mean (SD)	357.8 (111.7)	363.1 (127.0)	442.9 (95.4)	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	340.6 (106.3)	435.5 (90.6)	n.a.	n.a.
Asthma, † n (%)	920 (8)	0 (0)	0 (0)	148 (6)	246 (11)	74 (18)	373 (7)	n.a.	30 (9)	49 (28)	0 (0)
Diabetes, † n (%)	262 (7)	41 (18)	n.a.	n.a.	60 (3)	71 (19)	n.a.	n.a.	65 (19)	7 (4)	18 (6)

Continued

International validation of the ADO Index in COPD

BMJ Open: first published as 10.1136/bmjopen-2012-002152 on 12 December 2012. Downloaded from <http://bmjopen.bmj.com/> on November 21, 2021 by guest. Protected by copyright.

International validation of the ADO index in COPD

Table 1 Continued

	Barmelweid cohort	Basque study	Cardio-vascular Health Study	Copenhagen City Heart Study	Jackson Heart Study	Lung Health Study	National Emphysema Treatment Trial	PAC-COPD Study	PLATINO study	SEPOC study
	Switzerland, Europe n=231	Spain, Europe n=106	USA, North America n=2619	Denmark, Europe n=2287	USA, North America n=419	USA, North America n=5167	USA, North America n=2252	Spain, Europe n=342	Uruguay, South America n=173	Spain, Europe n=318
Total n	13914	2619	2619	2287	419	5167	2252	342	173	318
Cardiovascular disease, ^{††} n (%)	165 (71)	25 (29)	747 (29)	813 (34)	79 (19)	278 (5)	704 (31)	85 (25)	37 (21)	74 (23)
Death during 3-year follow-up, n (%)	79 (34)	16 (15)	232 (9)	186 (8)	29 (7)	58 (1)	632 (28)	41 (12)	16 (9)	61 (19)

*Prebronchodilator FEV₁ used where postbronchodilator FEV₁ not available (Cardiovascular Health Study and Copenhagen City Heart Study).
[†]Comorbidities are self-reported, self-report of a doctor diagnosis, or doctor diagnosed (according to medical chart and physical examination) depending on the cohort.
[‡]Cardiovascular disease is defined as at least one of the following: ischaemic heart disease, stroke, congestive heart failure or peripheral vascular disease.
[§]COPD, chronic obstructive pulmonary disease.

unchanged in all sensitivity analyses (see online supplementary appendix 8).

DISCUSSION

Our study showed that the updated ADO index, ranging from 0 to 14, accurately predicts 3-year mortality in subjects with COPD. We found that adding CVD, BMI or sex does not significantly improve prediction of mortality when added to age, dyspnoea and FEV₁. Importantly, these results were consistent in sensitivity analyses and across very diverse COPD populations. Based on these results, the updated ADO index has the potential to provide COPD patients with accurate prognostic information on mortality.

The interest in prognostic assessment of COPD has resulted in several prognostic tools.^{15–17} The latter had, however, little impact on clinical guidelines or practice so far. The current study overcomes potentially important barriers to the use of previously published prognostic tools by providing an extensive, international validation of a simple tool. The first step of our analysis, the large-scale validation of the original ADO index, showed that mortality could not be predicted accurately but that the combination of age, dyspnoea and FEV₁ is highly discriminative. Therefore, a more extensive update than just an adjustment for different underlying risks was necessary and we updated the entire regression model in our very diverse update cohort that represented the entire disease spectrum. The resulting updated ADO index showed excellent calibration and discrimination in both the update and validation cohorts. An additional adjustment was not deemed necessary for the validation cohort, which may be due to the great diversity of the update and validation cohorts in terms of disease severity, clinical setting and geographical area. Our results confirm that CVD and low BMI are important comorbidities in COPD patients and are significantly associated with mortality; however, they did not provide additional accuracy in risk prediction when added to age, dyspnoea and FEV₁, as shown by the fact that the performance of the ADO index was not improved by adding CVD, sex and BMI to the statistical model.

Informing patients about their prognosis is a core task of clinicians. Patients with chronic disease are particularly interested in the potential course of their disease in order to better understand what a diagnosis such as COPD implies for them. Important outcomes that characterise prognosis are exacerbations, quality of life and mortality.³⁶ With the ADO index, we now provide a simple tool that clinicians from any setting can use to estimate the risk of mortality. We propose that such multivariable tools can also be used to balance the benefits and harms of possible treatments since the benefit harm balance depends heavily on the patients' prognosis.^{4 37} Thus, estimation of prognosis is of key importance for patients but also for policy makers, regulatory agencies and clinical guideline developers. Our data suggest that

International validation of the ADO index in COPD

Figure 1 Update and validation of the ADO index in 13 914 subjects with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). The upper part of the figure shows the predictive performance of the updated ADO index in 10 221 subjects with COPD from the Copenhagen City Heart Study, Lung Health Study, National Emphysema Treatment Trial, PLATINO and the Phenotype and Course of COPD Study. The calibration plot shows the predicted and observed risks for 10 equally sized group with increasing risk of 3-year mortality. The discrimination plot shows the area under the curve. The lower part of the figure shows the predictive performance of the updated ADO index in the validation cohort with 3693 subjects from the Cardiovascular Health Study, Basque COPD study, Jackson Heart Study, Barmelweid Study and the Quality of Life of Chronic Obstructive Pulmonary Disease Study (SEPOC).

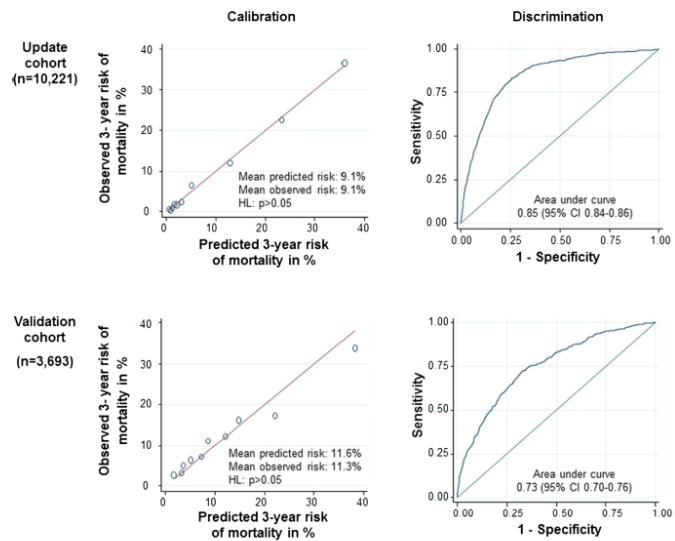


Table 2 Regression coefficients and development of updated ADO index

Variable	Regression coefficients β_s per unit increase (SE)	Categories	Reference values W_{ij} (mid point)	β_s^* ($W_{ij} - W_{1reference}$)	Risk score= β_s^* ($W_{ij} - W_{1reference}$)/B†
FEV ₁ (% predicted)	-0.0288 (SE 0.0023, p<0.0001)	≥81	87.0 ($W_{2reference}$)		0
		≥65–80	72.5	0.418	1
		≥50–64	57.0	0.864	2
		≥36–49	42.5	1.282	3
		≤35	25.0	1.786	4
Dyspnoea (mMRC, 0–4)	0.2585 (SE 0.0406, p<0.0001)	0	0 ($W_{3reference}$)		0
		1	1	0.259	1
		2	2	0.517	1
		3	3	0.776	2
		4	4	1.034	3
Age (years)	0.0703 (SE 0.0048, p<0.0001)	40–49	44.5 ($W_{4reference}$)		0
		50–59	54.5	0.703	2
		60–69	64.5	1.406	4
		70–79	74.5	2.109	5
		≥80	84.5	2.812	7

†1 Point is assigned per 15% in FEV₁=coefficient of 0.40. Points rounded to the next integer. Constant of regression equation=-5.640. mMRC, Medical Research Council.

International validation of the ADO index in COPD

Table 3 Assignment of points for the updated ADO index, compared with the original ADO index

Assignment of points	0	1	2	3	4	5	7
Updated ADO index							
FEV ₁ (% predicted)	≥81	65–80	51–64	36–50	≤35		
Dyspnoea (mMRC, 0–4)	0	1–2	3	4			
Age (in years)	40–49		50–59		60–69	70–79	≥80
Original ADO index							
FEV ₁ (% predicted)	≥65	36–64	≤35				
Dyspnoea (mMRC, 0–4)	0–1	2	3	4			
Age (years)	40–49	50–59	60–69	70–79	80–89	≥90	

the ADO index classifies patients more correctly above or below certain risk thresholds than only FEV₁, and this gain is especially relevant in subjects with very low and low risk of 3-year mortality where the benefit harm balance may be unfavourable.^{3–4} Although most COPD treatments are not prescribed to modify mortality risk, but to reduce exacerbations, and improve symptoms and quality of life, similar estimates for the benefit harm balance could be made for patients at low risk for exacerbations. Therefore, in the future, the ADO index should be complemented by other widely validated risk tools that make accurate projections about the risk for important outcomes in COPD, including exacerbations or worsening quality of life, in order to balance the benefits and harms of possible treatments.

In addition, accurate prediction of mortality by the ADO index can be used in clinical trials to base sample size calculations on realistic estimates of expected event rates, to target treatments to specific risk groups, for pre-stratification or to adjust for potential baseline imbalances. Also, the ADO index could be useful for the evaluation of biomarkers. Currently, major studies are being carried out to identify biomarkers that might help

to improve outcome prediction and response to treatments. The use of such biomarkers in clinical practice seems justified if they add significantly to the prediction based on easily available information. The ADO index is a simple tool that could serve as reference against which the additional value of biomarkers to predict mortality could be assessed. Therefore, the ADO index is likely to be useful for both medical practice and research.

A limitation to the current study is the use of mortality as the only assessed outcome, since COPD morbidity includes other relevant outcomes such as exacerbations, hospital admissions, or quality-of-life. Thus, our study should be considered a simplification of the clinical setting but it may pave the way for similar research evaluating risk prediction of additional outcomes. Once risk tools for various important outcomes and improved evidence about benefit and harm of treatments to modify these risks are available, informed decisions for providing the most appropriate care can be better supported. Our study was confined to a limited number of readily available predictors; therefore, variables with potential relevance to mortality risk such as exacerbation frequency or measures of exercise capacity were not included. This may also be perceived as strength of our study because it uses information readily available in routine clinical practices, including primary care settings, where most COPD patients are treated. Additional strengths of our study include the already mentioned large sample size and diversity of the populations. This increases external validity, which in this context means that recalibrations in populations different from those included in our analyses do not seem necessary. Lastly, by using decision curve analysis we looked beyond standard metrics for the performance of risk tools (discrimination and calibration) by providing an interpretation of the risk model that refers to different risk thresholds that may be used to inform treatment decisions.

In conclusion, the updated 15-point ADO index is a simple tool that can be used in diverse settings to inform patients and their caregivers about prognosis. Using risk tools in clinical COPD research may also help to design clinical trials and to inform policy makers, regulatory agencies or guideline developers when estimating the benefit harm balance and to serve as a reference standard for risk prediction against which the

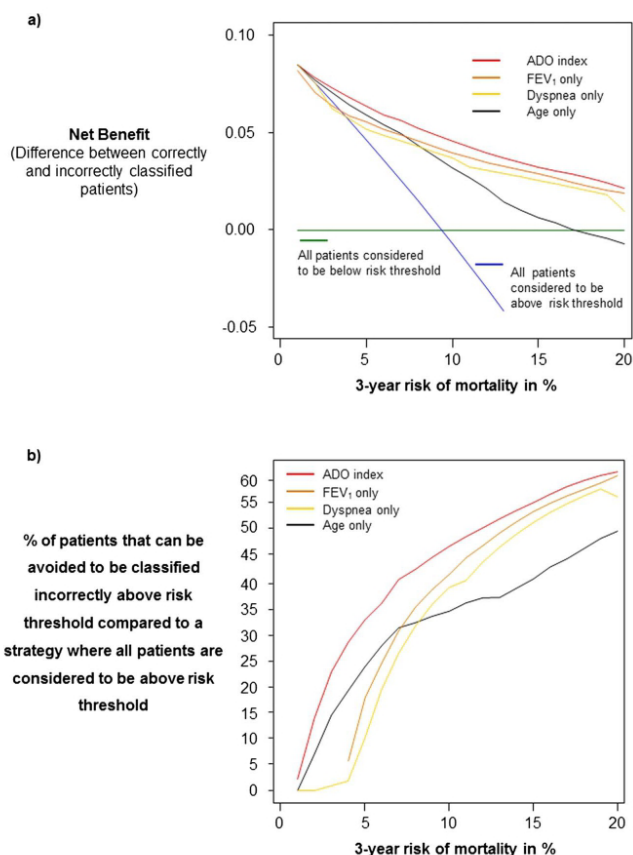
Table 4 The ADO index—prediction of 3-year mortality in chronic obstructive pulmonary disease subjects

Three-year risk of mortality per ADO score in % (95% CI)	
0	0.7 (0.6 to 0.9)
1	1.0 (0.9 to 1.2)
2	1.6 (1.3 to 1.8)
3	2.3 (2.0 to 2.6)
4	3.4 (3.0 to 3.7)
5	4.9 (4.5 to 5.4)
6	7.2 (6.7 to 7.7)
7	10.3 (9.7 to 10.9)
8	14.5 (13.8 to 15.3)
9	20.1 (19.1 to 21.1)
10	27.2 (25.8 to 28.6)
11	35.7 (33.7 to 37.7)
12	45.1 (42.6 to 47.7)
13	55.0 (52.0 to 58.0)
14	64.5 (61.2 to 67.7)

OR per 1 point increase in ADO index: 1.48 (95% CI 1.45 to 1.52).
Area under the curve: 0.81 (95% CI 0.80 to 0.82).

International validation of the ADO index in COPD

Figure 2 Accuracy of four strategies to classify subjects into risk categories. The upper part (A) of the figure shows the net benefit of six strategies to classify subjects with chronic obstructive pulmonary disease. The higher the values for net benefit the more patients are correctly classified. Two strategies do not use any predictors but assume that all patients would be above or below a risk threshold. The four other strategies use the ADO index, age, dyspnoea or FEV₁ and associated risks of 3-year mortality to classify patients. Net benefit is defined as the difference between the proportion of correctly classified subjects and the proportion of subjects classified incorrectly to be at or above a risk threshold (eg, 5% risk). The line for considering all patients to be above a risk threshold crosses that line for considering all patients to be below a risk threshold at the death rate observed (9.7%). The lower part of the graph (B) shows that, for example at a threshold of 5% mortality risk, using the ADO index would result in a net benefit similar to the reduction of 33 incorrectly classified patients per 100 subjects compared to considering all patients to be above a 5% mortality risk. Using age, dyspnoea or FEV₁ only would reduce it by only 24, 10 and 18 per 100 subjects, respectively. The graph is restricted to subjects at low to moderate risk for 3-year mortality (<20%) where most uncertainty about the balance between benefits and harms from treatment may exist.



additional value of various biomarkers to predict mortality could be assessed.

Author affiliations

- ¹Department of Epidemiology, Johns Hopkins Bloomberg School of Public Health, Baltimore, Maryland, USA
- ²Horten Centre, University of Zurich, Zurich, Switzerland
- ³Division of Pulmonary & Critical Care Medicine, Johns Hopkins School of Medicine, Baltimore, Maryland, USA
- ⁴CIBER Enfermedades Respiratorias (CIBERES), Fundación Caubet-Cimera, Mallorca, Spain
- ⁵College of Public Health, The University of Arizona, Tucson, Arizona, USA
- ⁶Pulmonary Division, Hvidovre Hospital, Hvidovre, Denmark

- ⁷Jackson Heart Study, Coordinating Center, Jackson State University, Jackson, Mississippi, USA
- ⁸Department of Medicine, University of Mississippi Medical Center, Jackson, Mississippi, USA
- ⁹Federal University of Pelotas, Pelotas, Brazil
- ¹⁰Department of General Practice, Academic Medical Centre, University of Amsterdam, Amsterdam, The Netherlands
- ¹¹Hospital del Mar Research Institute (IMIM), Barcelona, Spain
- ¹²Cedars Sinai Medical Center, David Geffen School of Medicine at UCLA, Los Angeles, California, USA
- ¹³Center for Research in Environmental Epidemiology (CREAL), Barcelona, Spain
- ¹⁴Universitat Pompeu Fabra, Barcelona, Spain
- ¹⁵CIBER de Epidemiologia y Salud Pública (CIBERESP), Barcelona, Spain

International validation of the ADO index in COPD

¹⁶Department of Epidemiology, Julius Centre for Health Sciences and General Practice, University Medical Center, Utrecht, The Netherlands

¹⁷Clinical Epidemiology, and Medical Technology Assessment, University Hospital Maastricht, Maastricht, The Netherlands

Collaborators Cohorts and investigators of the International COPD Cohorts Collaboration Working Group: Barmelweid cohort (Switzerland)—Martin Frey, MD, Klinik Barmelweid, Switzerland; Ulrike Held, PhD, Horten Centre, University of Zurich, Switzerland; Milo A. Puhan, MD, PhD, Johns Hopkins Bloomberg School of Public Health, Baltimore, USA and Horten Centre, University of Zurich, Switzerland. Basque study (Spain)—Milagros Iriberrri Pascual, MD, Cruces Hospital, Baracaldo, Basque Country, Spain; Patricia Sobradillo, MD, CIBER Enfermedades Respiratorias (CIBERES), Fundación Caubet-Cimera, Mallorca, Spain. Cardiovascular Health Study (USA)—R. Graham Barr, MD, Department of Medicine, College of Physicians and Surgeons, Columbia University, New York, USA; Paul Enright, MD, College of Public Health, The University of Arizona, Tucson, Arizona, USA; Jerry Krishnan, MD, Department of Medicine, Section of Pulmonary and Critical Care, University of Chicago, Chicago, USA; Tony Wilson, Department of Biostatistics, University of Washington, Seattle, USA; Sachin Yende, MD, Department of Critical Care Medicine, University of Pittsburgh, Pittsburgh, Pennsylvania, USA. Copenhagen City Heart City study (Denmark)—Peter Lange, MD, Pulmonary Division, Hvidovre Hospital, Hvidovre, Denmark. Jackson Heart Study (USA)—DeMarc Hickson, PhD, MPH, Jackson State University, Jackson Heart Study, Coordinating Center, USA. Department of Medicine, University of Mississippi Medical Center, USA; Wendy White, PhD, MPH, Tougaloo College, Jackson Heart Study, USA. Lung Health Study (USA)—Nadia Hansel, MD, MPH, and Robert A. Wise, MD, Division of Pulmonary & Critical Care Medicine, Johns Hopkins School of Medicine, Baltimore, USA. National Emphysema Treatment Trial (USA)—Fernando Martínez, MD, Division of Pulmonary and Critical Care Medicine, University of Michigan Health System, Ann Arbor, USA; Zab Mosenifar, MD, Cedars Sinai Medical Center, David Geffen School of Medicine at UCLA, Los Angeles, USA; Andrew Ries, MD, Department of Medicine, University of California, San Diego, USA; James K. Stoller, MD, MS, Respiratory Institute, Department of Pulmonary and Critical Care Medicine, Cleveland Clinic Foundation, Cleveland, USA; Robert A. Wise, MD, see above. PAC-COPD (Spain)—Alvar Agustí, MD, Federico P Gómez, MD, and Roberto Rodríguez-Roisin, MD, Department of Pneumology, Thorax Institute, Hospital Clinic, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer, Barcelona, and CIBER Enfermedades Respiratorias (CIBERES), Spain; Josep M Antó, MD, PhD, and Judith Garcia-Aymerich, MD, PhD, (1) Center for Research in Environmental Epidemiology (CREAL), Barcelona, Spain, (2) Hospital del Mar Research Institute (IMIM), Barcelona, Spain, (3) Universitat Pompeu Fabra, Barcelona, Spain, (4) CIBER de Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Spain. PLATINO study team (Brazil, Uruguay)—Ana MB Menezes, MD, PhD, Federal University of Pelotas, Pelotas, Brazil; Maria Victorina Lopez, MD, and Adriana Muiño, MD, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. SEPOC study (Spain)—Josep M Antó, MD, PhD, see above; Antonia Domingo-Salvany, MD, PhD, Hospital del Mar Research Institute (IMIM), Barcelona, Spain; Judith Garcia-Aymerich, MD, PhD, see above; Methodological and Statistical team; Judith Garcia-Aymerich, MD, PhD, see above; Nadia Hansel, MD, MPH, see above; Ulrike Held, PhD, see above; Alphons Kessels, MD, Clinical Epidemiology, and Medical Technology Assessment, University Hospital Maastricht, Maastricht, The Netherlands; Karel GM Moons, PhD, Julius Centre for Health Sciences and General Practice, University Medical Center, Utrecht, The Netherlands; Milo A. Puhan, MD, PhD, see above; Gerben ter Riet, Department of General Practice, Academic Medical Centre, University of Amsterdam, The Netherlands; Ignasi Serra, Center for Research in Environmental Epidemiology, Barcelona, Spain.

Contributors MP, NH and JGA conceived the study idea, contributed to the statistical analysis and drafted the first version of the manuscript. MF, UH and MP oversaw all activities related to the conduct of the Barmelweid cohort (Switzerland). MIP and PS oversaw all activities related to the conduct of the Basque study (Spain). RGB, PE, JK and TW oversaw all activities related to the conduct of the Cardiovascular Health Study (USA). PL oversaw all activities related to the conduct of the Copenhagen City Heart City study (Denmark). DMH and WW oversaw all activities related to the conduct of the Jackson Heart Study (USA). NH and RW oversaw all activities related to the

conduct of the Lung Health Study (USA). FM, ZM, AR and RW oversaw all activities related to the conduct of the National Emphysema Treatment Trial (USA). AA, FPG, RRR, JMA and JGA oversaw all activities related to the conduct of the PAC-COPD (Spain). AMM, MVL and AM oversaw all activities related to the conduct of the PLATINO study team (Brazil, Uruguay). JMA, ADS and JGA oversaw all activities related to the conduct of the SEPOC study (Spain). UH, AK, KGM, GtR and IS contributed to the statistical analysis. All authors revised the manuscript and accepted the final version.

Funding The Barmelweid cohort (Switzerland) was funded by the Swiss National Science Foundation (grant number 3233BO-115216) and by the Klinik Barmelweid. Basque study (Spain): No external funding. The Cardiovascular Health Study is supported by NHLBI Grant/Contract numbers N01-HC-85239, N01-HC-85079 through N01-HC-85086; N01-HC-35129, N01-HC-15103, N01-HC-55222, N01-HC-75150, N01-HC-45133; HL080295, HL-075366; NIA Grant/Contract numbers AG-023269, AG-15928, AG-20098, and AG-027058; University of Pittsburgh Claude D. Pepper Older Americans Independence Center grant number P30-AG-024827; with additional contribution from NINDS. See also <http://www.chs-nhlbi.org/pi.htm> The Copenhagen City Heart City study (Denmark) was supported by grants from The Danish Heart Foundation, The Danish Lung Association and Danish Medical Research Council. The Jackson Heart Study (JHS) is a collaborative study supported by the National Institutes of Health and the National Center on Minority Health and Health Disparities (study ID numbers: 5001; N01-HC95170; N01-HC95171; N01-HC95172) in partnership with Jackson State University, Tougaloo College, and University of Mississippi Medical Center. The Lung Health Study (USA) was supported by contract NIH/N01-HR-46002 from the National Heart, Lung and Blood Institute (NHLBI). The National Emphysema Treatment Trial (USA) is funded by the National Heart, Lung and Blood Institute, the Centers for Medicare and Medicaid Services, and the Agency for Healthcare Research and Quality. The PAC-COPD Study is funded by grants from Fondo de Investigación Sanitaria (FIS PI020541), Ministry of Health, Spain; Agència d'Avaluació de Tecnologia i Recerca Mèdiques (AATRM 035/20/02), Catalonia Government; Spanish Society of Pneumology and Thoracic Surgery (SEPAR 2002/137); Catalan Foundation of Pneumology (FUCAP 2003 Beca Marià Ravà); Red RESPIRA (RTIC C03/11); Red RCESP (RTIC C03/09), Fondo de Investigación Sanitaria (PI052486); Fondo de Investigación Sanitaria (PI052302); Fundació La Marató de TV3 (num. 041110); DURSI (2005SGR00392); and an unrestricted educational grant from Novartis Farmacèutica, Spain. CIBERESP and CIBERES are funded by the Instituto de Salud Carlos III, Ministry of Health, Spain. PLATINO study was funded by ALAT (Asociación Latino Americana del Tórax); Boehringer Ingelheim GmbH (BI), and GlaxoSmithKline (GSK). The SEPOC study (Spain) was supported by grants from Fondo de Investigación Sanitaria 99/0690 and CIRIT 1999SGR00240. Judith Garcia-Aymerich has a researcher contract from the Instituto de Salud Carlos III (CP05/00118), Ministry of Health, Spain. Karel G.M. Moons receives funding from the Netherlands Organisation for Scientific Research (project 9120.8004 and 918.10.615).

Competing interests None.

Ethics approval Ethics Committees of each participating hospital/research institute.

Provenance and peer review Not commissioned; externally peer reviewed.

Data sharing statement No additional data are available.

REFERENCES

1. Lopez AD, Shibuya K, Rao C, *et al*. Chronic obstructive pulmonary disease: current burden and future projections. *Eur Respir J* 2006;27:397–412.
2. Mathers CD, Loncar D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Med* 2006;3:e442.
3. Guo JJ, Pandey S, Doyle J, *et al*. A review of quantitative risk-benefit methodologies for assessing drug safety and efficacy—report of the ISPOR risk-benefit management working group. *Value Health* 2010;13:657–66.
4. Kent DM, Hayward RA. Limitations of applying summary results of clinical trials to individual patients: the need for risk stratification. *JAMA* 2007;298:1209–12.

International validation of the ADO index in COPD

5. Politi MC, Han PK, Col NF. Communicating the uncertainty of harms and benefits of medical interventions. *Med Decis Making* 2007;27:681–95.
6. Moons KG, Royston P, Vergouwe Y, et al. Prognosis and prognostic research: what, why, and how? *BMJ* 2009;338:b375.
7. Global Strategy for Diagnosis, Management, and Prevention of COPD. 2010. <http://www.goldcopd.com/GuidelinesResources.asp?I1=2&I2=0> (accessed 10 Sept 2012).
8. Celli BR, MacNee W. Standards for the diagnosis and treatment of patients with COPD: a summary of the ATS/ERS position paper. *Eur Respir J* 2004;23:932–46.
9. National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation* 2002;106:3143–421.
10. American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes. *Diabetes Care* 2011;34(Suppl 1):S11–61.
11. National Collaborating Centre for Cancer. NICE clinical guideline 58: Prostate cancer: diagnosis and treatment. National Institute for Health and Clinical Excellence. 2008. <http://www.nice.org.uk/cg58> (accessed 10 Sept 2012).
12. National Collaborating Centre for Cancer. NICE clinical guideline 80: Early and locally advanced breast cancer: diagnosis and treatment. National Institute for Health and Clinical Excellence. 2009. <http://www.nice.org.uk/cg80> (accessed 10 Sept 2012).
13. US Preventive Services Task Force. Aspirin for the prevention of cardiovascular disease: U.S. Preventive Services Task Force recommendation statement. *Ann Intern Med* 2009;150:396–404.
14. Puhan MA, Zoller M, ter Riet G. COPD: more than respiratory. *Lancet* 2008;371:27–8.
15. Jones RC, Donaldson GC, Chavannes NH, et al. Derivation and validation of a composite index of severity in chronic obstructive pulmonary disease: the DOSE Index. *Am J Respir Crit Care Med* 2009;180:1189–95.
16. Celli BR, Cote CG, Marin JM, et al. The body-mass index, airflow obstruction, dyspnea, and exercise capacity index in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2004;350:1005–12.
17. Puhan MA, Garcia-Aymerich J, Frey M, et al. Expansion of the prognostic assessment of patients with chronic obstructive pulmonary disease: the updated BODE index and the ADO index. *Lancet* 2009;374:704–11.
18. Altman DG, Royston P. What do we mean by validating a prognostic model? *Stat Med* 2000;19:453–73.
19. Altman DG, Vergouwe Y, Royston P, et al. Prognosis and prognostic research: validating a prognostic model. *BMJ* 2009;338:b605.
20. Steyerberg EW, Bleeker SE, Moll HA, et al. Internal and external validation of predictive models: a simulation study of bias and precision in small samples. *J Clin Epidemiol* 2003;56:441–7.
21. Janssen KJ, Moons KG, Kalkman CJ, et al. Updating methods improved the performance of a clinical prediction model in new patients. *J Clin Epidemiol* 2008;61:76–86.
22. Sobradillo P, Iriberrri M, Gomez B, et al. Validation of bode index as a predictor of mortality in COPD patients. 18th Annual Congress of the European Respiratory Society. Berlin: European Respiratory Society, 2008:P531.
23. Fried LP, Borhani NO, Enright P, et al. The Cardiovascular Health Study: design and rationale. *Ann Epidemiol* 1991;1:263–76.
24. Appleyard M, Hansen A, Schnohr P. The Copenhagen City Heart Study: a book of tables with data from the first examination (1976–78) and a five years follow-up (1981–1983). *Scand J Soc Med* 1989;170:1–160.
25. Carpenter MA, Crow R, Steffes M, et al. Laboratory, reading center, and coordinating center data management methods in the Jackson Heart Study. *Am J Med Sci* 2004;328:131–44.
26. Connett JE, Kusek JW, Bailey WC, et al. Design of the Lung Health Study: a randomized clinical trial of early intervention for chronic obstructive pulmonary disease. *Control Clin Trials* 1993;14:3S–19S.
27. Fishman A, Martinez F, Naunheim K, et al. A randomized trial comparing lung-volume-reduction surgery with medical therapy for severe emphysema. *N Engl J Med* 2003;348:2059–73.
28. Garcia-Aymerich J, Gomez FP, Anto JM. Phenotypic Characterization and Course of Chronic Obstructive Pulmonary Disease in the PAC-COPD Study: design and methods. *Arch Bronconeumol* 2009;45:4–11.
29. Brunes AM, Perez-Padilla R, Jardim JR, et al. Chronic obstructive pulmonary disease in five Latin American cities (the PLATINO study): a prevalence study. *Lancet* 2005;366:1875–81.
30. Domingo-Salvany A, Lamarca R, Ferrer M, et al. Health-related quality of life and mortality in male patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;166:680–5.
31. Moons KG, Donders RA, Stijnen T, et al. Using the outcome for imputation of missing predictor values was preferred. *J Clin Epidemiol* 2006;59:1092–101.
32. Steyerberg E. Applications of prediction models. In: Steyerberg E (ed.). *Clinical prediction models—a practical approach to development, validation, and updating*. New York: Springer, 2010. pp. 281–310.
33. Sullivan LM, Massaro JM, D'Agostino RB. Presentation of multivariate data for clinical use: the Framingham Study risk score functions. *Stat Med* 2004;23:1631–60.
34. Vickers AJ. Decision analysis for the evaluation of diagnostic tests, prediction models and molecular markers. *Am Stat* 2008;62:314–20.
35. Vickers AJ, Elkin EB. Decision curve analysis: a novel method for evaluating prediction models. *Med Decis Making* 2006;26:565–74.
36. Cazzola M, MacNee W, Martinez FJ, et al. Outcomes for COPD pharmacological trials: from lung function to biomarkers. *Eur Respir J* 2008;31:416–69.
37. Gail MH. The estimation and use of absolute risk for weighing the risks and benefits of selective estrogen receptor modulators for preventing breast cancer. *Ann N Y Acad Sci* 2001;949:286–91.

Pulmonary Perspective

Addressing the Complexity of Chronic Obstructive Pulmonary Disease

From Phenotypes and Biomarkers to Scale-Free Networks, Systems Biology, and P4 Medicine

Alvar Agustí^{1,2}, Patricia Sobradillo², and Bartolomé Celli³

¹Thorax Institute, Hospital Clinic, IDIBAPS, University of Barcelona, Spain; ²CIBER Enfermedades Respiratorias (CIBERES), Fundación Caubet-Cimera, Mallorca, Spain; and ³Brigham and Women's Hospital, Harvard School of Medicine, Boston, Massachusetts

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is a complex disease at the clinical, cellular, and molecular levels. However, its diagnosis, assessment, and therapeutic management are based almost exclusively on the severity of airflow limitation. A better understanding of the multiple dimensions of COPD and its relationship to other diseases is very relevant and of high current interest. Recent theoretical (scale-free networks), technological (high-throughput technology, biocomputing), and analytical improvements (systems biology) provide tools capable of addressing the complexity of COPD. The information obtained from the integrated use of those techniques will be eventually incorporated into routine clinical practice. This review summarizes our current knowledge in this area and offers an insight into the elements needed to progress toward an integrated, multilevel view of COPD based on the novel scientific strategy of systems biology and its potential clinical derivative, P4 medicine (Personalized, Predictive, Preventive, and Participatory).

Keywords: inflammation; genetics; networks; systems biology

SETTING THE SCENE

The diagnosis, assessment of severity, and therapy of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) are guided primarily by the degree of airflow limitation (1). However, it has been established that COPD is a complex, multicomponent disease (2) (Figure 1), and that FEV₁ fails to adequately express this complexity (3). For instance, some associated extrapulmonary manifestations of COPD, such as weight loss and skeletal muscle dysfunction, influence the course of the disease independently of FEV₁ (4), and, importantly, their treatment (by rehabilitation in this particular example) contributes to improve the prognosis and well-being of these patients without altering lung function (5). Thus, a better understanding of the complexity of COPD is important to improve current clinical practice and advance biomedical research and drug development.

A first important step in the direction of assessing this complexity was the development and validation of several multidimensional assessment indices, such as the BODE index (body mass index, FEV₁, dyspnea, and exercise capacity) (6),

the ADO index (age, dyspnea, FEV₁) (7), and the DOSE index (dyspnea, FEV₁, smoking status, and exacerbation frequency) (8). All of them, however, are based on clinical and functional variables only, whereas it is well established that COPD is also a complex disease at the molecular and genetic levels (9). For instance, a key pathogenic component of COPD is an enhanced inflammatory response to inhaled particles and gases (mostly tobacco smoking) (1). Interestingly, inflammation persists years after cessation of the initial stimuli (quitting smoking) (10–12). Likewise, it is well known that only a percentage of smokers develop COPD, suggesting a genetically determined susceptibility for the disease (13). However, information at the genotype, molecular, cellular, and phenotype levels (14–16) have not been incorporated into our current understanding and management of COPD.

Over the past few years there have been significant advances in the basic understanding of complex biological networks (17–19) coupled with important technological developments in biology (20) and computing sciences (21). These advances allow us to address the complexity of human diseases in general, and that of COPD in particular, in a comprehensive and dynamic way (systems biology) (22–27). These advances will help catalyze the transition from the current reactive practice of medicine to a Predictive, Personalized, Preventive, and Participatory (P4) medicine centered in preserving health and not solely in combating disease (21).

The aims of this review are to present and discuss some basic concepts (phenotypes, genotypes, biomarkers, scale-free networks) that are essential to progress toward an integrated, multilevel view of COPD based on the novel scientific strategy of systems biology and its potential clinical derivative, P4 medicine.

GENOTYPE AND PHENOTYPES: AVOIDING CONFUSION

The terms phenotype and genotype are often used in the medical literature with different meanings. Broadly speaking, a phenotype corresponds to any observed quality of an organism, whereas its genotype refers to the inherited genetic instructions it carries, whether they are expressed or not (28). The phenotype is often composed of traits or characteristics, some of which are controlled entirely by the individual's genes (genotype), whereas others, which are still controlled by genes, are significantly affected by environmental factors (28). Hence, the phenotype is the end result of the random interaction between the genotype and the environment (28).

This simple phenotype definition is not necessarily useful in disease states such as COPD. For instance, unless having brown eyes (an easily detectable phenotype) increases the predisposi-

(Received in original form September 4, 2010; accepted in final form December 17, 2010)

Supported in part by FIS PI09/00629 and unrestricted grants from Almirall and GSK.

Correspondence and requests for reprints should be addressed to Alvar Agustí, Director, Institut del Tòrax, Hospital Clínic, C/ Villarroel 170, Escala 3, Planta 5, 08036 Barcelona, Spain. E-mail: alvar.agusti@clinic.ub.es

Am J Respir Crit Care Med Vol 183, pp 1129–1137, 2011

Originally Published in Press as DOI: 10.1164/rccm.201009-1414PP on December 17, 2010
Internet address: www.atsjournals.org

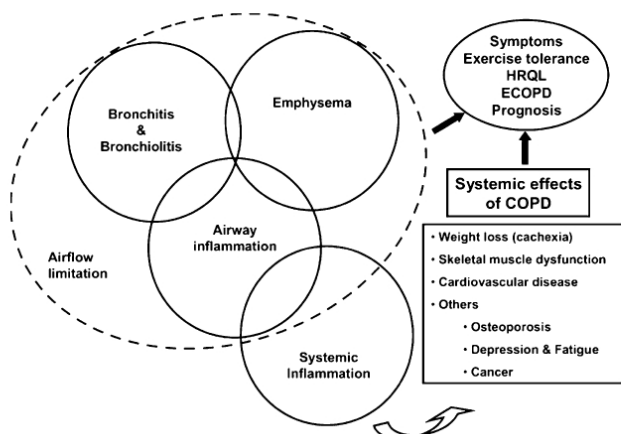


Figure 1. Multiple components of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). For more explanation, see text. (Reprinted by permission from Reference 72.) HRQL = health-related quality of life; ECOPD = COPD exacerbation.

tion to, worsens the natural history of, and/or influences the treatment of COPD (all of them unlikely), it does not provide information that is useful in any way to inform and guide clinical practice. In other words, phenotypes (or phenotypic traits) are not always necessarily relevant clinically. To address these limitations, the term “clinical phenotype” has been recently proposed (29). According to this proposal, a clinical phenotype is “a single or combination of disease attributes that describe differences between individuals with COPD as they relate to clinically meaningful outcomes (symptoms, exacerbations, response to therapy, and rate of disease progression or death)” (29). This implies that clinical phenotypes should: (1) have predictive value, (2) be prospectively validated for each of the outcomes to which they may relate, and (3) be able to classify patients into distinct subgroups that provide prognostic information and allow physicians to better determine the most appropriate therapy to improve clinically meaningful outcomes (29).

A quick review of the literature reveals that most of the phenotypes proposed to date in COPD (16, 30–32) do not fulfill this definition because they have been identified from cross-sectional analysis and have not been validated prospectively against clinically relevant outcomes (33). Interestingly, however, we do have some examples that do fulfill this definition. The oldest one probably corresponds to patients with COPD with chronic respiratory failure, in whom a specific type of treatment (domiciliary oxygen therapy) has been shown to improve prognosis below a given arterial P_{O_2} value (34, 35) but not above it (36, 37). A more recent example is lung volume reduction surgery, which has also been shown to improve prognosis in a well-characterized COPD phenotype (upper lobe emphysema and poor exercise capacity after rehabilitation) (38). Finally, a very recent example of the use of a specific phenotype in COPD is the development of a new antiinflammatory drug (roflumilast) for patients with COPD who had a history of chronic bronchitis (39, 40). In this context, it is worth noting that several national (41, 42) and international initiatives (43) are currently under way to identify potential phenotypes of clinical relevance in COPD.

Finally, three specific issues in relation to phenotypes in COPD are worth discussing: (1) depending on the context, certain attributes (e.g., dyspnea, or exacerbations) could be viewed as outcomes or phenotypes (29); (2) disease severity is not a phenotype. It may be the downstream consequence of a particularly

aggressive form of the disease, which is the real phenotype. The precise clinical, functional, imaging, and molecular characterization of this phenotype would be of great clinical value because it would allow its early identification, thus treatment, with the hope that this would in turn improve clinical outcomes (33); and, (3) severity of disease is often mistaken as an indication of disease activity. Severity is likely the consequence of sustained pathobiological activity, but it is entirely conceivable that any disease entity (including COPD) may have different levels of activity at any given stage of severity. Actually, in many other chronic inflammatory conditions, such as rheumatoid arthritis, there is a clear distinction between severity and activity of the disease. How to specifically address this conundrum in COPD is still unresolved (44). We would like to propose, however, that the measurement of COPD severity needs to relate to the extent of loss of function in the lungs (or other organs affected by the disease) that eventually impact on the final prognosis of the patient (e.g., degree of airflow limitation, lung hyperinflation, and/or pulmonary gas exchange impairment). In contrast, the degree of disease activity will have to be necessarily related to the identification of biomarkers that inform on the level of activation of one or more cellular and molecular networks that drive disease progression (for specific examples, see below).

BIOMARKERS: CURRENT STATE AND FUTURE PERSPECTIVE

According to a recent European Respiratory Society/American Thoracic Society position paper, a biomarker is “any molecule or material (e.g., cells, tissue) that reflects the disease process” (45). Some aspects of this definition deserve comment. First, it excludes functional or imaging measures and focuses on biological determinations. Second, the term “disease process” is not defined and may range from biological mechanisms to clinically relevant outcomes. Other medical disciplines, however, have been more specific and demanding in their requirements to qualify a clinical biomarker as useful (46). In the cardiovascular arena (and likely in COPD too), to be useful in clinical practice any biomarker has to: (1) be technically measurable with specificity and reliability, (2) convey novel information that cannot be obtained by other (simpler) methods, and (3) be useful for the effective management of the patients (Table 1) (46).

TABLE 1. PROPOSED CRITERIA TO ASSESS THE CLINICAL USEFULNESS OF NOVEL BIOMARKERS

Can the clinician measure the biomarker?
Accurate and reproducible analytical method(s)
Preanalytical issues (including stability) evaluated and manageable
Assay is accessible
Available assays provide high-throughput and rapid turnaround
Reasonable cost
Does the biomarker add new information?
Strong and consistent association between the biomarker and the outcome or disease of interest in multiple studies
Information adds to or improves on existing tests
Decision limits are validated in more than one study
Evaluation includes data from community-based populations
Will the biomarker help the clinician to manage patients?
Superior performance to existing diagnostic tests, or
Evidence that associated risk is modifiable with specific therapy, or
Evidence that biomarker-guided triage or monitoring enhances care
Consider each of multiple potential uses of the biomarker (diagnosis, risk stratification; selection of therapy; monitoring disease progression, disease activity, or response to therapy)

Bold statements indicate highest priority. (Adapted by permission from Reference 46.)

Over the past few years there has been a growing interest in the field of biomarkers in COPD. C-reactive protein (CRP) was probably the first candidate to be studied in these patients. Pinto-Plata and colleagues showed that CRP serum levels were raised in patients with COPD, independently of cigarette smoking (47), whereas Dahl and colleagues demonstrated that raised CRP levels were an independent predictor of future outcomes, including hospitalization and death (48). Whether or not these levels respond to inhaled antiinflammatory therapy is controversial because, although initial studies suggested that this was the case (47, 49), results were not confirmed in later investigations in larger cohorts (50). Other candidate biomarkers studied in COPD include circulating levels of Clara cell secretory protein-16 (CC-16) (51), surfactant protein (SP)-D (52), and serum amyloid A (SAA) (53). The serum levels of CC-16, a marker of Clara cell toxicity, appear to be reduced in patients with COPD (51). In contrast, the serum levels of SP-D, a lung-derived protein associated with the presence of pulmonary inflammation, are increased in smokers (with or without COPD) and are potentially useful to identify patients at risk for exacerbations of COPD (52); interestingly, SP-D levels appear to respond to inhaled steroid therapy (50). Finally, Bozinovski and colleagues recently reported that, in contrast to IL-6, CRP, or procalcitonin levels, SAA can be helpful for the diagnosis of the episodes of exacerbation (53).

These studies focused on one or a few potential biomarker candidates. The use of high-throughput technology will improve our capacity to screen, identify, and eventually validate many different and novel biomarkers simultaneously. In the field of COPD, Pinto-Plata and colleagues used a protein microarray platform and identified a panel of 24 serum markers of inflammation, tissue destruction, and repair that were significantly related to lung function, exercise capacity, the BODE index, and reported exacerbation frequency (54). Unfortunately, their relationship with prospectively determined relevant clinical outcomes was not explored.

Finally, micro ribonucleic acids (micro-RNAs; miRNAs) are small (22-nucleotide), single-stranded, noncoding RNAs that regulate gene expression by inducing mRNA degradation or by inhibiting translation (55). Their potential usefulness as biomarkers has already been established in patients with cancer (56, 57) but has not been investigated yet in COPD.

It is important to realize that different biomarkers may serve different purposes (33), ranging from the early detection of subclinical disease, the diagnosis of acute events (e.g., exacerbations of COPD), risk stratification, selection of the most appropriate therapy for a specific clinical phenotype, and the monitoring of disease progression, disease activity, and/or response to therapy (46). Therefore, it is conceivable (and desirable) that in the near future clinicians will be able to use validated biomarkers to better characterize different aspects of the pulmonary and extrapulmonary dimensions of the disease that will eventually help them make the most appropriate therapeutic decisions for individual patients.

SCALE-FREE NETWORKS ARE EVERYWHERE

Surprisingly, many diverse systems, such as the cell, the society, the economy, electrical networks, terrorist organizations, and/or the Internet, share a similar internal architecture: the so-called scale-free networks (19, 58). This is a particular type of network characterized by having the majority of its nodes (i.e., the core elements of the network, whether they are genes, proteins, metabolites, people, power plants, terrorists, or computers in the examples given above) connected to other nodes of the network by a relatively small number of links, whereas a few nodes (hubs) present an extremely high number of links (Figure 2). This is very different from the Poisson network, where the majority of nodes have a similar (and relatively small) number of links (Figure 2).

Scale-free networks share two important functional characteristics. First, they are differentially sensitive to damage. This means that if a small, peripheral node stops functioning, the network is very likely to continue working without problem. By contrast, if a hub is damaged, the functionality of the entire network is likely to be jeopardized. As an example, consider the air traffic network shown in Figure 2. If a hub airport (e.g., JFK in New York) is closed (remember last winter's snow storms) most of the United States and many international flights will be affected, whereas if a small, peripheral airport is closed, most flights will continue without problems. This differential sensitivity to damage depending on the centrality of the node is also seen in biological networks (59). To illustrate this point, Figure 3 presents a murine gene network (60). *Red* and *blue dots* represent nodes (genes) that were significantly up- or down-regulated, respectively, under the particular experimental conditions of this study (ovalbumin sensitization) (60). Several characteristics of this network of experimentally induced asthma are worth discussing: (1) it is a scale-free network, with clearly identifiable hubs; (2) only a small percentage of the genes change their expression (color code) after the experimental intervention; (3) it is only by having a map of the network that the topology (i.e., location within the network) of a given gene can be determined, and more importantly, whether a specific gene is characterized as a hub or not; and (4) genes (nodes) that change in response to the experimental conditions (colored nodes) tend to have relatively low degrees of connectivity, probably indicating that hubs are key nodes for the functioning and survival of the network (59).

Second, complex systems are characterized by the presence of emerging properties, which do not correspond to any given individual component (node) of the network but to the existence of the network itself. An easy example of a complex system with emerging properties is an airplane: none of its elements (wings, engines, crew, etc.) can fly by itself. Flying is an emerging property of the system. The concept of emerging properties is extremely important in human biology, because

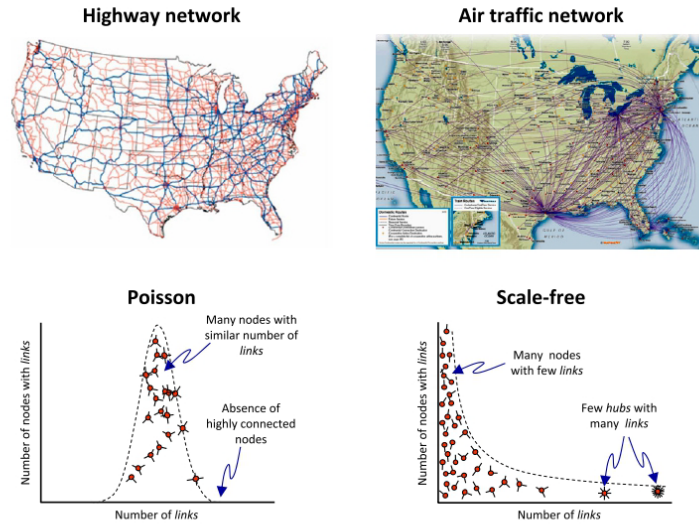


Figure 2. Poisson and scale-free networks. For more explanation, see text. (Courtesy of Prof. M. Perpiña, Valencia, Spain.)

health and disease (life itself, after all) are also emerging properties of a complex system: the human body.

NETWORKS AND HUMAN BIOLOGY: THE DISEASOME

The application of network science to human biology has begun to produce some exciting and intriguing results. On the one hand, the description of the “diseasome” (Figure 5) from the combination of the Human Disease Network and the Disease Gene Network (see Appendix for further explanation) is a paradigmatic example (22) because it offers, for the first time, a single platform to explore all known phenotype and disease gene associations (22). On the other hand, because human biology changes with time (for instance, during the transition from health to disease or during the response of a given disease to a specific form of therapy), a dynamic, continuous, graphical representation is needed. The so-called Phenotypic Disease Network (PDN) recently published by Hidalgo and colleagues (see Appendix for further explanation) is a first attempt in this direction (24), as it showed that: (1) patients develop diseases that are closely located in the network to those they already have, (2) the progression of disease along the links of the network is different for patients of different sex and race, and (3) patients diagnosed with diseases that are highly connected in the PDN tend to die sooner than those affected by less connected diseases (24). All in all, these findings highlight the potential of network science to better understand the origin and evolution of human diseases (24).

SYSTEMS BIOLOGY: THE INTEGRATIVE APPROACH

Human biology, both in health and disease, is extremely complex (17). Because of this complexity and the lack of adequate tools to handle complex data, biomedical research has traditionally followed a reductionist strategy, moving its focus progressively from the entire human body (anatomy), to the organ (physiology), the isolated cell (cell biology) and, more recently, molecules and genes (molecular biology) (61). This research strategy has been extremely successful and probably

reached its summit with the cloning of the entire human genome (62). Yet, it is clear that a detailed inventory of genes, proteins, and metabolites is not sufficient to understand life’s complexity, an emergent property of the system (17).

Systems biology is a novel scientific discipline that seeks to backtrack the reductionist path followed historically by biomedical research to: (1) integrate data within and between the

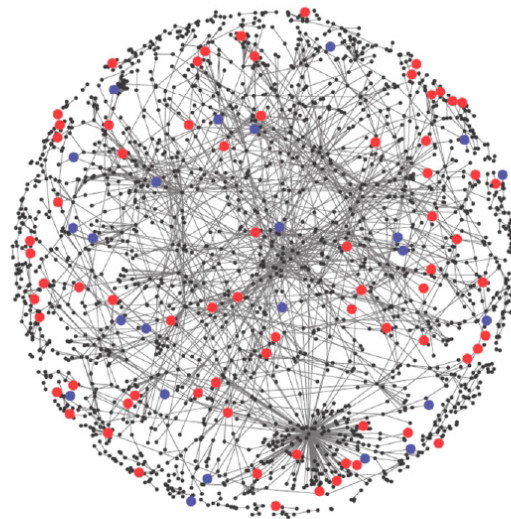


Figure 3. Gene network derived from the Biomolecular Interaction Network Database (BIND), the largest available database of murine molecular interactions. Red and blue dots represent nodes in the network (genes) that were significantly up- or down-regulated, respectively, in these particular experimental conditions. For further explanation, see text. (Reprinted by permission from reference 61.)

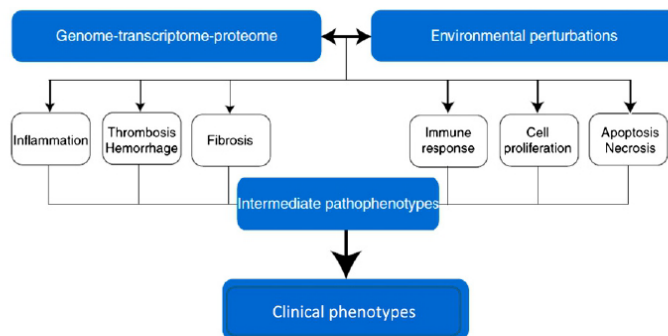


Figure 4. The interaction between genetic and environmental factors leads to clinical phenotypes through a finite number of intermediate pathophenotypes. (Adapted by permission from Reference 23.)

different levels of biological complexity (genes, molecules, cells, tissues, organs, entire body, and even society and environment); and (2) model the complexity of the system and its emerging properties. To achieve these goals, systems biology follows an iterative research strategy that generally involves the following steps (25): (1) use high-throughput platforms to collect global genome, transcriptome, proteome, and metabolome information in patients who have been precisely characterized phenotypically (including, if possible, clinical, functional, and imaging data). Whenever these data are not available, they can be complemented with information existing in publically available databases through knowledge management platforms (66); (2) use biocomputing algorithms to generate multiscale (from the molecular to the organ level) predictive mathematical models from the data collected in patients; (3) use these models to formulate novel working hypotheses on the mechanisms and pathways involved in the disease of interest; (4) test these novel hypothesis through perturbation experiments, that can be done *in silico* (model simulation), *in vitro* (cell culture), or *in vivo* (animal models or, in the case of selected perturbations, such as exercise, in healthy subjects or patients); (5) compare the experimental responses observed with those predicted by the initial mathematical models, which are then refined to account better for the results; and, (6) perform novel perturbation experiments designed and tested computationally and experimentally to arbitrate between competing hypotheses (25). This process is iterated until the derived model predicts with reasonable accuracy the observed experimental findings, at which point the model would have allowed a better understanding of the disease of interest and the identification of novel biomarkers. This may in turn translate into the development of novel diagnostic and therapeutic interventions that can be tested and validated in prospective clinical trials (27).

IMPLICATIONS FOR THE SCIENCE AND MANAGEMENT OF COPD

The new science of complex networks and systems biology reviewed above offers new opportunities for a better understanding of the complexity of COPD (63–65).

Intermediate Pathophenotypes: Toward a Novel Classification of Human Diseases

The classification of human diseases is currently based on observed correlations between clinical syndromes and pathological and laboratory findings (23). This taxonomic strategy has two significant limitations: (1) it lacks sensitivity to identify preclinical disease, and (2) it lacks specificity to define disease

unequivocally because diseases often have different clinical presentations (i.e., phenotypes) (23). Loscalzo and colleagues have pioneered the use of network science and complex systems to better define and understand what phenotypes really are and, eventually, to move toward a novel classification of human diseases (23). Given that any given phenotype/disease reflects the dynamic consequences of the random interaction between the genotype and the environment, Loscalzo and colleagues (23) suggest that it is important to consider two different types of disease-modifying genes: (1) those genetic mutations and polymorphisms primarily located in the disease-specific functional modules that characterize that particular phenotype/disease (22); and, (2) those genes (or networks of genes) whose actions reflect generic responses to organism stress, evoked either by the principal mutation and/or environmental exposures (23). These generic responses constitute the so-called intermediate pathophenotypes and include (Figure 4): inflammation, thrombosis and hemorrhage, fibrosis, the immune response, proliferation, and apoptosis/necrosis (23). Given that these intermediate pathophenotypes constitute the entire armamentarium that we humans have to respond to injury, it should not be at all surprising that basically all diseases known to date include a varying proportion of one or more of these responses.

A systems-based network analysis that considers all these elements provides a mechanistic basis for defining phenotypic differences among individuals with the same disease through consideration of unique genetic and environmental factors that govern intermediate phenotypes contributing to disease expression (23). Specifically, such analysis has the potential to: (1) identify the determinants (nodes) or combinations of determinants that influence network behavior (emergent properties) and disease expression (phenotype); (2) provide insight into disease mechanism and potential therapeutic targets, because regulatory determinants may not always be obvious from reductionist principles; and, (3) quantify the relationships within the network genome, environmental exposures, and environmental effects that define the specific pathophenotype(s) involved in a given clinical condition (23). The application of these principles to specific diseases, including COPD, is in its infancy, but concepts are internally consistent and early results encouraging (23).

The Inflammatory Network: Immune Cartography and the Riboleukogram

Each of the intermediate pathophenotypes discussed above is in itself a complex network. To exemplify this concept, we discuss the case of the inflammatory response, believed to play a key role in the pathogenesis of COPD (1, 11). Calvano and

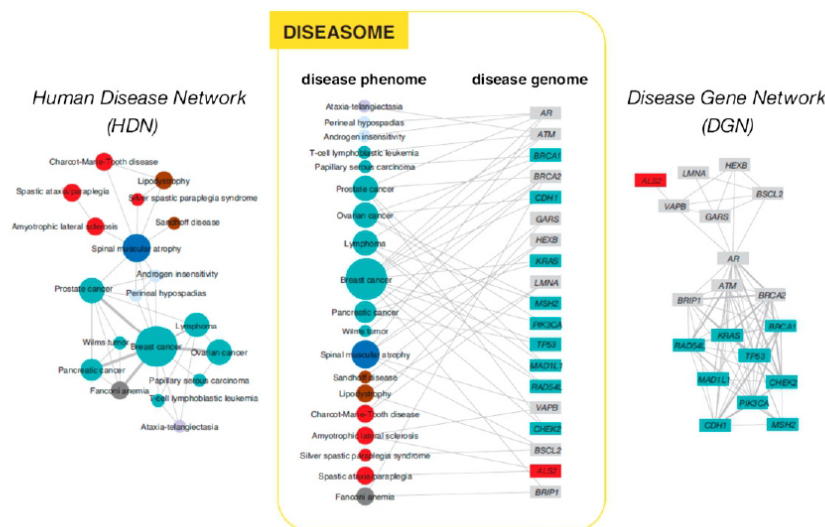


Figure 5. Left panel: small subset of the Human Disease Network (HDN), wherein two diseases (circles) are connected if they share at least one gene, and the width of a link is proportional to the number of genes shared. Right panel: small subset of the Disease Gene Network (DGN), wherein two genes (squares) are connected if they have been involved in the same disease and link width is proportional to the number of disorders with which the two genes are commonly associated. Center panel (diseasome): a disease and a gene are linked if mutations in that gene lead to the specific disorder. Circle size is proportional to the number of genes participating in the corresponding disorder, and the color corresponds to the disease class to which the disease belongs. (Reprinted by permission from reference 22.)

colleagues were the first to apply a network-based analysis in the study of the inflammatory response in humans (67). They analyzed changes in blood leukocyte gene expression patterns in healthy human volunteers before and after the administration of bacterial endotoxin. They identified significant functional module perturbation following the challenge, particularly a transient dysregulation of leukocyte bioenergetics and modulation of the translational machinery (67). A few years later, McDunn and colleagues explored if circulating leukocyte transcriptional profiles (riboleukograms) can be used to monitor the host response to and the recovery from acute infection. They found that: (1) an infection-specific transcriptional program (i.e., a specific riboleukogram) precedes the clinical diagnosis of pneumonia in critically ill patients, and (2) disease trajectories derived from the riboleukograms can be used to quantitatively track the clinical course of the disease and to identify a state of immune recovery (68). Polpitiya and colleagues extended these observations and developed the concept of immune cartography (69). Using mouse models of abdominal and pulmonary sepsis, they showed that riboleukograms differentiated infected and sterile animals, and were specific for gram-negative or gram-positive infections (69). In addition, they observed that the endotoxin response can be mapped at the level of gene expression, and it was possible to follow septic patients and quantitatively determine their immune recovery (69). The potential application of immune cartography to the inflammatory response that characterizes COPD is being investigated currently.

An Integrated Model of COPD: Role of Comorbidities

As stated from the beginning of this review, COPD is a complex disease with pulmonary and extrapulmonary (comorbidities) manifestations (2). A systems-based approach can thus facilitate the understanding of this complexity. The work by Lee and colleagues (70) illustrates this possibility. Following similar principles to those discussed above for the diseasome (22), these investigators explored the implications of the Human Metabolic Network (HMN) topology for disease comorbidity

(70) (see Appendix for further explanation) and showed that: (1) comorbidity was higher in connected diseases than in those that have no metabolic link between them, and (2) the more connected a disease is, the higher is its prevalence and associated mortality rate (70). Furthermore, Park and colleagues combined information on cellular interactions, disease-gene associations, and population-level disease patterns extracted from Medicare data to confirm statistically significant correlations between the underlying structure of cellular networks and disease comorbidity patterns (71). Taken together, these results highlight that a network topology-based approach helps to uncover potential mechanisms that contribute to the shared pathophysiology of seemingly distinct diseases. Until now, these diseases were categorized as comorbidities simply because the shared mechanistic linking them were unknown. As our knowledge of the underlying cellular and molecular networks improves, it is likely that in the future some comorbidities of COPD will in fact be an integral part of a specific phenotype because they share abnormalities in different modules of the disease. Such modules may, of course, change with disease severity or, it is hoped, in response to therapy.

P4 MEDICINE: FROM SYSTEMS BIOLOGY TO PERSONALIZED MEDICINE

Standing on the shoulders of the theoretical (scale-free networks), technological (high-throughput technology, biocomputing), and analytical improvements (systems biology), it is conceivable that over the next few years the practice of medicine will evolve from its traditional reactive mode (i.e., doctors diagnose and treat established diseases) to an anticipatory mode (i.e., centered in preserving health) (21). The term “P4 medicine” (Personalized, Predictive, Preventive, and Participatory) has been coined to describe this new form of medicine (21). It is anticipated that it will be personalized because it will be based on the personal genome data; it will be predictive because the analysis of these personal data will allow accurate risk predictions for several diseases; it will be pre-

ventive because, from that prediction, preventive measures, either in the form of regular screening and/or specific interventions, could be implemented; and it will be participatory because the participation of the individual is essential for all of the above, for instance, when lifestyle changes are advised or when compliance with chronic treatments are needed (21).

CONCLUSIONS

This review has addressed different issues related to the complexity of COPD (phenotypes, biomarkers) and has discussed some of the scientific changes that are currently occurring (scale-free networks, systems biology, the diseaseome, intermediate pathophenotypes, riboleukogram, and immune cartography). All of these are likely to significantly affect our understanding and management of the disease (P4 medicine). We are not there yet, but it may not take long to witness what will likely be a true revolution for scientists, doctors, nurses, patients, individuals, and society. No doubt the findings emanating from this endeavor will have many and very significant ethical, legal, social, and economic implications. And, in closing, for the skeptics, just remember that only a few years ago none of us had a mobile telephone, e-mail, or access to the Internet.

Author Disclosure: A.A. serves on the advisory board of Almirall, GlaxoSmithKline, and Altana. A.A. has received lecture fees from GlaxoSmithKline, AstraZeneca, and Almirall and has received sponsored grants from Almirall, Boehringer-Ingelheim, Pfizer, GlaxoSmithKline, and AstraZeneca. P.S. does not have a financial relationship with a commercial entity that has an interest in the subject of this manuscript. B.C. has received consultancy fees from Boehringer-Ingelheim, GlaxoSmithKline, AstraZeneca, and Almirall. B.C. serves on the advisory board for Aeris, Rox, Boehringer-Ingelheim, GlaxoSmithKline, and AstraZeneca. B.C. has received sponsored grants from Boehringer-Ingelheim, Pfizer, GlaxoSmithKline, Aeris, and Forrest.

Acknowledgment: This paper is in itself a living proof of the importance of networks. Its first draft was written in Fornalutx (Balearic Islands, Spain) surrounded by a network of beautiful orange, lemon, and olive trees (<http://www.ajformalutx.net>) that provided the necessary *environmental network* conditions for reading, thinking and writing (*biological network*). Then, it was discussed overseas by using the facilities of a *key technological network*: the Internet. Finally, the input of a *social network* of many colleagues and friends helped it reach its final form. Without these four networks, this paper would have been different or may not even have existed.

References

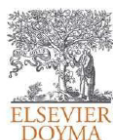
- Rabe KF, Hurd S, Anzueto A, Barnes PJ, Buist SA, Calverley P, Fukuchi Y, Jenkins C, Rodriguez-Roisin R, van Weel C van, et al. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;176:532-555.
- Agusti AG. COPD, a multicomponent disease: implications for management. *Respir Med* 2005;99:670-682.
- Agusti A, Calverley P, Celli B, Coxson H, Edwards L, Lomas D, MacNee W, Miller B, Rennard S, Silverman E, et al. Characterisation of COPD heterogeneity in the ECLIPSE cohort. *Respir Res* 2010;11:122-136.
- Schols AM, Slangen J, Volovics L, Wouters EF. Weight loss is a reversible factor in the prognosis of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157:1791-1797.
- Ries AL, Kaplan RM, Limberg TM, Prewitt LM. Effects of pulmonary rehabilitation on physiologic and psychosocial outcomes in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Ann Intern Med* 1995;122:823-832.
- Celli BR, Cote CG, Marin JM, Casanova C, Montes de Oca M, Mendez RA, Pinto Plata V, Cabral HJ. The body-mass index, airflow obstruction, dyspnea, and exercise capacity index in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2004;350:1005-1012.
- Puhan MA, Garcia-Aymerich J, Frey M, Ter RG, Anto JM, Agusti AG, Gomez FP, Rodriguez-Roisin R, Moons KG, Kessels AG, et al. Expansion of the prognostic assessment of patients with chronic obstructive pulmonary disease: the updated BODE index and the ADO index. *Lancet* 2009;374:704-711.
- Jones RC, Donaldson GC, Chavannes NH, Kida K, Dickson-Spillmann M, Harding S, Wedzicha JA, Price D, Hyland ME. Derivation and validation of a composite index of severity in chronic obstructive pulmonary disease: the DOSE index. *Am J Respir Crit Care Med* 2009;180:1189-1195.
- Barnes PJ. Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Nat Rev Immunol* 2008;8:183-192.
- Willemsse BWM, ten Hacken NHT, Rutgers B, Lesman-Leege IGAT, Postma DS, Timens W. Effect of 1-year smoking cessation on airway inflammation in COPD and asymptomatic smokers. *Eur Respir J* 2005;26:835-845.
- Hogg JC, Chu F, Utokaparch S, Woods R, Elliott WM, Buzatu L, Cherniack RM, Rogers RM, Sciurba FC, Coxson HO, et al. The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2004;350:2645-2653.
- Cosio M, Saetta M, Agusti A. Immunological aspects of COPD. *N Engl J Med* 2009;360:2445-2454.
- Castaldi PJ, Cho MH, Cohn M, Langerman F, Moran S, Tarragona N, Moukhachen H, Venugopal R, Hasimja D, Kao E, et al. The COPD genetic association compendium: a comprehensive online database of COPD genetic associations. *Hum Mol Genet* 2010;19:526-534.
- Cho MH, Boutaoui N, Klanderman BJ, Sylvia JS, Ziniti JP, Hersh CP, DeMeo CL, Hunninghake GM, Litonjua A, Sparrow D, et al. Variants in FAM13A are associated with chronic obstructive pulmonary disease. *Nat Genet* 2010;42:200-202.
- Hersh CP, Pillai SG, Zhu G, Lomas DA, Bakke P, Gulsvik A, DeMeo DL, Klanderman BJ, Lazarus R, Litonjua AA, et al. Multistudy fine mapping of chromosome 2q identifies XRCC5 as a chronic obstructive pulmonary disease susceptibility gene. *Am J Respir Crit Care Med* 2010;182:605-613.
- Cho MH, Washko GR, Hoffmann TJ, Criner GJ, Hoffman EA, Martinez FJ, Laird N, Reilly JJ, Silverman EK. Cluster analysis in severe emphysema subjects using phenotype and genotype data: an exploratory investigation. *Respir Res* 2010;11:30.
- Oltvai ZN, Barabasi AL. Systems biology. Life's complexity pyramid. *Science* 2002;298:763-764.
- Barabasi AL, Oltvai ZN. Network biology: understanding the cell's functional organization. *Nat Rev Genet* 2004;5:101-113.
- Barabasi AL. Scale-free networks: a decade and beyond. *Science* 2009;325:412-413.
- Manolio TA. Genomewide association studies and assessment of the risk of disease. *N Engl J Med* 2010;363:166-176.
- Galas DJ, Hood L. Systems biology and emerging technologies will catalyze the transition from reactive medicine to predictive, personalized, preventive and participatory (P4) medicine. *Interdisciplinary Bio Central* 2009;1:1-4.
- Goh KI, Cusick ME, Valle D, Childs B, Vidal M, Barabasi AL. The human disease network. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:8685-8690.
- Loscalzo J, Kohane I, Barabasi AL. Human disease classification in the postgenomic era: a complex systems approach to human pathobiology. *Mol Syst Biol* 2007;3:124.
- Hidalgo CA, Blumm N, Barabasi AL, Christakis NA. A dynamic network approach for the study of human phenotypes. *PLoS Comput Biol* 2009;5:e1000353.
- Auffray C, Adcock Im, Chung KF, Djukanovic R, Pison C, Sterk PJ. An integrative systems biology approach to understanding pulmonary diseases. *Chest* 2010;137:1410-1416.
- Auffray C, Chen Z, Hood L. Systems medicine: the future of medical genomics and healthcare. *Genome Med* 2009;1:2.
- Clermont G, Auffray C, Moreau Y, Rocke DM, Dalevi D, Dubhashi D, Marshall DR, Raasch P, Dehne F, Provero P, et al. Bridging the gap between systems biology and medicine. *Genome Med* 2009;1:88.
- Freimer N, Sabatti C. The human phenome project. *Nat Genet* 2003;34:15-21.
- Han MK, Agusti A, Calverley PM, Celli BR, Criner G, Curtis JL, Fabbri LM, Goldin JG, Jones PW, MacNee W, et al. Chronic obstructive pulmonary disease phenotypes: the future of COPD. *Am J Respir Crit Care Med* 2010;182:598-604.
- Burgel PR, Paillasseur JL, Caillaud D, Tillie-Leblond I, Chanez P, Escamilla R, Court-Fortune I, Perez T, Carré P, Roche N. Clinical COPD phenotypes: a novel approach using principal component and cluster analyses. *Eur Respir J* 2010;36:531-539.
- Marsh SE, Travers J, Weatherall M, Williams MV, Aldington S, Shirlcliffe PM, Hansell AL, Nowitz MR, McNaughton AA, Soriano JB, et al. Proportional classifications of COPD phenotypes. *Thorax* 2008;63:761-767.

32. Bhattacharya S, Srisuma S, DeMeo DL, Shapiro SD, Bueno R, Silverman EK, Reilly JJ, Mariani TJ. Molecular biomarkers for quantitative and discrete COPD phenotypes. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2009;40:359-367.
33. Jones PW, Agustí AGN. Outcomes and markers in the assessment of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2006;27:822-832.
34. Report of the Medical Research Council Working Party. Long term domiciliary oxygen therapy in chronic hypoxic cor pulmonale complicating chronic bronchitis and emphysema. *Lancet* 1981;1:681-686.
35. Nocturnal Oxygen Therapy Trial Group. Continuous or nocturnal oxygen therapy in hypoxemic chronic obstructive lung disease. A clinical trial. *Ann Intern Med* 1980;93:391-398.
36. Górecka D, Gorzelak K, Sliwinski P, Tobiasz M, Zielinski J. Effect of long term oxygen therapy on survival in patients with chronic obstructive pulmonary disease with moderate hypoxaemia. *Thorax* 1997;52:674-679.
37. Zielinski J. Long-term oxygen therapy in COPD patients with moderate hypoxaemia: does it add years to life? *Eur Respir J* 1998;12:756-758.
38. National Emphysema Treatment Trial Research Group. A randomized trial comparing lung-volume-reduction surgery with medical therapy for severe emphysema. *N Engl J Med* 2003;348:2059-2073.
39. Fabbri LM, Calverley PM, Izquierdo-Alonso JL, Bundschuh DS, Brose M, Martínez FJ, Rabe KF. Roflumilast in moderate-to-severe chronic obstructive pulmonary disease treated with longacting bronchodilators: two randomised clinical trials. *Lancet* 2009;374:695-703.
40. Calverley PM, Rabe KF, Goehring UM, Kristiansen S, Fabbri LM, Martínez FJ. Roflumilast in symptomatic chronic obstructive pulmonary disease: two randomised clinical trials. *Lancet* 2009;374:685-694.
41. García-Aymerich J, Gomez FP, Anto JM. [Phenotypic characterization and course of chronic obstructive pulmonary disease in the PAC-COPD study: design and methods.] *Arch Bronconeumol* 2009;45:4-11.
42. Regan EA, Hokanson JE, Murphy JR, Make B, Lynch DA, Beaty TH, Curran-Everett D, Silverman EK, Crapo JD. Genetic epidemiology of COPD (COPDGene) study design. *COPD* 2010;7:32-43.
43. Vestbo J, Anderson W, Coxson HO, Crim C, Dawber F, Edwards L, Hagan G, Knobil K, Lomas DA, MacNee W, et al. Evaluation of COPD longitudinally to identify predictive surrogate end-points (ECLIPSE). *Eur Respir J* 2008;31:869-873.
44. Vestbo J, Rennard S. Chronic obstructive pulmonary disease biomarker(s) for disease activity needed—urgently. *Am J Respir Crit Care Med* 2010;182:863-864.
45. Cazzola M, MacNee W, Martínez FJ, Rabe KF, Franciosi LG, Barnes PJ, Brusasco V, Burge PS, Calverley PMA, Celli BR, et al. Outcomes for COPD pharmacological trials: from lung function to biomarkers. *Eur Respir J* 2008;31:416-469.
46. Morrow DA, de Lemos JA. Benchmarks for the assessment of novel cardiovascular biomarkers. *Circulation* 2007;115:949-952.
47. Pinto-Plata VM, Mullerova H, Toso JF, Feudjo-Tepie M, Soriano JB, Vessey RS, Celli BR. C-reactive protein in patients with COPD, control smokers and non-smokers. *Thorax* 2006;61:23-28.
48. Dahl M, Vestbo J, Lange P, Bojesen SE, Tybjaerg-Hansen A, Nordestgaard BG. C-reactive protein as a predictor of prognosis in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;175:250-255.
49. Sin DD, Lacy P, York E, Man SFP. Effects of fluticasone on systemic markers of inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;170:760-765.
50. Sin DD, Man SFP, Marciniuk DD, Ford G, FitzGerald M, Wong E, York E, Mainra RR, Ramesh W, Melenka LS, et al. The Effects of fluticasone with or without salmeterol on systemic biomarkers of inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;177:1207-1214.
51. Lomas DA, Silverman EK, Edwards LD, Miller BE, Coxson HO, Tal-Singer R. Evaluation of serum CC-16 as a biomarker for COPD in the ECLIPSE cohort. *Thorax* 2008;63:1058-1063.
52. Lomas DA, Silverman EK, Edwards LD, Locantore NW, Miller BE, Horstman DH, Tal-Singer R; Evaluation of COPD Longitudinally to Identify Predictive Surrogate Endpoints study investigators. Serum surfactant protein D is steroid sensitive and associated with exacerbations of COPD. *Eur Respir J* 2009;34:95-102.
53. Bozinovski S, Hutchinson A, Thompson M, MacGregor L, Black J, Giannakis E, Karlsson AS, Silvestrini R, Smallwood D, Vlahos R, et al. Serum amyloid A is a biomarker of acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;177:269-278.
54. Pinto-Plata V, Toso J, Lee K, Parks D, Bilello J, Mullerova H, Desouza M, Vessey RS, Celli B. Profiling serum biomarkers in patients with COPD: associations with clinical parameters. *Thorax* 2007;62:595-601.
55. Nana-Sinkam SP, Hunter MG, Nuovo GJ, Schmittgen TD, Gelinas R, Galas D, Marsh CB. Integrating the microRNome into the study of lung disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2009;179:4-10.
56. Kosaka N, Iguchi H, Yoshioka Y, Takeshita F, Matsuki Y, Ochiya T. Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells. *J Biol Chem* 2010;285:17442-17452.
57. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, Peterson A, Noteboom J, O'Briant KC, Allen A, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:10513-10518.
58. Barabasi AL, Albert R. Emergence of scaling in random networks. *Science* 1999;286:509-512.
59. Jeong H, Mason SP, Barabasi AL, Oltvai ZN. Lethality and centrality in protein networks. *Nature* 2001;411:41-42.
60. Lu X, Jain VV, Finn PW, Perkins DL. Hubs in biological interaction networks exhibit low changes in expression in experimental asthma. *Mol Syst Biol* 2007;3:98.
61. Barabasi AL. Network medicine—from obesity to the “diseaseome”. *N Engl J Med* 2007;357:404-407.
62. Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, Smith HO, Yandell M, Evans CA, Holt RA, et al. The sequence of the human genome. *Science* 2001;291:1304-1351.
63. Richens JL, Urbanowicz RA, Lunt EA, Metcalf R, Corne J, Fairclough L, O'Shea P. Systems biology coupled with label-free high-throughput detection as a novel approach for diagnosis of chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Res* 2009;10:29.
64. Vidal M. A unifying view of the 21st century systems biology. *FEBS Lett* 2009;583:3891-3894.
65. Wu W, Kaminski N. Chronic lung diseases. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* 2009;1:298-308.
66. Carter GW, Galas DJ, Galitski T. Maximal extraction of biological information from genetic interaction data. *PLOS Comput Biol* 2009;5:e1000347.
67. Calvano SE, Xiao W, Richards DR, Felciano RM, Baker HV, Cho RJ, Chen RO, Brownstein BH, Cobb JP, Tschoeke SK, et al. A network-based analysis of systemic inflammation in humans. *Nature* 2005;437:1032-1037.
68. McDunn JE, Husain KD, Polpitiya AD, Burykin A, Ruan J, Li Q, Schierding W, Lin N, Dixon D, Zhang W, et al. 2008. Plasticity of the systemic inflammatory response to acute infection during critical illness: development of the riboleukogram. *PLoS One* 3:e1564.
69. Polpitiya AD, McDunn JE, Burykin A, Ghosh BK, Cobb JP. Using systems biology to simplify complex disease: immune cartography. *Crit Care Med* 2009;37:S16-S21.
70. Lee DS, Park J, Kay KA, Christakis NA, Oltvai ZN, Barabasi AL. The implications of human metabolic network topology for disease comorbidity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:9880-9885.
71. Park J, Lee DS, Christakis NA, Barabasi AL. The impact of cellular networks on disease comorbidity. *Mol Syst Biol* 2009;5:262.
72. Agustí A. Systemic effects of chronic obstructive pulmonary disease: what we know and what we don't know (but should). *Proc Am Thorac Soc* 2007;4:S22-S25.

APPENDIX

GLOSSARY OF TERMS AND DEFINITIONS

- *Biomarker*: any molecule or material (e.g., cells, tissue) that is objectively measured and evaluated as an indicator of normal biological processes, pathogenic processes, or pharmacologic responses to a therapeutic intervention.
- *Complex system*: system composed of interconnected parts that as a whole exhibit one or more properties not obvious from the properties of the individual parts (emerging properties).
- *COPD phenotype*: a single or combination of disease attributes (traits) that describe differences between individuals with COPD as they relate to clinically meaningful outcomes (symptoms, exacerbations, response to therapy, and rate of disease progression or death).
- *Disease severity*: extent of the functional loss of the target organ.
- *Disease activity*: level of activation of the biological processes that drive disease progression.
- *Diseasome*: Combined set of all known disorder/disease gene associations that results from linking the Human Disease Network (HDN) and the Disease Gene Network (DGN).
- *Disease Gene Network (DGN)*: a scale-free network whose nodes (genes) are connected if they are involved in the same disease.
- *Emerging properties*: Functional characteristics of a complex system that cannot be explained by any given individual component (node) of the network but by the existence of the network itself.
- *Genotype*: inherited genetic instructions of an organism, cell, or individual, whether they are expressed or not.
- *Hub*: node with a large number of links.
- *Human Disease Network (HDN)*: a scale-free network whose nodes (diseases) are connected if there is at least one gene that has been implicated in both.
- *Human Metabolic Network (HMN)*: a scale-free network whose nodes (diseases) are connected if mutated enzymes associated with them catalyze adjacent metabolic reactions.
- *Immune cartography*: disease trajectories derived from riboleukograms to quantitatively track the course of immune evolution.
- *Link*: connector between nodes. Also often referred to as “edges.”
- *Network*: collection of vertices (or “nodes”) and edges (or links) that connect pairs of vertices.
- *Node*: core element of a network. Also often referred to as “vertices.”
- *Phenotype*: any observable physical or biochemical quality of an organism, resulting from the random interaction between the genotype and the environment.
- *Phenotypic Disease Network (PDN)*: A network approach to the dynamic (this is, changing) nature of clinical presentation of diseases.
- *P4 medicine*: a proposed new form of medical practice that combines Personalized, Predictive, Preventive, and Participatory elements.
- *Riboleukogram*: transcriptional profiles of circulating leukocytes.
- *Scale-free networks*: a particular type of network characterized by the presence of few nodes (elements of the network) that have many links (hubs), whereas most nodes have few links.
- *System*: set of interdependent components that form an integrated whole.
- *Systems biology*: scientific discipline that integrates and models high-throughput data within and between the different levels of biological complexity (genes, molecules, cells, tissues, organs, entire body, and even society and environment).
- *Trait*: a distinguishing feature of a given disease.



Revisión

Medicina P4: el futuro a la vuelta de la esquina

Patricia Sobradillo^{a,b,c,*}, Francisco Pozo^{a,d} y Álgvar Agustí^{a,b,c,e}

^a Ciber en Enfermedades Respiratorias (CIBERES), Barcelona, España

^b Instituto del Tórax, Hospital Clinic, Universidad de Barcelona, España

^c Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, España

^d Hospital 12 de Octubre, Madrid, España

^e Fundación Caubet Címera, Mallorca, España

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 17 de agosto de 2010

Aceptado el 4 de septiembre de 2010

Palabras clave:

Biología de sistemas

Genética

Investigación

Redes libres de escala

Sistemas complejos

Keywords:

Complex systems

Human genetics

Investigation

Scale free networks

Systems biology

R E S U M E N

La práctica médica tradicional ha sido "reactiva" (el médico interviene cuando hay enfermedad). Los avances teóricos (redes libres de escala y sistemas complejos), tecnológicos (tecnologías "ómicas" de alta eficiencia) y conceptuales (biología de sistemas) habidos en la última década, permiten anticipar la transición hacia una medicina "anticipatoria", centrada en la salud (no en la enfermedad). Esta revisión establece las bases conceptuales fundamentales y discute los principales aspectos de esta nueva medicina, denominada "Medicina P4" por ser personalizada, predictiva, preventiva y participatoria.

© 2010 SEPAR. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

P4 Medicine: the Future Around the Corner

A B S T R A C T

Traditional medical practice has been "reactive" (doctor takes part when disease appears). The theoretical (scale free networks and complex systems), technological (high efficiency "omic" technologies) and conceptual (biology systems) advances throughout the last decade, allow us to anticipate the transition to an "anticipatory" medicine, based on health (not on disease). This review establishes the conceptual bases and discusses the principal aspects of this new medicine, known as "P4 Medicine" standing for personalized, predictive, preventive and participatory.

© 2010 SEPAR. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción

La práctica médica se encuentra al borde de un cambio trascendental. En los próximos años pasará progresivamente, de ser, una medicina reactiva, basada en la enfermedad, a una medicina personalizada, predictiva, preventiva y participatoria (Medicina P4) centrada en la salud. Este cambio será posible gracias a los avances alcanzados en el ámbito de la ciencia básica (por ejemplo, secuenciación completa del genoma humano)¹, el desarrollo de herramientas informáticas (por ejemplo, Internet) y de imagen (TAC, RMN, PET), y el uso de conceptos de ingeniería-física (como

las redes libres de escala y los sistemas complejos). Esta revisión discute este nuevo paradigma. Para ello, se estructura en cuatro apartados que: 1) sitúan en una perspectiva histórica la evolución de la investigación biomédica; 2) presentan conceptos básicos sobre redes libres de escala y sistemas complejos necesarios para 3) entender las implicaciones de la biología de sistemas en la salud y la enfermedad humanas; y, finalmente, 4) discuten los requisitos y los potenciales riesgos y beneficios de la Medicina P4.

Perspectiva histórica de la investigación médica

Debido a la enorme complejidad de la biología humana, la investigación médica ha obedecido históricamente a una estrategia *reduccionista*, que pretende explicar fenómenos complejos definiendo las propiedades funcionales de los elementos individuales

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: psobradillo@ciberes.org (P. Sobradillo).

que componen el sistema. Así, su foco de investigación pasó progresivamente desde el organismo en su conjunto (anatomía), al órgano (fisiología), la célula (biología celular) y, más recientemente, las moléculas (genes, proteínas, lípidos y metabolitos; biología molecular). Esta estrategia reduccionista asume que el mundo que nos rodea puede ser comprendido en términos de las propiedades de sus partes constituyentes; en descomponer la Naturaleza en sus partes y leyes más simples. Se podría definir este enfoque como "divide y vencerás" y se basa en asumir que los problemas complejos se pueden resolver dividiéndolos en problemas más pequeños y simples, y por tanto más tratables. El reduccionismo domina la Medicina y afecta a nuestra forma de diagnosticar, tratar y prevenir las enfermedades. Nuestra inclinación natural es la de aislar el factor individual responsable del comportamiento observado. De hecho, el nacimiento de las propias especialidades médicas es fruto de esta estrategia reduccionista.

Hay que admitir que esta estrategia ha sido extraordinariamente exitosa. No sólo ha permitido llegar a conocer la naturaleza íntima de la estructura celular y molecular de la biología humana, sino que ha resultado en un avance espectacular de la práctica clínica en todas sus especialidades. Sin embargo, el reduccionismo tiene un límite: no es capaz de explicar todos los fenómenos, especialmente aquellos que involucran más de una causa y requieren el funcionamiento coordinado de diversas estructuras (sistemas). Cada vez es más evidente que una función biológica sólo raramente se puede atribuir a una molécula individual. En cambio, la mayoría de los sistemas biológicos, tanto en la salud como en la enfermedad, surgen de interacciones complejas entre los numerosos componentes de la célula, como proteínas, ADN, ARN y pequeñas moléculas². La investigación biológica de los últimos 40 años ha revelado la naturaleza y profundidad de la complejidad de los sistemas biológicos. El mayor reto de la biología del siglo XXI es hacer frente a esta complejidad³. Es evidente que esta complejidad no se puede entender estudiando genes y proteínas de forma aislada e individual. De hecho, los sistemas biológicos deben estudiarse como un todo integrado⁴.

Como alternativa al enfoque reduccionista surge la perspectiva basada en el "sistema", entendido como un conjunto de elementos individuales que posee propiedades "emergentes" no atribuibles a ninguno de ellos por separado. Un ejemplo de "sistema" es un avión. La "propiedad emergente" que caracteriza al avión es su capacidad de volar, pero esta capacidad no depende de ninguno de sus elementos por separado (alas, motores, pilotos, etc.), sino del funcionamiento "integrado" de todos ellos. En otras palabras, el nuevo enfoque admite que el bosque no puede entenderse estudiando los árboles de forma individual.

La Biología de Sistemas es un nuevo campo de investigación interdisciplinaria en el que las interacciones de los elementos, internos y externos, que influyen en el proceso biológico se formulan con expresiones matemáticas. La biología de sistemas fue concebida para abordar de forma cuantitativa y modelizada la complejidad observada en los sistemas biológicos. Este enfoque "holístico" o "global" permite comprender el funcionamiento de los sistemas (procesos) biológicos y profundizar en la investigación de cómo sus interacciones tanto internas como con otros sistemas conllevan la aparición de nuevas propiedades emergentes. Prácticamente cualquier proceso biológico puede ser objeto de estudio a partir de esta estrategia de biología de sistemas, como por ejemplo, el crecimiento de una célula, la interacción entre dos bacterias o la circulación sanguínea en un organismo. Para desarrollar esta estrategia es necesario incorporar conocimientos aportados por la ingeniería de sistemas que comenzó con los "cybernetics" de Norbert Wiener en 1948 y la "Teoría general de Sistemas" de Ludwig von Bertalanffy en 1969. Los campos en desarrollo de la teoría del caos, la dinámica no lineal y la ciencia de sistemas complejos, junto con la ciencia computacional, las matemáticas y la física, también

han contribuido al armamento analítico utilizado para el análisis de sistemas. A continuación se describen brevemente las principales características de los sistemas complejos y las redes libres de escala.

Sistemas complejos y redes libres de escala

Un Sistema Complejo es un conjunto de elementos *interconectados* cuyos vínculos contienen información adicional y oculta al observador y de cuya interacción surgen propiedades nuevas (emergentes) que no pueden explicarse a partir de las propiedades de cada uno de los elementos aislados. La célula es un ejemplo típico de sistema complejo, ya que está compuesta por muchos elementos individuales (ribosomas, mitocondrias, núcleo, membrana, retículo endoplasmático, proteínas, ADN, ARN, etc.), cada uno de los cuales se encarga de realizar una función específica. Estos elementos responden de forma no lineal ante perturbaciones externas. Por ejemplo, algunas veces una mutación en el ADN no tiene ningún efecto en la supervivencia de la célula, mientras que otras veces una sola mutación puede ser fatal². Además, la célula presenta propiedades emergentes que no pueden explicarse en términos de las propiedades de sus elementos individuales.

El comportamiento de la mayoría de los sistemas complejos, desde la célula hasta Internet, surge a partir de la actividad orquestada de muchos componentes que interactúan entre ellos por medio de interacciones pareadas. Así, los componentes de un sistema (o red) se pueden representar como una serie de nodos (o vértices, o links) que están conectados entre ellos por enlaces (o aristas), en el que cada enlace representa una interacción entre dos componentes. Los nodos y los enlaces juntos forman una red, o en lenguaje matemático más formal, un grafo⁵.

En la naturaleza se pueden encontrar diversos tipos de redes, en función del número y tipo de nodos y enlaces. Por ejemplo, en una red social los nodos son las personas y las conexiones pueden ser los lazos de amistad que existen entre ellas: dos personas están conectadas si son amigos. Otros ejemplos de red incluyen las enfermedades (conectadas por genes o proteínas compartidos), la economía (bancos conectados por inversiones compartidas), Internet, la red eléctrica, y muchas más. De hecho, lo raro es no encontrar una red que dé soporte a la gran mayoría de actividades, biológicas o no, en el mundo.

Tradicionalmente, para estudiar las propiedades de las redes se ha empleado la teoría de grafos. Esta teoría permite: a) reconocer links e identificar *hubs* (es decir, nodos con muchos links); b) ilustrar la estructura del conjunto de la red y de sus posibles subconjuntos; c) profundizar en la naturaleza de las relaciones entre los elementos de la red; d) aclarar las reglas que las gobiernan, y e) permitir establecer nuevos marcos (globales) de trabajo.

Tal vez la propiedad más importante que caracteriza la estructura de una red compleja es la función de distribución de links $P(k)$, que informa sobre la probabilidad de que un nodo escogido al azar tenga k conexiones⁶. Se han descrito dos tipos fundamentales de distribuciones $P(k)$: Poisson (normal) y libre de escala (fig. 1). Las primeras son importantes principalmente por razones históricas, ya que dichas redes fueron las primeras que se analizaron matemáticamente. Este análisis lo llevaron a cabo los matemáticos húngaros Paul Erdős (1913-1996) y Alfréd Rényi (1921-1970) en la década de los 50. En las redes de Poisson todos los nodos tienen más o menos el mismo número de conexiones, es decir, las conexiones en una red de Poisson están distribuidas homogéneamente entre sus nodos. Por el contrario, la característica más importante de las redes libres de escala es su alta heterogeneidad, ya que existen nodos con muy pocas conexiones, nodos medianamente conectados y nodos extremadamente conectados (fig. 1). Los nodos altamente conectados se denominan núcleos o centros de la

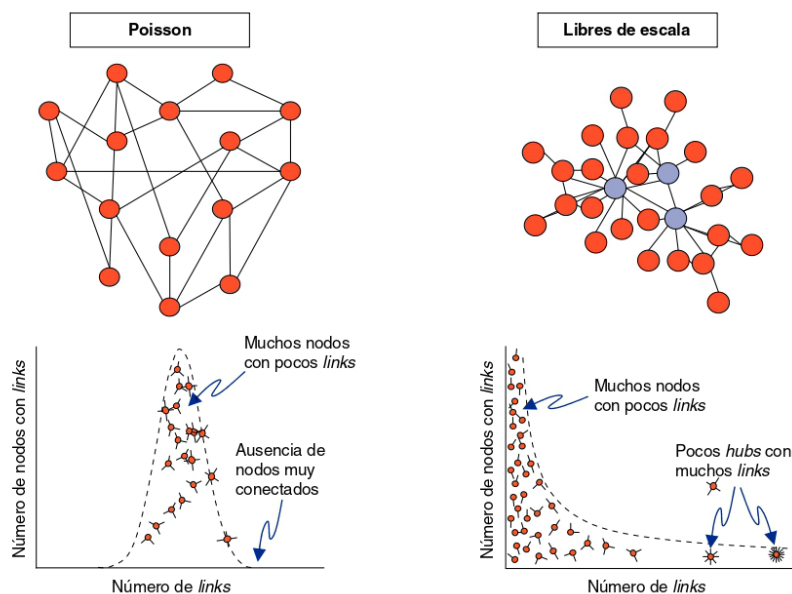


Figura 1. Distribución de Poisson o normal y distribución libre de escala. Cortesía del Dr. M. Perpiñá.

red (*hubs*)³. Más allá de estas características lo realmente sorprendente es la ubicuidad de las redes libres de escala, que aparecen en ámbitos tan diversos como las pequeñas redes metabólicas dentro de la célula, hasta las grandes redes informáticas como la red Internet, pasando por las redes bancarias, la distribución de gas y electricidad o las redes terroristas.

Otra característica fundamental de los sistemas complejos es su robustez, término que se refiere a la capacidad del sistema de responder a los cambios en las condiciones externas o en la organización interna sin afectar a su comportamiento normal. En este sentido, es importante señalar que las redes libres de escala son asombrosamente robustas frente a fallos accidentales. Esto se debe a que un fallo aleatorio afecta principalmente a los nodos de pequeño tamaño, cuya ausencia no perturba la integridad de la red. Por otro lado esta dependencia en los *hubs* provoca el efecto conocido como "vulnerabilidad al ataque", que implica que la eliminación de unos pocos *hubs* clave escinde el sistema en racimos aislados de nodos pequeños^{6,7}. Un claro ejemplo de esta característica de las redes libres de escala es la red de aeropuertos: existen muchos aeropuertos pequeños, con pocas conexiones y pocos aeropuertos grandes que están muy conectados (por ejemplo, el aeropuerto de Heathrow). La reciente crisis del tráfico aéreo en Europa debido a la nube de cenizas del volcán de Islandia se debió, al menos inicialmente, a que obligó a cerrar Heathrow, lo que ocasionó la caída de toda la red de aeropuertos en Europa. Si la nube volcánica hubiese afectado a un aeropuerto *no-hub*, Europa hubiese seguido volando. Este concepto puede aplicarse fácilmente a las redes moleculares y celulares que subyacen a la salud y la enfermedad humanas.

Biología de sistemas, salud y enfermedad

El análisis de redes complejas se ha aplicado recientemente y de forma satisfactoria a la salud y la enfermedad humana, en ámbitos tan diversos como la caracterización de epidemias^{8,9} y las formas de

controlarlas^{10,11}, o la identificación de los mecanismos que influyen en la propensión metastásica y la letalidad del cáncer¹². Un ejemplo aplicable a la medicina respiratoria fue el estudio de la respuesta alérgica en un modelo de asma experimental de Lu et al¹³, basado en que el asma es una enfermedad poligénica en la que existe interacción de muchos genes¹⁴. Para ello, los autores crearon una red de interacciones moleculares utilizando la base de datos del Biomolecular Object Network Databank sobre la que superpusieron los cambios observados en la expresión de los genes que cambiaban con la intervención experimental (exposición a ovoalbúmina). Un análisis topológico de los genes expresados en estas condiciones experimentales permitió determinar una relación inversa entre el cambio de expresión y la conectividad del gen. Es decir, genes con un cambio alto en el nivel de expresión se situaban más frecuentemente en la periferia de la red (baja conectividad), mientras que los *hubs* (nodos con alta conectividad) y *superhubs* (nodos que unen *hubs*) tendían a ser menos reactivos a la intervención experimental. Estas observaciones tienen implicaciones metodológicas y biológicas. En primer lugar, sugieren que genes con funciones biológicas importantes podrían no ser detectados si no se emplea este tipo de estrategia de investigación. Por otra parte, indican que, al menos algunas respuestas biológicas, como la respuesta alérgica inmune, son mediadas por cambios en nodos con baja conectividad.

La metodología derivada de las redes libres de escala y sistemas complejos descritos anteriormente también se ha utilizado para evaluar el papel de los factores ambientales ("sociales") en las enfermedades. Por ejemplo, Christakis y Fowler, en un artículo publicado en el *New England Journal of Medicine*¹⁵, estudiaron los efectos de las redes sociales sobre la prevalencia de obesidad. Para ello, construyeron una red a partir de los participantes del estudio Framingham, estableciendo lazos de unión entre amigos, vecinos, esposos y familiares. Observaron que el riesgo de desarrollar obesidad aumentaba un 40% si un individuo tenía un hermano obeso, pero era del 171% si dicho individuo tenía un amigo obeso, sugiriendo que esta red social tenía un peso en el riesgo de ser obeso

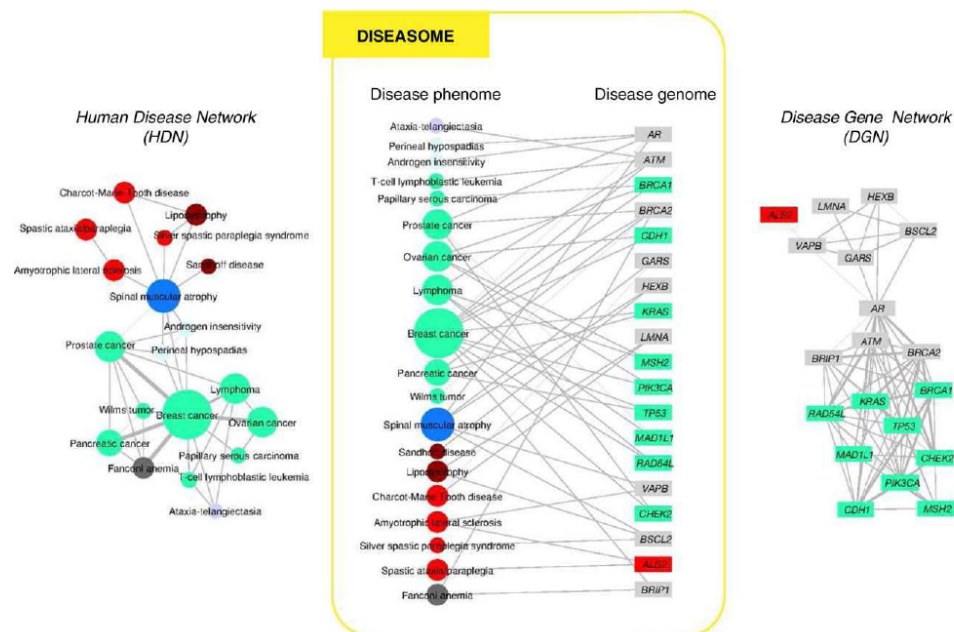


Figura 2. Construcción del "Diseasoma". Los círculos corresponden a enfermedades y los rectángulos a genes. Una enfermedad y un gen están unidos si mutaciones en dicho gen provocan dicha enfermedad. El tamaño del círculo es proporcional al número de genes que participan en dicha enfermedad. DGN: dos genes están conectados si están implicados en la misma enfermedad; HDN: dos enfermedades están conectadas si el mismo gen está implicado en ambas. Fuente: Goh K et al¹⁹. ©2007 by National Academy of Sciences.

superior a la carga genética de los individuos. Los mismos autores también estudiaron, en la misma cohorte, la dinámica del cese del hábito tabáquico a lo largo de 29 años (de 1971 a 2000)¹⁶. Observaron que grupos enteros de gente conectada abandonaban el tabaco al mismo tiempo y que los fumadores aparecían progresivamente en la periferia de la red.

Estos y otros estudios han puesto de manifiesto un hecho frecuentemente ignorado: las redes dominan todos los aspectos de la salud y la enfermedad humanas. Para entender los mecanismos de enfermedad no es suficiente con conocer la lista de "genes de enfermedad"; se debe disponer del diagrama (mapa) de conexiones de los componentes celulares que son influenciados por estos genes y por los productos de dichos genes. Dada la situación cambiante (dinámica) de la salud/enfermedad humana, no es suficiente con disponer únicamente de una "foto" del sistema; se necesita un "vídeo" que capture la evolución de la complejidad biológica en condiciones normales (salud) y anormales (enfermedad), tanto antes como después de una intervención terapéutica.

La existencia de alteraciones específicas en las redes moleculares y genéticas suscita la posibilidad de que las enfermedades no sean tan independientes entre sí como generalmente se consideran. Existe un gran número de enfermedades que, a pesar de tener formas de expresión clínica diferentes, forman parte de una misma red^{17,18}. De hecho, utilizando esta aproximación se ha descrito el "diseasoma" (fig. 2) como la red de enfermedades humanas que comparten elementos moleculares y genéticos comunes¹⁹. Esta aproximación ha revelado que existen muchas conexiones entre desórdenes individuales o agrupaciones de desórdenes, sugiriendo que el origen genético de la mayoría de enfermedades, en cierta medida, es compartido con otras enfermedades. Cáncer y enfermedades neurológicas representan las enfermedades con más

conexiones, contrastando con las metabólicas y esqueléticas, entre otras, que presentan heterogeneidad genética baja y están menos conectadas (fig. 2). De los 1.777 genes estudiados, 1.377 están conectados con otros genes y, aunque el número de genes compartidos por varias enfermedades decrece al aumentar el número de enfermedades, algunos otros genes, como el TP53 o el PAX6, se asocian hasta con 10 enfermedades, representando los mayores *hubs* en la red. Estas observaciones sugieren que la mayoría de genes asociados a enfermedad no son esenciales. En cambio, genes esenciales cuyos efectos frecuentemente son letales in útero o en la vida extrauterina temprana, tienden a codificar *hubs* y ocupar una posición central en la red. Finalmente, los autores observaron que las proteínas que están asociadas con la misma enfermedad muestran una tendencia diez veces mayor de interactuar entre ellas que aquellas que no están asociadas con la misma enfermedad. En conjunto, todas estas observaciones apoyan la existencia de "módulos" específicos para enfermedades concretas.

La clasificación contemporánea de las enfermedades se basa, fundamentalmente, en su presentación clínica (fenotipos). Loscalzo et al²⁰ proponen un nuevo abordaje en la clasificación de las enfermedades que se basa en cuatro redes diferentes que interactúan entre sí: 1) Anormalidad molecular principal (*genoma o proteoma primario*) asociada al fenotipo principal; 2) genes o proteínas modificadores del fenotipo principal (*genoma o proteoma secundario*); 3) polimorfismos o haplotipos (*fenotipo intermedio*) que influyen cada respuesta genética al estrés (inflamación, apoptosis, proliferación, reparación), y 4) determinantes ambientales. A partir de la constatación de la relevancia patofisiológica de estas cuatro redes, pueden plantearse nuevas alternativas para optimizar el abordaje terapéutico a la enfermedad²¹: para identificar nuevas dianas terapéuticas (por ejemplo, el receptor androgénico en el cáncer de próstata¹²),

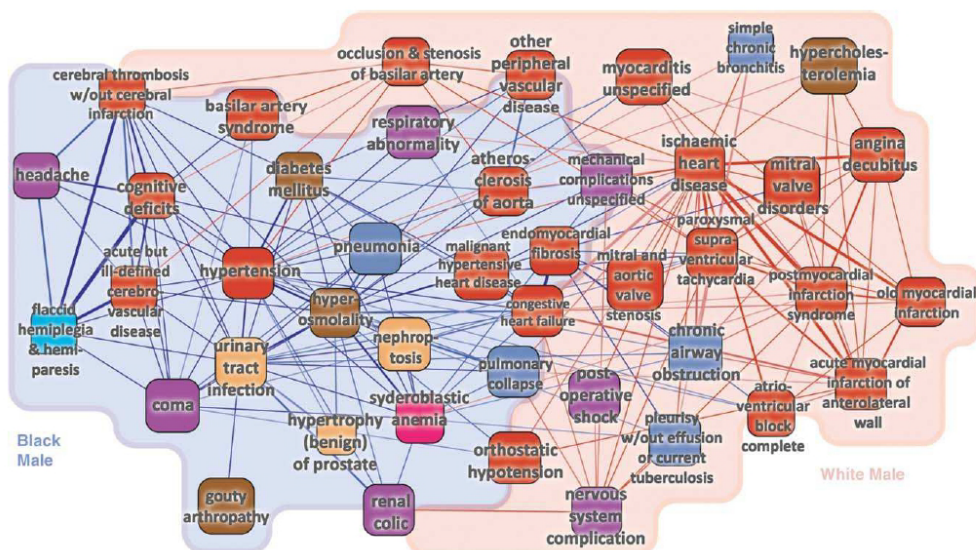


Figura 3. Phenotypic Disease Network. Diferencias en raza y sexo. Los nodos identifican enfermedades. El color del nodo representa una categoría ICD9; enlaces azules indican comorbilidades que son más fuertes entre hombres de raza negra, mientras que los enlaces rojos indican comorbilidades que son más fuertes entre hombres de raza blanca. Para más información, consultar texto. Fuente: Hidalgo CA et al²⁴.

para determinar la dosificación apropiada de un fármaco, basado en su perfil metabólico²², y para establecer las causas de resistencia a tratamientos o para mejorar la toxicidad de drogas²³.

Hidalgo et al²⁴ han demostrado que la progresión de la enfermedad (el "vídeo" discutido anteriormente) también puede ser representada y estudiada a partir de la estrategia basada en redes. Estos autores han generado la red fenotípica de enfermedades (Phenotypic Disease Network, PDN) (fig. 3) a partir de la revisión de los registros electrónicos clínicos de más de 30 millones de pacientes (Medicare). El estudio de la PDN muestra que: 1) los pacientes desarrollan enfermedades que están próximas en la red; 2) la progresión de la enfermedad a lo largo de los enlaces de la red es diferente entre pacientes de distinto género y de distintas etnias; 3) pacientes diagnosticados de enfermedades que tienen muchas conexiones en la PDN tienden a fallecer antes que aquellos afectados por enfermedades menos conectadas, y 4) enfermedades que tienden a ser precedidas por otras en la PDN tienden a estar más conectadas que enfermedades que preceden a otras, y están asociadas con mayor tasa de mortalidad²⁴.

Medicina P4

El término "Medicina P4" (personalizada, predictiva, preventiva y participativa) se debe a David Galas y Leroy Hood, del Instituto de Biología de Sistemas de Seattle^{4,25}. En dicho instituto se estudia la complejidad biológica a partir de tres premisas fundamentales: 1) existen dos tipos de información biológica: la información digital del genoma y la información ambiental, externa al genoma, que modifica dicha información digital; 2) la información biológica es capturada, procesada, integrada y traspasada por medio de redes biológicas -ARN, proteínas, regiones controladoras de los genes y pequeñas moléculas- a los sistemas moleculares que ejecutan las funciones vitales, y 3) la información biológica se codifica en una jerarquía multiescala: ADNA, ARN, proteínas, interacciones, redes

biológicas, tejidos tisulares y órganos, individuos y, finalmente, ecológicas. Es importante resaltar que el entorno afecta cada uno de los niveles de esta jerarquía y modula la obtención de la información digital desde el genoma.

Galas y Hood predicen que en los próximos 5 a 20 años, los avances tecnológicos y computacionales permitirán recoger, analizar y utilizar clínicamente toda esta complejidad y trasladarla a la atención sanitaria de la población (Medicina P4). En este contexto, se propone que la Medicina P4 será "personalizada" porque se basará en la información genética de cada individuo; será "predictiva" porque esta información personalizada permitirá determinar el riesgo de padecer determinadas enfermedades en cada individuo; será "preventiva" porque, a partir de la predicción de ese riesgo, se podrán establecer medidas profilácticas (bien sean de estilo de vida, bien terapéuticas) que lo disminuyan; y, finalmente, será "participativa" porque muchas de estas intervenciones profilácticas requerirán ineludiblemente la participación del paciente, con lo que desaparecerá uno de los aspectos más tradicionales (y posiblemente menos positivos) de la práctica clínica: el paternalismo médico-paciente.

Teóricamente, la Medicina P4 debe comportar un número importante de beneficios, tanto para el paciente como para el sistema sanitario, entre los que según Galas y Hood destacan²⁵: 1) la posibilidad de adquirir y procesar billones de datos de cada individuo en particular; 2) la obtención y análisis de información longitudinal en cada individuo, lo que puede permitir la detección temprana de la enfermedad y la monitorización de la efectividad terapéutica de los tratamientos instaurados; 3) la estratificación de los pacientes en grupos de enfermedades en las que se define con mayor precisión el proceso patológico específico involucrado (fenotipos clínicos)²⁶, lo que puede permitir el desarrollo de terapias alternativas específicamente dirigidas a estos fenotipos, consiguiendo, por tanto, mayores tasas de éxito, y 4) facilitación de todo el proceso de desarrollo de nuevos fármacos mediante la identificación de nuevas dianas terapéuticas (*hubs*), reducción de las

reacciones adversas a fármacos (genoma humano), reducción del tiempo, coste y tasa de fallos de los ensayos terapéuticos (ensayos clínicos *in silico*).

Para que todo ello sea posible, aunque la ciencia y la tecnología han avanzado enormemente en la última década, todavía serán necesarios nuevos avances, entre los que destacan los siguientes²⁵: 1) desarrollo de métodos para determinar las estructuras de genomas individualizados (secuenciación del genoma personalizado); 2) técnicas microfluídicas, análisis de células individuales e imagen molecular; 3) identificación y validación de proteínas órgano específicas, micro ARN y otros biomarcadores moleculares, y 4) nuevos métodos matemáticos y computacionales como las redes dinámicas que permitan el estudio de las perturbaciones que producen los tratamientos en las redes biológicas.

Además, serán igualmente necesarios cambios significativos en la educación de pacientes y profesionales sanitarios sobre la Medicina P4. Los primeros deben estar bien informados sobre el significado de la información disponible y sus opciones personales, y los segundos deberán entender no solo los aspectos biológicos más complejos derivados de todo este nuevo abordaje de biomedicina de sistemas, sino también las implicaciones legales y éticas que se derivan de todo ello. Finalmente, todo el sector de la industria de la salud (desde compañías farmacéuticas a proveedores de atención sanitaria, compañías de seguros y diagnósticos médicos, etc.) también tendrá que transformarse en los próximos años favoreciendo, posiblemente, la creación de alianzas estratégicas globales entre la academia, la industria y la administración que faciliten y catalicen la llegada y desarrollo de la Medicina P4.

Conclusiones

Los avances científicos (genómica y proteómica, fundamentalmente) y tecnológicos (bioinformática y técnicas de imagen, especialmente) ocurridos en las últimas décadas, junto con el nacimiento de la nueva ciencia de redes y sistemas complejos, permiten adelantar el nacimiento y desarrollo de una nueva forma de practicar la medicina: la Medicina P4. El texto que antecedente justifica esta posibilidad y discute sus principales ventajas (y limitaciones actuales). Para aquellos lectores escépticos que consideren que todo lo anterior está todavía muy lejos y se circunscribe, casi, al terreno de la ciencia ficción, los autores quisieran recordar que hace apenas 15 años ninguno de nosotros tenía un teléfono móvil o acceso a Internet. Han pasado apenas unos pocos años y es difícil imaginar cómo podríamos realizar muchas de las actividades que realizamos en nuestro trabajo diario sin ninguno de ellos. Solo se precisa mirar alto y lejos para, al menos, aceptar la posibilidad de que el futuro (en forma de Medicina P4) está a la vuelta de la esquina!

Financiación

Subvencionado, en parte, por Beca Mutual Médica 2009, Beca SEPAR 2010.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

- Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, et al. The sequence of the human genome. *Science*. 2001;291:1304-51.
- Hartwell LH, Hopfield JJ, Leibler S, Murray AW. From molecular to modular cell biology. *Nature*. 1999;402 Suppl:C47-52.
- Barabasi AL, Oltvai ZN. Network biology: understanding the cell's functional organization. *Nat Rev Genet*. 2004;5:101-13.
- Hood L, Rowen L, Galas DJ, Aitchison JD. Systems biology at the Institute for Systems Biology. *Brief Funct Genomic Proteomic*. 2008;7:239-48.
- Bollobás B. *Graph. Theory: an Introductory Course*. New York: Springer Verlag; 1979.
- Albert R, Barabasi AL. Statistical mechanics of complex networks. *Rev Mod Phys*. 2002;74:47-97.
- Barabasi AL. *Linked: How Everything Is Connected to Everything Else and What it Means for Business, Science, and Everyday Life*. Perseus Books, 2002.
- Pastor-Satorras R, Vespignani A. Epidemic spreading in scale-free networks. *Phys Rev Lett*. 2001;86:3200-3.
- Eubank S, Guclu H, Kumar VS, Marathe MV, Srinivasan A, Toroczkai Z, et al. Modelling disease outbreaks in realistic urban social networks. *Nature*. 2004;429:180-4.
- Pastor-Satorras R, Vespignani A. Immunization of complex networks. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys*. 2002;65(3 Pt 2A):036104.
- Dezso Z, Barabasi AL. Halting viruses in scale-free networks. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys*. 2002;65(5 Pt 2):055103.
- Ergun A, Lawrence CA, Kohanski MA, Brennan TA, Collins JJ. A network biology approach to prostate cancer. *Mol Syst Biol*. 2007;3:82.
- Lu X, Jain VV, Finn PW, Perkins DL. Hubs in biological interaction networks exhibit low changes in expression in experimental asthma. *Mol Syst Biol*. 2007;3:98.
- Alexis NE, Lay JC, Almond M, Peden DB. Inhalation of low-dose endotoxin favors local T(H)2 response and primes airway phagocytes in vivo. *J Allergy Clin Immunol*. 2004;114:1325-31.
- Christakis NA, Fowler JH. The spread of obesity in a large social network over 32 years. *N Engl J Med*. 2007;357:370-9.
- Christakis NA, Fowler JH. The collective dynamics of smoking in a large social network. *N Engl J Med*. 2008;358:2249-58.
- Barabasi AL. Network medicine—from obesity to the “diseaseome”. *N Engl J Med*. 2007;357:404-7.
- Lim J, Hao T, Shaw C, Patel AJ, Szabo G, Rual JF, et al. A protein-protein interaction network for human inherited ataxias and disorders of Purkinje cell degeneration. *Cell*. 2006;125:801-14.
- Goh KI, Cusick ME, Valle D, Childs B, Vidal M, Barabasi AL. The human disease network. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104:8685-90.
- Loscalzo J, Kohane I, Barabasi AL. Human disease classification in the postgenomic era: a complex systems approach to human pathobiology. *Mol Syst Biol*. 2007;3:124.
- Morel NM, Holland JM, van der Greef J, Marple EW, Clish C, Loscalzo J, et al. Primer on medical genomics. Part XIV: Introduction to systems biology—a new approach to understanding disease and treatment. *Mayo Clin Proc*. 2004;79:651-8.
- Nicholson JK. Global systems biology, personalized medicine and molecular epidemiology. *Mol Syst Biol*. 2006;2:52.
- Kitano H. A robustness-based approach to systems-oriented drug design. *Nat Rev Drug Discov*. 2007;6:202-10.
- Hidalgo CA, Blumm N, Barabasi AL, Christakis NA. A dynamic network approach for the study of human phenotypes. *PLoS Comput Biol*. 2009;5:e1000353.
- Galas DJ, Hood L. Systems Biology and Emerging Technologies Will Catalyze the Transition from Reactive Medicine to Predictive, Personalized, Preventive and Participatory (P4) Medicine. *IBC*. 2009;1:1-4.
- Han MK, Agusti A, Calverley PM, Celli BR, Criner G, Curtis JL, et al. Chronic Obstructive Pulmonary Disease Phenotypes: The Future of COPD. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010;182:598-604.



A simple algorithm for the identification of clinical COPD phenotypes

Pierre-Régis Burgel^{1,2}, Jean-Louis Paillasseur³, Wim Janssens⁴, Jacques Piquet⁵, Gerben ter Riet⁶, Judith Garcia-Aymerich⁷, Borja Cosío⁸, Per Bakke⁹, Milo A. Puhān¹⁰, Arnulf Langhammer¹¹, Inmaculada Alfageme¹², Pere Almagro¹³, Julio Ancochea¹⁴, Bartolome R. Celli¹⁵, Ciro Casanova¹⁶, Juan P. de-Torres¹⁷, Marc Decramer⁴, Andrés Echazarreta¹⁸, Cristobal Esteban¹⁹, Rosa Mar Gomez Punter²⁰, MeiLan K. Han²¹, Ane Johannessen²², Bernhard Kaiser²³, Bernd Lamprecht²⁴, Peter Lange²⁵, Linda Leivseth²⁶, Jose M. Marin²⁷, Francis Martin²⁸, Pablo Martinez-Cambor^{29,30}, Marc Miravittles³¹, Toru Oga³², Ana Sofia Ramirez³³, Don D. Sin³⁴, Patricia Sobradillo³⁵, Juan J. Soler-Cataluña³⁶, Alice M. Turner³⁷, Francisco Javier Verdu Rivera³⁸, Joan B. Soriano³⁹ and Nicolas Roche^{1,2} on behalf of Initiatives BPCO, EABPCO, Leuven and 3CIA study groups

@ERSpublications

An algorithm integrating respiratory characteristics and comorbidities identifies clinical COPD phenotypes <http://ow.ly/eSRp30fjPG5>

Cite this article as: Burgel P-R, Paillasseur J-L, Janssens W, *et al.* A simple algorithm for the identification of clinical COPD phenotypes. *Eur Respir J* 2017; 50: 1701034 [<https://doi.org/10.1183/13993003.01034-2017>].

ABSTRACT This study aimed to identify simple rules for allocating chronic obstructive pulmonary disease (COPD) patients to clinical phenotypes identified by cluster analyses.

Data from 2409 COPD patients of French/Belgian COPD cohorts were analysed using cluster analysis resulting in the identification of subgroups, for which clinical relevance was determined by comparing 3-year all-cause mortality. Classification and regression trees (CARTs) were used to develop an algorithm for allocating patients to these subgroups. This algorithm was tested in 3651 patients from the COPD Cohorts Collaborative International Assessment (3CIA) initiative.

Cluster analysis identified five subgroups of COPD patients with different clinical characteristics (especially regarding severity of respiratory disease and the presence of cardiovascular comorbidities and diabetes). The CART-based algorithm indicated that the variables relevant for patient grouping differed markedly between patients with isolated respiratory disease (FEV₁, dyspnoea grade) and those with multi-morbidity (dyspnoea grade, age, FEV₁ and body mass index). Application of this algorithm to the 3CIA cohorts confirmed that it identified subgroups of patients with different clinical characteristics, mortality rates (median, from 4% to 27%) and age at death (median, from 68 to 76 years).

A simple algorithm, integrating respiratory characteristics and comorbidities, allowed the identification of clinically relevant COPD phenotypes.

This article has supplementary material available from erj.ersjournals.com

Received: May 19 2017 | Accepted after revision: July 28 2017

Copyright ©ERS 2017

Affiliations: ¹University Paris Descartes (EA2511), Sorbonne Paris Cité, Paris, France. ²Dept of Respiratory Medicine, Cochin Hospital, AP-HP, Paris, France. ³Effi-Stat, Paris, France. ⁴Respiratory Division, University Hospital Gasthuisberg, K.U. Leuven, Leuven, Belgium. ⁵Dept of Respiratory Medicine, Le Raincy-Montfermeil Hospital, Montfermeil, France. ⁶Dept General Practice – Academic Medical Center, Amsterdam, The Netherlands. ⁷ISGlobal, Centre for Research in Environmental Epidemiology (CREAL), Universitat Pompeu Fabra (UPF), CIBER Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Barcelona, Spain. ⁸Unidad de Investigación, Servicio de Neumología, Hospital Universitario Son Espases, Palma de Mallorca, Spain. ⁹Dept of Clinical Science, Faculty of Medicine and Dentistry, University of Bergen, Bergen, Norway. ¹⁰Epidemiology, Biostatistics and Prevention Institute (EBPI), University of Zurich, Zurich, Switzerland. ¹¹Dept of Public Health and General Practice, HUNT Research Centre, Norwegian University of Science and Technology, Levanger, Norway. ¹²Universidad de Sevilla, Seville, Spain. ¹³Internal Medicine, Hospital Universitari Mutua de Terrassa, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain. ¹⁴Pneumology Service, La Princesa Institute for Health Research (IP), Hospital Universitario de la Princesa, Madrid, Spain. ¹⁵Brigham and Women's Hospital, Boston, MA, USA. ¹⁶Hospital Nuestra Señora de la Candelaria, Tenerife, Spain. ¹⁷Clinica Universidad de Navarra, Pamplona, Spain. ¹⁸Servicio de Neumología Hospital San Juan de Dios de La Plata, Buenos Aires, Argentina. ¹⁹Hospital Galdakao-Usansolo, Galdakao, Spain. ²⁰Servicio de Neumología, Hospital Universitario La Princesa, Madrid, Spain. ²¹University of Michigan, Ann Arbor, MI, USA. ²²Centre for Clinical Research, Haukeland University Hospital, Bergen, Norway. ²³Dept of Pulmonary Medicine, Paracelsus Medical University Hospital, Salzburg, Austria. ²⁴Dept of Pulmonary Medicine, General Hospital Linz (AKH), Linz, Austria. ²⁵Section of Social Medicine, Dept of Public Health, Copenhagen University, Copenhagen, Denmark. ²⁶Centre for Clinical Documentation and Evaluation, Northern Norway Regional Health Authority, Tromsø, Norway. ²⁷Hospital Universitario Miguel Servet, Zaragoza, Spain. ²⁸Pneumologie, Centre Hospitalier de Compiègne, Compiègne, France. ²⁹Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA), Oviedo, Spain. ³⁰Universidad Autónoma de Chile, San Miguel, Chile. ³¹Pneumology Dept, Hospital Universitario Vall d'Hebron. CIBER de Enfermedades Respiratorias (CIBERES), Barcelona, Spain. ³²Dept of Respiratory Care and Sleep Control Medicine, Graduate School of Medicine, Kyoto University, Kyoto, Japan. ³³Facultad de Medicina UASLP, San Luis Potosí, México. ³⁴James Hogg Research Centre, University of British Columbia; Division of Respiratory Medicine, Dept of Medicine, St Paul's Hospital, Vancouver, Canada. ³⁵Hospital Universitario Araba, Sede Txagorritxu, Vitoria, Spain. ³⁶Servicio de Neumología, Hospital Arnau de Vilanova, Valencia, Spain. ³⁷Queen Elizabeth Hospital Research Laboratories, Birmingham, UK. ³⁸H.U. Son Espases, Palma de Mallorca, Spain. ³⁹Instituto de Investigación Hospital Universitario de la Princesa (IISP), Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain.

Correspondence: Pierre-Régis Burgel, Service de Pneumologie, Hôpital Cochin, 27 Rue du Faubourg St Jacques, 75014 Paris, France. E-mail: pierre-regis.burgel@cch.aphp.fr

Introduction

Airflow limitation is the hallmark of chronic obstructive pulmonary disease (COPD), and forced expiratory volume in 1 s (FEV₁) has long been used as the main criterion for the characterisation of disease severity [1, 2]. Analyses of observational cohorts (e.g. the ECLIPSE cohort) have revealed that COPD patients with similar levels of FEV₁ experience different degrees of disease burden, reflected by dyspnoea levels, exacerbation rates, health-related quality of life (HRQoL) impairment and exercise limitation [3]. Accordingly, the current classification of COPD proposed by the Global initiative for chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) incorporates not only the FEV₁, but also dyspnoea or HRQoL, and previous occurrence of COPD exacerbations and/or hospitalisation [1]. Although this classification is not fully evidence-based, it has the advantage of taking into account some of the clinical heterogeneity of COPD with the aim of predicting future risk and proposing corresponding treatment choices. A limitation of this classification is that it does not account for age, an important determinant of prognosis in patients with COPD [4]. Furthermore, the GOLD classification does not account for comorbidities, which can both be frequent and contribute to the prognosis [5–7].

Several groups have used cluster analyses to explore clinical heterogeneity in cohorts of patients with COPD [8–10]. These studies have identified consistent clinical COPD phenotypes at high risk of mortality, including 1) younger patients with severe respiratory disease, few cardiovascular comorbidities, and poor nutritional status; and 2) older patients with moderate respiratory disease, metabolic and cardiovascular comorbidities, and obesity [11]. They have also identified patients with mild disease and a good prognosis [12, 13]. However, all published studies had limitations related to a relatively small sample size and lack of

Support statement: The analyses reported here were supported by an unrestricted grant from Boehringer Ingelheim France, which played no role in study design, data collection, analysis and interpretation of data, writing of the manuscript nor decision to submit it for publication. The Initiatives BPCO study was supported by an unrestricted grant from Boehringer Ingelheim France and (until 2015) Pfizer. None of the funding sources of the individual trials were involved in any aspect of the 3CIA initiative, including the design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. P. Martínez-Camblor was supported by research grant MTM2011-23204 from the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación (FEDER support included). J. Garcia-Aymerich has a researcher contract from the Instituto de Salud Carlos III (CP05/00118), Ministry of Health, Spain. Funding information for this article has been deposited with the Crossref Funder Registry.

Conflict of interest: Disclosures can be found alongside this article at erj.ersjournals.com

further validation in independent samples [11, 13]. Furthermore, the results of cluster analyses are difficult to translate for use in daily practice, as they provide no tool for individual patient allocation in the identified phenotypes.

In the present study, our aim was to develop and validate an algorithm, based on easily available clinical data, to assign patients with COPD to clinically relevant phenotypes.

Methods

Overall design

Data from three French/Belgian COPD cohorts were used to identify clinical COPD phenotypes using cluster analysis. Classification and Regression Tree (CART) [14] analysis was then used to develop an algorithm to allocate individual COPD patients recruited in these French/Belgian cohorts to specific subgroups. This algorithm was further tested in an independent sample of patients with COPD, using data from the COPD Cohorts Collaborative International Assessment (3CIA) initiative [15].

COPD patient cohorts

The French/Belgian COPD cohorts are composed of three cohorts: the Initiatives BPCO cohort [8], the French College of General Hospital Respiratory Physicians (CPHG) cohort [16] and the Leuven cohort [12]. Patients within these cohorts had a diagnosis of COPD, based on post-bronchodilator FEV₁/FVC < 0.70, and were recruited in a stable state in university hospitals (Initiatives BPCO and Leuven cohorts) [8, 12], or at the time of hospitalisation for COPD exacerbations (CPHG cohort) [16], as previously described. The 3CIA initiative contains pooled individualised data from 22 cohorts of patients with COPD, who were recruited in publicly funded hospitals or in population-based studies [15]. All cohorts were approved by a local Ethics Committee and all subjects provided informed written consent.

Statistical analysis plan

First, COPD patients recruited in the French/Belgian cohorts were classified into subgroups, based on the results of cluster analysis of data obtained at inclusion in the cohorts. The clinical relevance of the identified subgroups was established by examining their association with 3-year all-cause mortality. Next, CARTs were used for the development of an algorithm, assigning COPD patients to the subgroups identified by cluster analysis. The clinical value of this algorithm was examined using 3-year all-cause mortality in the French/Belgian cohorts. Finally, the algorithm was tested for external validation using data from the 3CIA initiative database [15]. Mortality risks among subgroups were analysed using Kaplan–Meier curves and Cox models. The concordance probability estimate was used to evaluate the discriminatory power of classifications for mortality prediction. Data are presented as median (interquartile range, IQR) or n (%). Analyses were performed using SAS 9.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) and Tanagra 1.4 (Lyon, France) software. Additional information on the methods used can be found in the online supplementary material.

Cluster analysis of the French/Belgian COPD cohorts

Variables were selected for inclusion in the cluster analysis, based on their previous association with future risk and prognosis in COPD patients [1, 6], and included age, body mass index (BMI), FEV₁ (% predicted), modified Medical Research Council (mMRC) dyspnoea scale, number of exacerbations in the previous 12 months, and presence/absence of cardiovascular comorbidities (hypertension, coronary artery disease and/or left heart failure) and/or diabetes. Identification of subgroups of patients with COPD associated with survival was achieved using factor analysis for mixed data (FAMD) [17, 18], followed by classification of patients using Ward's agglomerative hierarchical cluster analysis [8, 12]. The clinical relevance of the identified subgroups was examined by comparing their all-cause mortality at 3 years, as previously described [8, 12]. These subgroups (phenotypes) were labelled using Roman numbers.

Development of an algorithm for assigning COPD patients to specific subgroups in the French/Belgian cohorts

The development of an algorithm to assign COPD patients to the subgroups identified by cluster analysis was achieved using CART analysis [14, 19], a non-parametric decision tree learning technique [19]. Variables included in this analysis were those selected for the cluster analysis (see above). Threshold values for these variables were based on those obtained by CART analysis and were slightly modified for improved practicality (see online supplement for a detailed explanation).

External validation of the algorithm

The algorithm established in the French/Belgian cohorts was then tested in an independent group of patients with COPD from the 3CIA database. Patients in this database (n=16332) were considered eligible

for the study if data necessary to apply the algorithm (age, BMI, FEV₁% predicted, mMRC scale, presence/absence of cardiovascular comorbidities and diabetes) and information on vital status at 3 years were available. Patients with appropriate data (n=3651) were classified by the algorithm into the five classes described above (labelled using Arabic digits), and these classes were compared according to their clinical characteristics, all-cause mortality at 3 years and age at death.

Results

Patients and overall study design

The study design is presented in figure 1 and the characteristics of the patients with COPD at inclusion in the French/Belgian cohorts (n=2409 patients) and in the 3CIA database (n=3651 patients) are presented in supplementary table S1. Their 3-year all-cause mortality rates were 30.8% and 11.6%, respectively. Patients included in the French/Belgian cohorts were characterised by older age, more severe airflow limitation and higher rates of cardiovascular comorbidities and/or diabetes. Furthermore, 57% of patients in the French/Belgian cohorts were recruited at the time of hospitalisation for COPD exacerbations (as part of the CPHG cohort) [16].

Cluster analysis of the French/Belgian cohorts

Table 1 shows the five subgroups (labelled I to V) identified in the French/Belgian COPD cohorts using cluster analysis (see online supplementary tables S2–S6 and figure S1). Table 2 summarises the main descriptors of these subgroups, according to increasing rates of 3-year all-cause mortality. Subgroup V (mortality rate 2.5%) was characterised by mild respiratory disease and low rates of comorbidities. Subgroup II (mortality rate 21.8%) was characterised by moderate to severe respiratory disease and low rates of comorbidities. Subgroup III (mortality rate 30.0%) was generally characterised by an older age than that of subgroup II, with a high prevalence of comorbidities and obesity. Subgroup IV (mortality rate 47.0%) was characterised by very severe respiratory disease with low rates of cardiovascular comorbidities

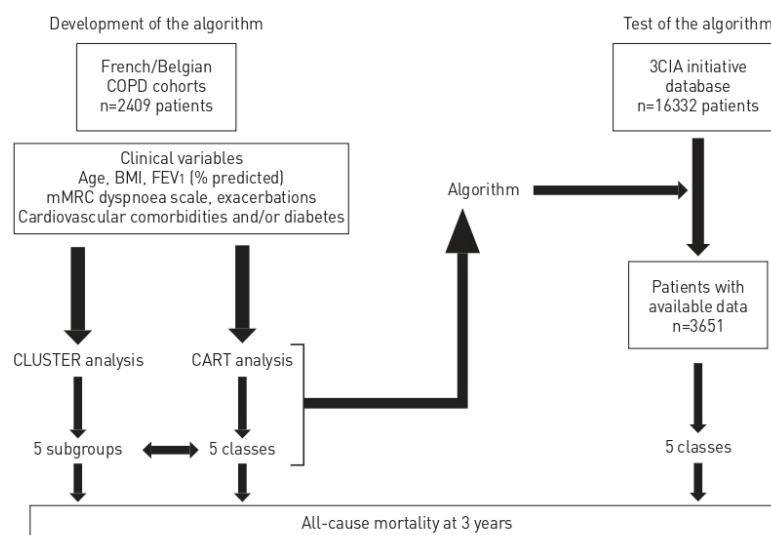


FIGURE 1 Study design. Patients with chronic obstructive pulmonary disease [COPD] recruited in the French/Belgian cohorts were classified into subgroups (phenotypes), based on the results of a cluster analysis of clinical data obtained at inclusion in the cohorts. Next, classification and regression trees (CARTs) were used on the same data to determine the best variables and thresholds necessary for the development of an algorithm for assigning COPD patients to the subgroups identified by cluster analysis in the French/Belgian cohorts. This analysis led to the development of a simple algorithm for allocating patients with COPD into five classes. This algorithm was then tested for external validation using data from the 3CIA initiative database (n=16332). This latter analysis was only possible in patients with available data (n=3651), *i.e.* with all the variables contained in the algorithm. In each analysis, the clinical relevance of the identified subgroups/classes was established by examining their association with 3-year all-cause mortality. BMI: body mass index; FEV₁: forced expiratory volume in 1 s; mMRC: modified Medical Research Council.

TABLE 1 Characteristics and 3-year mortality in chronic obstructive pulmonary disease (COPD) patients (n=2409) recruited in the French/Belgian COPD cohort, according to the five subgroups identified using cluster analysis

Variable	Subgroup I	Subgroup II	Subgroup III	Subgroup IV	Subgroup V
Subjects n	609	871	327	287	315
Male sex n (%)	499 (82)	662 (76)	263 (80)	215 (75)	246 (78)
Age years	77 [71–81]	64 [57–73]	74 [69–80]	64 [57–71]	61 [57–67]
BMI kg·m⁻²	25 [22–28]	24 [20–27]	30 [27–34]	20 [18–23]	26 [24–29]
Obesity>30 kg·m ⁻² n (%)	90 (14.8)	84 (9.6)	162 (49.5)	8 (2.8)	61 (19.4)
FEV1% predicted	36 [29–46]	45 [34–56]	59 [49–68]	27 [22–33]	78 [68–92]
GOLD grade					
GOLD 1 %	0	3	7	0	44
GOLD 2 %	18	35	67	4	51
GOLD 3 %	43	43	21	31	5
GOLD 4 %	39	19	4	65	0
mMRC dyspnoea scale	3 [3–4]	2 [1–2]	2 [1–2]	3 [3–4]	1 [0–1]
Exacerbations per patient per year	2 [1–3]	1 [0–2]	1 [0–2]	2 [2–4]	0 [0–1]
Hospitalisations per patient per year	1 [0–2]	0 [0–1]	0 [0–1]	1 [0–2]	0 [0–0]
Any cardiovascular disease or diabetes n (%)	554 (91)	165 (19)	315 (96)	17 (6)	83 (26)
Specific comorbidities n (%)					
Coronary artery disease	235 (39)	56 (6)	127 (39)	10 (3)	39 (12)
Hypertension	334 (55)	99 (11)	208 (64)	6 (2)	36 (11)
Left heart failure	148 (24)	22 (3)	66 (20)	4 (1)	9 (2)
Diabetes	43 (7)	18 (2)	40 (12)	1 (0)	25 (8)
3-year mortality n (%)	310 (50.9)	190 (21.8)	98 (30.0)	135 (47.0)	8 (2.5)
Age at death years	79 [74–84]	70 [61–79]	79 [74–84]	69 [63–75]	65 [60–71]

Data are presented as median [interquartile range], unless otherwise stated. BMI: body mass index; FEV1: forced expiratory volume in 1 s; GOLD: Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease; mMRC: modified Medical Research Council.

and diabetes. Subgroup I (mortality rate 50.9%) had less severe respiratory disease than subgroup IV, but was characterised by older age and very high rates of cardiovascular comorbidities and diabetes.

Use of CART for the development of an algorithm to assign COPD patients to subgroups of patients, identified by cluster analysis in the French/Belgian cohorts

The CART analysis provided an algorithm that facilitated the assignment of up to 80% of the patients to the subgroups identified by cluster analysis (see online supplementary tables S7 and S8). This algorithm is presented in figure 2 and the clinical characteristics of patients, according to the five classes obtained by applying this algorithm, are presented in table 3. Kaplan–Meier survival curves by cluster analysis-defined subgroups (figure 3a) and CART-defined classes (figure 3b) showed comparable results. Concordance probability estimates were 0.61 (95% CI 0.59–0.63) for cluster analysis-defined subgroups and 0.60 (95% CI 0.58–0.62) for CART-defined classes, confirming that both methods had comparable discriminatory power for the identification of subgroups with different prognoses.

Evaluation of the algorithm using data from the 3CIA initiative database

The algorithm developed in the French/Belgian cohorts was then tested, using data obtained in COPD patients from the 3CIA database. Characteristics of the 3651 patients distributed into classes, according to this algorithm, are presented in table 3. Kaplan–Meier survival curves by classes are presented in figure 3c. The concordance probability estimate was 0.62 (95% CI 0.59–0.64).

Comparison of mortality rates among classes in the French/Belgian COPD cohorts versus the 3CIA database

Because 3-year mortality rates varied widely between French/Belgian COPD cohorts and the 3CIA database, we used Cox analysis to examine hazard ratios of mortality among patients in the five classes defined by our algorithm in both cohorts, respectively. Forest plots corresponding to these analyses are presented in figure 4. Although absolute rates of death were markedly higher in the French/Belgian cohorts, hazard ratios of mortality among the five classes were rather comparable in the French/Belgian cohorts and in the 3CIA initiative.

Distribution by GOLD grades of severity of airflow limitation [1] in patients who died during follow-up is presented in figure 5. When comparing classes with high rates of all-cause mortality, patients without

TABLE 2 Main descriptors of the five chronic obstructive pulmonary disease (COPD) phenotypes identified by cluster analysis in the French/Belgian COPD cohort[#]

Phenotype number	Good prognosis V	Intermediate prognosis		Poor prognosis	
		II	III	IV	I
3-year mortality rate %	2.5	21.8	30.0	47.0	50.9
Phenotype name	Mild respiratory	Moderate-to-severe respiratory	Moderate-to-severe comorbid/obese	Very severe respiratory	Very severe comorbid
Airflow limitation	Mild to moderate	Moderate to very severe	Mild to severe	Severe to very severe	Moderate to very severe
Median BMI kg·m⁻²	26	24	30	20	26
Clinical manifestations					
Dyspnoea	Mild	Moderate	Moderate	Severe	Severe
Exacerbations	0	Infrequent	Infrequent	Frequent	Frequent
Hospitalisations	0	Infrequent	Infrequent	Frequent	Frequent
Rates of cardiovascular comorbidities/diabetes	Low	Low	Very high	Very low	Very high
Median age years	61	64	74	64	77

BMI: body mass index. [#]: the order is chosen based on 3-year mortality rates.

cardiovascular comorbidities/diabetes (class 4) who died were predominantly in GOLD 4; whereas patients with cardiovascular comorbidities/diabetes (class 1) who died had less severe airflow limitation (predominantly GOLD 2 and 3). Comparable observations were made when comparing patients in class 2 versus class 3 (intermediate mortality rates).

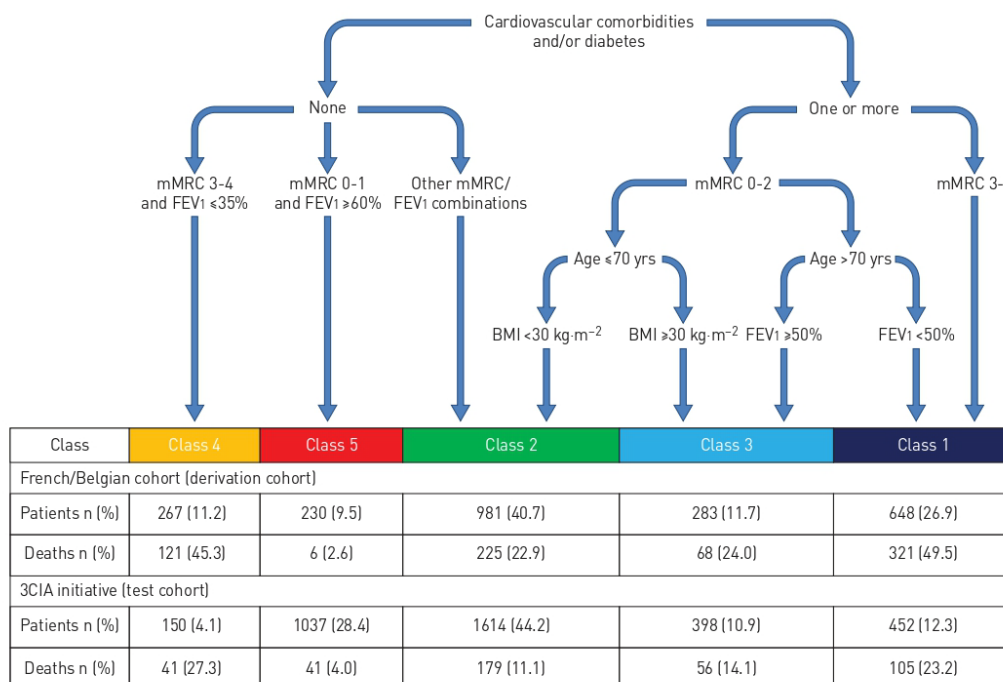


FIGURE 2 Algorithm developed by classification and regression tree (CART) analysis for the classification of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) patients. Application to the French/Belgian and 3CIA cohorts. BMI: body mass index; FEV1: forced expiratory volume in 1 s; mMRC: modified Medical Research Council.

TABLE 3 Characteristics and 3-year mortality rates in chronic obstructive pulmonary disease (COPD) patients recruited in the French/Belgian COPD cohorts, or in the 3CIA initiative database according to the five classes identified using the classification and regression tree (CART)-based algorithm

	Class 1	Class 2	Class 3	Class 4	Class 5
French/Belgian cohorts[#]					
Subjects n (%)	648 (27)	981 (41)	283 (12)	267 (11)	230 (10)
Male sex %	81	76	83	78	76
Age years	75 (70–80)	65 (58–73)	74 (66–79)	66 (59–74)	61 (57–68)
BMI kg·m ⁻²	25 (22–29)	24 (21–28)	30 (25–33)	21 (19–25)	25 (23–28)
Obesity >30 kg·m ⁻² %	19	11	46	9	10
FEV1% predicted	38 (29–47)	46 (37–57)	60 (54–71)	27 (22–31)	78 (70–93)
GOLD grade					
GOLD 1 %	1	4	11	0	47
GOLD 2 %	18	36	75	0	53
GOLD 3 %	45	42	12	27	0
GOLD 4 %	36	17	3	73	0
mMRC dyspnoea scale	3 (3–3)	2 (1–2)	2 (1–2)	3 (3–4)	1 (0–1)
Exacerbations per patient per year	2 (1–3)	1 (0–2)	1 (0–2)	2 (1–3)	0 (0–1)
Hospitalisations per patient per year	1 (0–2)	0 (0–1)	0 (0–1)	1 (0–2)	0 (0–0)
Any cardiovascular comorbidity or diabetes %	100	21	100	0	0
3-year mortality %	50	23	24	45	3
Age at death years	78 (73–83)	72 (64–80)	79 (71–84)	71 (65–76)	71 (61–72)
3CIA initiative database[¶]					
Subjects n (%)	452 (12)	1614 (44)	398 (11)	150 (4)	1037 (29)
Male sex %	66	66	73	71	53
Age years	71 (63–76)	63 (57–68)	72 (64–76)	64 (58–71)	59 (51–66)
BMI kg·m ⁻²	26 (23–30)	25 (22–28)	30 (25–32)	24 (21–27)	25 (22–27)
Obesity >30 kg·m ⁻² %	24	11	48	7	10
FEV1% predicted	44 (34–59)	53 (42–66)	69 (59–80)	27 (21–31)	80 (70–93)
GOLD grade					
GOLD 1 %	4	11	26	0	49
GOLD 2 %	33	48	65	0	51
GOLD 3 %	44	35	8	35	0
GOLD 4 %	19	6	1	65	0
mMRC dyspnoea scale	4 (2–4)	1 (1–2)	1 (0–2)	4 (4–4)	0 (0–1)
Any cardiovascular comorbidity or diabetes %	100	35	100	0	0
3-year mortality %	23	11	14	27	4
Age at death years	76 (70–81)	68 (63–74)	75 (71–79)	71 (62–78)	68 (61–73)

Data are presented as median (interquartile range), unless otherwise stated. BMI: body mass index; FEV1: forced expiratory volume in 1 s; GOLD: Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease; mMRC: modified Medical Research Council. [#]: n=2409, [¶]: n=3651.

Discussion

In the present study, we first performed cluster analysis in a pool of French/Belgian COPD cohorts, which identified five subgroups (phenotypes) of patients with different rates of all-cause mortality at 3 years and different ages at death. We then used CART analysis in this pool of French/Belgian cohorts to develop an algorithm that allowed allocation of patients into five classes that corresponded to the subgroups identified by cluster analysis. This simple algorithm was based on clinical variables (including cardiovascular comorbidities and/or diabetes and respiratory characteristics) that are routinely available in daily practice. Classification of COPD patients using this algorithm allowed the identification of subgroups of patients, which differed on 3-year all-cause mortality and age at death in the pool of French/Belgian cohorts, thereby providing internal validation of the approach. This method provided comparable results in patients included in the 3CIA initiative database, which contained an independent group of patients with COPD recruited in multinational cohorts, thereby providing external validation. The algorithm identifies clinical phenotypes that are relevant to the prognosis of patients with COPD, which could aid in the exploration of underlying pathophysiological mechanisms and development of novel strategies of care.

The algorithm described in the present study is the first to integrate comorbidities (cardiovascular diseases, diabetes and obesity) and age to more classical respiratory variables (FEV1 and dyspnoea) to improve the characterisation of patients with COPD. An important yield of this algorithm is to identify patients who belong to two subgroups with a poorer prognosis, *i.e.* classes 1 and 4; and to highlight the corresponding

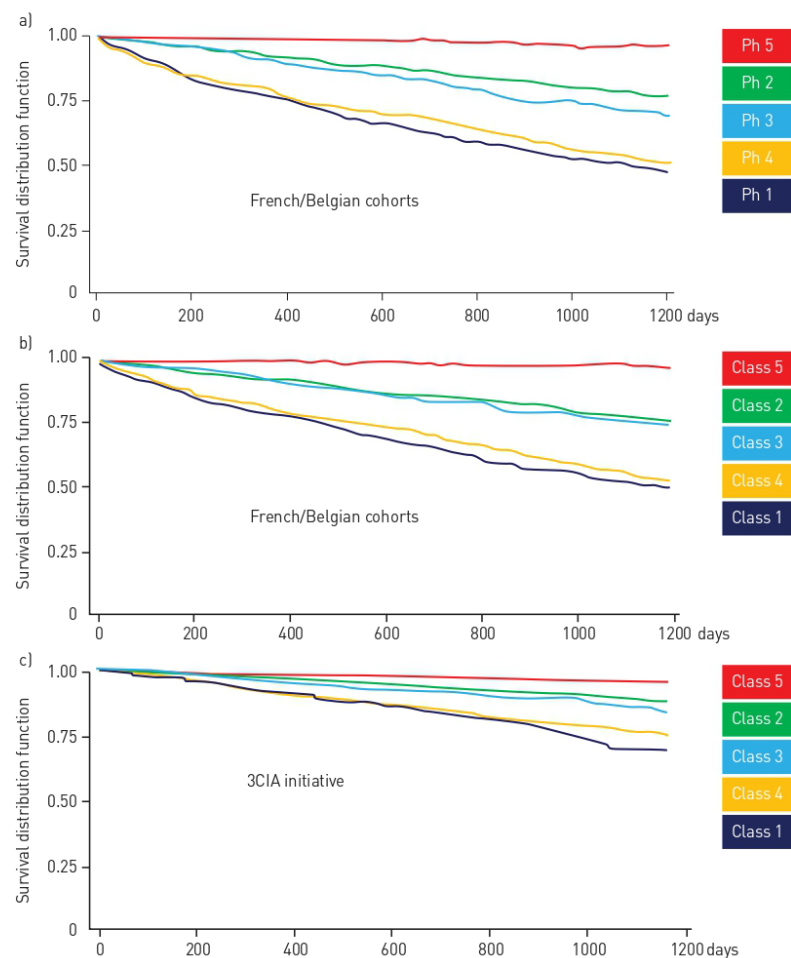


FIGURE 3 Kaplan-Meier analyses for assessing all-cause mortality at 3 years. a) French/Belgian chronic obstructive pulmonary disease (COPD) cohorts according to the five subgroups (phenotypes, Ph) identified by cluster analysis. b) French/Belgian COPD cohorts according to the five classes identified by classification and regression tree (CART) analysis. c) The 3CIA COPD cohort according to the five classes identified by the algorithm developed in the French/Belgian cohorts. All analyses, $p < 0.0001$ (Log-rank test).

determinants, *i.e.* the severity of the respiratory component (as assessed by the degrees of lung function impairment and dyspnoea) and the presence of major cardiovascular comorbidities or metabolic risk factors (diabetes). These data confirm previous studies, which show that 1) cardiovascular and metabolic comorbidities contribute to worsening outcomes (*e.g.* mortality, hospitalisation and exacerbation) in patients with COPD [6, 20]; and 2) two very different phenotypes of COPD patients with a poor prognosis exist (those with severe respiratory disease, often occurring at a younger age; and those with multi-morbidities including cardiovascular and metabolic diseases, often characterised by an older age) [9, 12]. Importantly, this study extends previous data by studying larger numbers of patients (including larger numbers of women) recruited in multiple countries, and provides a simple algorithm that can be used in the clinic to classify patients. One notable characteristic of the algorithm is that it highlights the variables on which clinicians and researchers should focus during follow-up and treatment adaptation. Whether

Papel del Inflamasoma en la EPOC estable y agudizada

COPD | P-R. BURGEL ET AL.

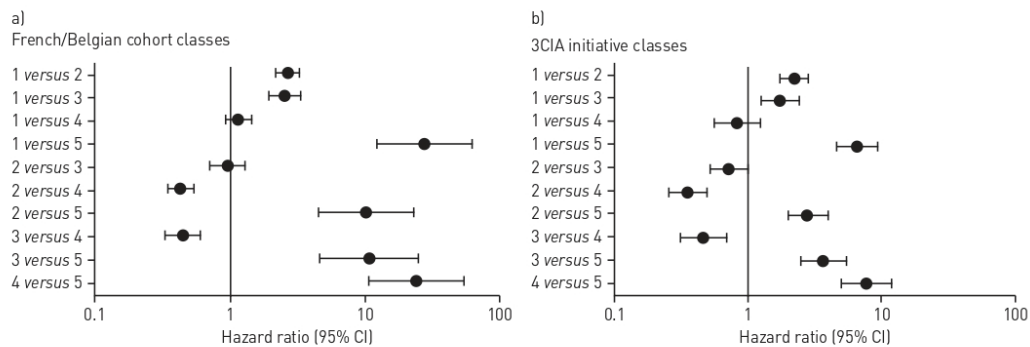


FIGURE 4 Relative mortality risks at 3 years among chronic obstructive pulmonary disease (COPD) patients in a) the French/Belgian COPD cohorts and b) the 3CIA initiative. COPD patients were classified into five classes according to the algorithm. Horizontal bars show hazard ratios and 95% confidence intervals of mortality risks between classes. For example, in the French/Belgian COPD cohorts, subjects in class 4 have a 23.2-fold (95% CI 10.2–52.7) increased risk of mortality when compared with subjects in class 5.

specific strategies need to be developed for all or some of the identified phenotypes now needs to be tested prospectively. Similarly, future studies should aim to determine whether these phenotypes are associated with specific biomarkers that reflect underlying pathophysiological mechanisms.

The main strengths of the present study were the application of exploratory statistical analyses complemented by clinical knowledge in large cohorts of patients, the validation of findings in an external pool of cohorts and the use of a robust variable (mortality) for validation. We also recognise that the present study has limitations. Our assessment of comorbidities was based on physician diagnoses that did not consider occult conditions, which reportedly occur in COPD patients [21]. To limit such underestimation of the impact of undiagnosed cardiovascular diseases, the definition of cardiovascular comorbidities was relatively loose and included hypertension (a risk factor for cardiovascular disease rather than a disease itself). This definition also corresponds to what occurs in real-life daily practice, where many patients do not benefit from systematic screening for cardiovascular comorbidities. Although COPD patients are at high risk for lung cancer, which is associated with a poor prognosis, patients with active lung cancer were generally excluded from the present cohorts, thus limiting our findings to COPD patients without active lung cancer. Specific causes of mortality were not available in the cohorts used in the

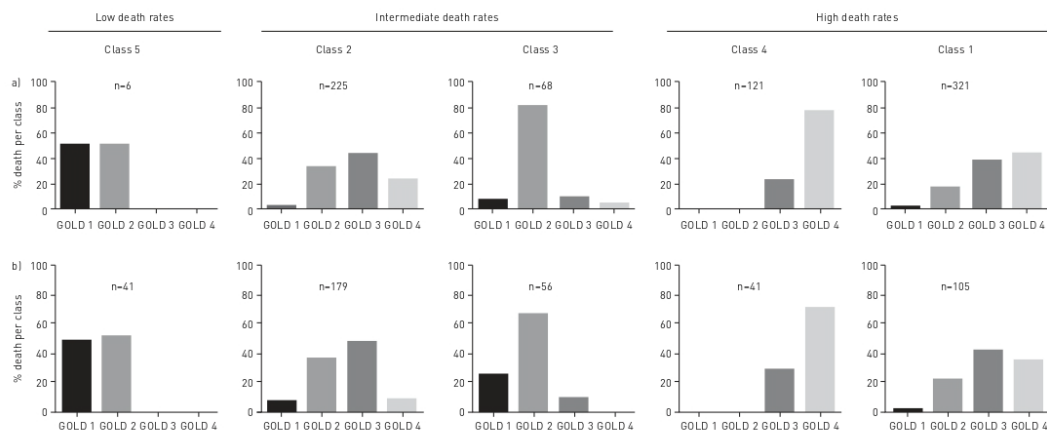


FIGURE 5 Distribution of airflow limitation severity by Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) grade at inclusion in the cohorts, in patients who died during follow-up. a) French/Belgian cohorts. b) 3CIA initiative. Data are presented as a percentage of the total number of deaths in each class. Absolute numbers of deaths (n) in each class are also presented.

<https://doi.org/10.1183/13993003.01034-2017>

9

present analyses, and the prognostic value of the phenotypes was confirmed using all-cause mortality. Previous studies have shown that causes of mortality in COPD populations differ between patients with mild *versus* severe airflow obstruction, with a higher relative weight of cancer and cardiovascular causes in patients with less severe airflow impairment, and more respiratory causes in those with more severe airflow impairment [22]. Among the patients who died, differences in the GOLD grades of airflow obstruction (see figure 4) between phenotypes with comparable survival rates (e.g. class 1 *versus* class 4 and class 2 *versus* class 3) suggest that patients with relatively high rates of cardiovascular comorbidities and/or diabetes (e.g. class 1 and 3) were more likely to die from extrapulmonary causes. Importantly, even if one of its purposes is to identify populations with different mortality rates, the algorithm is not intended to represent a prognostic index, as the determinants of a given prognosis might differ markedly between patients of a given group. The large difference in mortality rates between the two groups of cohorts largely relates to the fact that 57% of patients in the French/Belgian cohorts were recruited at the time of hospitalisation for a COPD exacerbation (CPHG cohort) [16], reflecting the prognostic impact of hospitalisations. Although hospitalisation appears to be an important prognostic factor, it should be considered a marker of disease severity rather than a phenotype *per se*. This was the basis for not including previous hospitalisation as a variable in the cluster analysis. However, COPD exacerbations (which are important in the characterisation of patients with COPD) [23] were included in the cluster analysis and the CART analysis. The finding that exacerbations were not retained in our final algorithm should not be misinterpreted, as exacerbations remain important events in the life of patients with COPD [24]; it merely reflects that non-hospitalised exacerbations were not significantly related to prognosis. The performance of classification trees could also be improved by the integration of biomarkers that reflect inflammatory (fibrinogen, white blood cell count, C-reactive protein, eosinophils, *etc.*) [25–27] and cardiovascular (brain natriuretic peptide, copeptin, pro-adrenomedullin *etc.*) [28] biological phenomena.

The field of COPD phenotypes was once considered ‘the future of COPD’ [29], but moving from exploratory research studies to the clinic has proven to be difficult. The algorithm described in the present study offers a new way of combining and hierarchising well-known prognostic criteria (including comorbidities, age and symptoms) to identify COPD phenotypes in the clinic. This approach could serve as a basis to develop phenotype-specific therapeutic strategies, by recruiting appropriate at-risk target populations in clinical trials. We speculate that our algorithm might also help in unravelling specific biological pathways that were previously missed, owing to the mixing of various phenotypes in the current classifications of COPD.

References

- 1 Vogelmeier CF, Criner GJ, Martinez FJ, *et al.* Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Lung Disease 2017 Report: GOLD Executive Summary. *Eur Respir J* 2017; 49: 1700214.
- 2 Celli BR, Decramer M, Wedzicha JA, *et al.* An official American Thoracic Society/European Respiratory Society statement: research questions in COPD. *Eur Respir J* 2015; 45: 879–905.
- 3 Agustí A, Calverley PM, Celli B, *et al.* Characterisation of COPD heterogeneity in the ECLIPSE cohort. *Respir Res* 2010; 11: 122.
- 4 Puhan MA, Garcia-Aymerich J, Frey M, *et al.* Expansion of the prognostic assessment of patients with chronic obstructive pulmonary disease: the updated BODE index and the ADO index. *Lancet* 2009; 374: 704–711.
- 5 Divo M, Cote C, de Torres JP, *et al.* Comorbidities and risk of mortality in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2012; 186: 155–161.
- 6 Mannino DM, Thorn D, Swensen A, *et al.* Prevalence and outcomes of diabetes, hypertension and cardiovascular disease in COPD. *Eur Respir J* 2008; 32: 962–969.
- 7 Fabbri LM, Boyd C, Boschetto P, *et al.* How to integrate multiple comorbidities in guideline development: article 10 in integrating and coordinating efforts in COPD guideline development. An official ATS/ERS workshop report. *Proc Am Thorac Soc* 2012; 9: 274–281.
- 8 Burgel PR, Paillasseur JL, Caillaud D, *et al.* Clinical COPD phenotypes: a novel approach using principal component and cluster analyses. *Eur Respir J* 2010; 36: 531–539.
- 9 Garcia-Aymerich J, Gomez FP, Benet M, *et al.* Identification and prospective validation of clinically relevant chronic obstructive pulmonary disease (COPD) subtypes. *Thorax* 2011; 66: 430–437.
- 10 Rennard S, Locantore N, Delafont B, *et al.* Identification of five chronic obstructive pulmonary disease subgroups with different prognoses in the ECLIPSE cohort using cluster analysis. *Ann Am Thorac Soc* 2015; 12: 303–312.
- 11 Pinto LM, Alghamdi M, Benedetti A, *et al.* Derivation and validation of clinical phenotypes for COPD: a systematic review. *Respir Res* 2015; 16: 50.
- 12 Burgel PR, Paillasseur JL, Peene B, *et al.* Two distinct chronic obstructive pulmonary disease (COPD) phenotypes are associated with high risk of mortality. *PLoS ONE* 2012; 7: e51048.
- 13 Burgel PR, Paillasseur JL, Roche N. Identification of clinical phenotypes using cluster analyses in COPD patients with multiple comorbidities. *Biomed Res Int* 2014; 2014: 420134.
- 14 Breiman L, Friedman J, Olshen R, *et al.* Classification and regression trees. Monterey, CA, Wadsworth & Brooks, 1984.
- 15 Soriano JB, Lamprecht B, Ramirez AS, *et al.* Mortality prediction in chronic obstructive pulmonary disease comparing the GOLD 2007 and 2011 staging systems: a pooled analysis of individual patient data. *Lancet Respir Med* 2015; 3: 443–450.

- 16 Piquet J, Chavaillon JM, David P, *et al.* High-risk patients following hospitalisation for an acute exacerbation of COPD. *Eur Respir J* 2013; 42: 946-955.
- 17 Wikipedia. Factor analysis of mixed data. https://en.wikipedia.org/wiki/Factor_analysis_of_mixed_data Date last accessed: January 25, 2016. Date last updated: May 17, 2016.
- 18 Pagès J. Analyse factorielle de données mixtes. [Multiple Factor Analysis for Mixed Data]. *Rev Statistique Appliquée* 2004; 52: 93-111.
- 19 Wikipedia. Predictive analytics. https://en.wikipedia.org/wiki/Predictive_analytics#Classification_and_regression_trees Date last accessed: January 25, 2016. Date last updated: October 03, 2017.
- 20 Briggs A, Spencer M, Wang H, *et al.* Development and validation of a prognostic index for health outcomes in chronic obstructive pulmonary disease. *Arch Intern Med* 2008; 168: 71-79.
- 21 Rutten FH, Cramer MJM, Grobbee DE, *et al.* Unrecognized heart failure in elderly patients with stable chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Heart J* 2005; 26: 1887-1894.
- 22 Sin DD, Anthonisen NR, Soriano JB, *et al.* Mortality in COPD: role of comorbidities. *Eur Respir J* 2006; 28: 1245-1257.
- 23 Hurst JR, Vestbo J, Anzueto A, *et al.* Susceptibility to exacerbation in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2010; 363: 1128-1138.
- 24 Wedzicha JA, Seemungal TA. COPD exacerbations: defining their cause and prevention. *Lancet* 2007; 370: 786-796.
- 25 Duvoix A, Dickens J, Haq I, *et al.* Blood fibrinogen as a biomarker of chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 2013; 68: 670-676.
- 26 Thomsen M, Dahl M, Lange P, *et al.* Inflammatory biomarkers and comorbidities in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2012; 186: 982-988.
- 27 George L, Brightling CE. Eosinophilic airway inflammation: role in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 2016; 71: 34-51.
- 28 Stolz D, Meyer A, Rakic J, *et al.* Mortality risk prediction in COPD by a prognostic marker panel. *Eur Respir J* 2014; 44: 1557-1570.
- 29 Han MK, Agusti A, Calverley PM, *et al.* Chronic obstructive pulmonary disease phenotypes: the future of COPD. *Am J Respir Crit Care Med* 2010; 182: 598-604.

ORIGINAL ARTICLE
COPD

The inflammasome pathway in stable COPD and acute exacerbations

Rosa Faner^{1,2,9}, Patricia Sobradillo^{2,3,9}, Aina Noguera^{2,4}, Cristina Gomez⁴, Tamara Cruz^{1,2}, Alejandra López-Giraldo^{1,2}, Eugeni Ballester^{5,6}, Nestor Soler^{5,6}, Juan I. Arostegui^{6,7}, Pablo Pelegrín⁸, Roberto Rodriguez-Roisin^{2,5,6}, Jordi Yagüe^{6,7}, Borja G. Cosío^{2,4}, Manel Juan^{6,7} and Alvar Agustí^{1,2,5,6}

Affiliations: ¹Fundació Clínic per a la Recerca Biomèdica, Barcelona, Spain. ²CIBER Respiratory Diseases (CIBERES), Barcelona, Spain. ³Pulmonary Service, Hospital Txagorritxu, Vitoria, Spain. ⁴University Hospital Son Espases-IdISPa, Palma de Mallorca, Spain. ⁵Institut Respiratori, Hospital Clínic, Barcelona, Spain. ⁶Biomedical Research Institute August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain. ⁷Immunology Dept, Hospital Clínic, Barcelona, Spain. ⁸Inflammation and Experimental Surgery Unit, CIBERHED, Murcia's BioHealth, Research Institute IMIB-Arrixaca, University Hospital Virgen de la Arrixaca, Murcia, Spain. ⁹These authors contributed equally to this work.

Correspondence: Alvar Agustí, Respiratory Institute, Hospital Clínic, Villarroel 170 (Escala 3, Planta 5), Barcelona 08036, Spain. E-mail: alvar.agusti@clinic.ub.es

ABSTRACT Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is characterised by pulmonary and systemic inflammation that bursts during exacerbations of the disease (ECOPD). The NLRP3 inflammasome is a key regulatory molecule of the inflammatory response. Its role in COPD is unclear.

We investigated the NLRP3 inflammasome status in: 1) lung tissue samples from 38 patients with stable COPD, 15 smokers with normal spirometry and 14 never-smokers; and 2) sputum and plasma samples from 56 ECOPD patients, of whom 41 could be reassessed at clinical recovery.

We observed that: 1) in lung tissue samples of stable COPD patients, NLRP3 and interleukin (IL)-1 β mRNA were upregulated, but both caspase-1 and ASC were mostly in inactive form, and 2) during infectious ECOPD, caspase-1, oligomeric ASC and associated cytokines (IL-1 β , IL-18) were significantly increased in sputum compared with clinical recovery.

The NLRP3 inflammasome is primed, but not activated, in the lungs of clinically stable COPD patients. Inflammasome activation occurs during infectious ECOPD. The results of this study suggest that the inflammasome participates in the inflammatory burst of infectious ECOPD.



@ERSpublications

The NLRP3 inflammasome is primed in stable COPD lungs, then activated during infectious exacerbation <http://ow.ly/Wopi300DXcT>



This article has supplementary material available from openres.ersjournals.com

Received: Jan 02 2016 | Accepted after revision: May 17 2016

Support statement: This study was supported, in part, by Instituto de Salud Carlos III FEDER (grant number 09/00629), FIS (PI10/00523 and PI10/01404), SEPAR 2010-870, Mutual Medica (DN040371) and Marató TV3 (040430). Funding information for this article has been deposited with the Open Funder Registry.

Conflict of interest: Disclosures can be found alongside this article at openres.ersjournals.com

The content of this work is ©the authors or their employers. Design and branding are ©ERS 2016. This article is open access and distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial Licence 4.0.

Introduction

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is associated with an enhanced pulmonary and systemic inflammatory response [1, 2] that bursts during exacerbations of the disease (ECOPD) [3]. The molecular mechanisms regulating this response, however, have not been fully elucidated [1, 2].

The regulation of the inflammatory response is highly complex. The Nod-like receptor (NLR) family plays a pivotal role [4–7] and one of its members, the so-called NLRP3 (NLR containing a Pyrin domain 3) inflammasome, has been implicated in different animal models of lung inflammation [4, 5, 8–10]. In patients with COPD, the evidence for NLRP3 inflammasome activation is scarce and contradictory [11–13], and has never been investigated before during ECOPD. Accordingly, in this study we investigated the role of the NLRP3 inflammasome in COPD patients, both when clinically stable and during ECOPD, smokers with normal spirometry and healthy controls.

Methods

Study design and ethics

This is an observational, prospective and controlled study in human samples. The ethics committees of participating institutions approved the study and all participants signed their informed consent.

Participants

We studied lung tissue specimens (n=68) provided by the Pulmonary Biobank of CIBERES [14], which were obtained from patients undergoing lung resectional surgery because of localised lung cancer (n=54) or bilateral lung transplantation (n=14). 38 of them had COPD [2] (n=26, 71% on inhaled long-acting bronchodilators and corticosteroids), 15 were smokers (>10 pack-years) with normal spirometry and 15 were never-smokers (table 1). We also obtained plasma and spontaneous sputum samples in another 56 patients hospitalised because of ECOPD (V1, during the first 72 h of hospitalisation) and when clinically stable (n=41), 2 months after discharge (V2) (table 1), n=15 patients were lost for the follow-up or not able to produce sputum at V2. Six individuals (10%) of the ECOPD subset received antibiotics prior to hospital admission.

Measurements

Lung function

Forced spirometry was measured in all participants according to international guidelines [15]. Reference values correspond to a Mediterranean population [16].

Lung mRNA expression

Total RNA was extracted from RNA later preserved tissue using a Purelink RNA minikit (Invitrogen, Paisley, UK) and cDNA was synthesised with Transcriptor Reverse Transcriptase (Roche, Mannheim, Germany). The relative quantification of each gene was normalised to the expression levels of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase as housekeeping gene using the ΔC_t method [17], as described in the supplementary material.

IL-1 β , IL-18 and caspase-1 protein levels in lung and sputum

Total lung proteins were obtained as detailed in the supplementary methods. Levels of caspase-1 and IL-18 were measured by ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA and MBL International, Woburn, MA,

TABLE 1 Demographic and clinical characteristics of the individuals

	Nonsmokers	Smokers	COPD	ECOPD	Recovery
Subjects	15	15	38	56	41
Age years	66 \pm 1.4	60 \pm 2.0	62 \pm 1.2	68.9 \pm 1.2	68.1 \pm 1.3
BMI kg·m⁻²	27.1 \pm 0.8	24.6 \pm 1.4	26.2 \pm 0.8	26.5 \pm 0.8	26.3 \pm 0.8
Cumulative smoking exposure pack-years	0	52.8 \pm 5.7	61.3 \pm 4.7	72.9 \pm 4.8	72.7 \pm 5.3
Smoking status ex/current	0	0/15	26/12	21/35	19/29
FEV₁ % reference[#]	94.3 \pm 5.2	82.4 \pm 3.6	42.4 \pm 2.9	44.4 \pm 2.8	44.4 \pm 2.8
FEV₁/FVC %[#]	76.4 \pm 1.7	83.0 \pm 0.6	44.1 \pm 2.4	46.7 \pm 2.0	47.1 \pm 2.3

Data are presented as n or mean \pm SEM, unless otherwise stated. COPD: chronic obstructive pulmonary disease; ECOPD: exacerbations of COPD; BMI: body mass index; FEV₁: forced expiratory volume in 1 s; FVC: forced vital capacity. [#]: FEV₁ % reference and FEV₁/FVC values for nonsmokers and smokers are pre-bronchodilator, and for COPD patients are post-bronchodilator.

USA, respectively). IL-1 β concentration was determined by ultrasensitive Luminex (MILLIPLEX MAG; EMD Millipore, Billerica, MA, USA).

Assessment of inflammasome activation

The presence of active caspase-1 and ASC oligomers were assessed by Western blot using the anti-caspase-1 sc-515 antibody (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), which detects the fragments of the active caspase-1 (10 kDa, p10) and the inactive uncleaved caspase-1 precursor (45 kDa, p45), or the anti-ASC antibody AL177 (Adipogen, Liestal, Switzerland), which identifies ASC monomers (22 kDa) and oligomers when using native gels as detailed in the supplementary methods.

Caspase-1 and ASC lung tissue distribution

The distribution of total caspase-1 was determined by immunohistochemistry using the anti-caspase-1 antibody AHP963 (AbD Serotec, Kidlington, UK). ASC distribution and ASC speck presence was assessed by immunofluorescence with an anti-ASC antibody (AL177) as detailed in the supplementary methods.

Inflammation markers in ECOPD blood

White blood cell counts were determined by standard automated methodology, whereas ultra-sensitive C reactive protein (CRP) in plasma was quantified by a turbidimetric test (Bayer Diagnostics, Munich, Germany).

Microbiology

Spontaneous sputum samples were cultured for *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus viridans*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Citrobacter* ssp. Respiratory RNA viruses were detected by PCR (CLART[®] PneumoVir; Genomica, Madrid, Spain). An ECOPD episode was considered of infectious origin when a positive bacterial culture and/or a positive viral PCR were identified [18]. It was considered noninfectious when both were negative.

Statistical analysis

Results are presented as mean \pm SEM. The Kruskal–Wallis test, followed by *post hoc* Mann-Whitney contrasts if needed, was used to compare continuous variables between groups (COPD *versus* smokers *versus* nonsmokers). Results during ECOPD and recovery were compared using the Wilcoxon matched-pairs test. A p-value<0.05 (two-tailed) was considered statistically significant.

Results

Table 1 summarises the main characteristics of the patients included in the study.

NLRP3 expression is increased in stable COPD lungs and correlates with airflow obstruction

NLRP3 mRNA levels were significantly higher in the lungs of stable COPD patients *versus* nonsmokers and smokers with normal spirometry (figure 1a). This increase was independent of the smoking status of the patient (current *versus* former) (supplementary figure S1) and was related to the severity of airflow limitation present (figure 1b). Furthermore, NLRP3 expression levels in COPD positively correlated with different inflammatory mediators that are both canonical and noncanonical to the NLRP3 inflammasome, including IL-1 β and IL-18 (figure 1c and d), and IL-1 α , IL-8, neutrophil elastase, CCL20 and IL-2 (supplementary figure S2).

IL-1 β , but not IL-18, expression correlates with airflow limitation in stable COPD

IL-1 β transcripts tended to increase in smokers and, even further, in stable COPD patients *versus* nonsmokers, (figure 2a), but differences just failed to reach statistical significance (Kruskal–Wallis test, p=0.06). There were no differences in IL-18 transcripts between groups, confirming previous reports of a noninducible expression of IL-18. IL-1 β , but not IL-18, lung transcripts were related to the severity of airflow limitation in COPD patients (figure 2b and data not shown).

Although both IL-1 β and IL-18 protein levels in lung tissue were increased in COPD *versus* control nonsmokers, these differences failed to reach statistical significance (figure 2c). Interestingly, these cytokines were significantly higher in smokers when compared with healthy individuals (figure 2c). No significant differences were observed between COPD patients according to their smoking habits (current *versus* former smokers) (supplementary figure S1). Similarly, no differences between patients treated with or without inhaled corticosteroids (data not shown).

Stable COPD is not associated with inflammasome or caspase-1 activation in lung tissue

Lung mRNA and protein levels for caspase-1 measured by quantitative PCR and ELISA, respectively, were similar between nonsmokers, smokers and COPD (figure 3a). Furthermore, Western blot analysis of

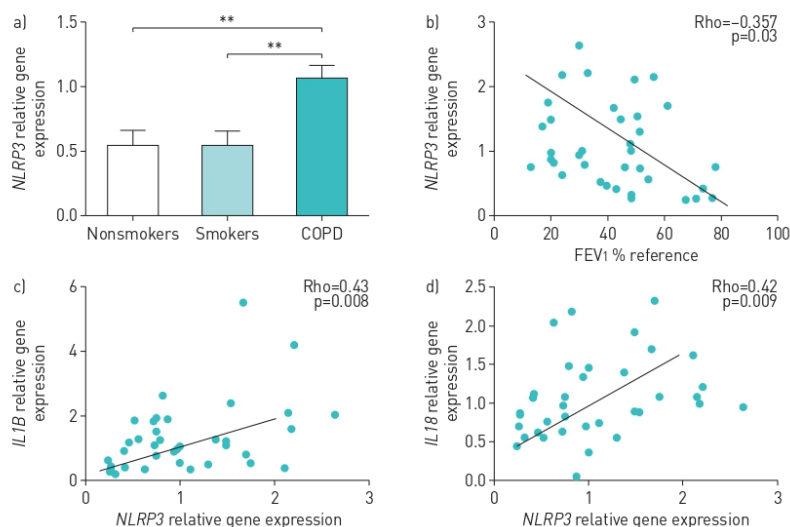


FIGURE 1 NLRP3 expression in lung tissue. a) NLRP3 relative transcript levels in lung tissues of nonsmokers, smokers or chronic obstructive pulmonary disease (COPD) patients [relative quantification of mRNA levels relative to glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase]. b) Spearman correlation of NLRP3 mRNA expression levels in lungs of patients with stable COPD with forced expiratory volume in 1 s (FEV1 % reference). c, d) Spearman correlation of NLRP3 expression with the levels of c) IL1B and d) IL18 transcripts. a) Data is presented as mean \pm SEM of n=14 nonsmokers, n=15 smokers and n=38 COPD individuals; b–d) each point represents an individual patient. **: p<0.005.

caspase-1 revealed that it was mainly in the inactive pro-form (p45) (figure 3b). The band corresponding to the small active subunit of caspase-1 (p10) was only detected in 29% of the COPD patients, 20% of nonsmokers and 27% of smokers (figure 3b). Finally, in stable COPD patients, caspase-1 expression was detected by immunohistochemistry in lung epithelial cells and inflammatory cells (mostly macrophages and lymphocytes) (figure 3d and f). However, a similar expression pattern for caspase-1 was observed in the lungs of control nonsmokers when compared with stable COPD patients (figure 3c–f). Similarly, ASC appeared mainly in the monomeric state in COPD patients and in nonsmokers (figure 3g); weak oligomers for ASC were also detected in both COPD patients and controls (figure 3g). ASC oligomeric species were reversed when samples were treated with a reducing agent prior to resolving by SDS-PAGE (figure 3g). Finally, the pattern of ASC staining in lung tissue (figure 3h–j) resembles that described for caspase-1 and was similar in all groups of patients examined. ASC specks (oligomers) were detected by immunofluorescence in some macrophages (figure 3h–j), but similar to caspase-1, the majority of ASC immunostaining was mainly detected as uniform staining through the cell cytosol, probably corresponding to the inactive monomeric form of ASC (figure 3h–j).

Infectious ECOPD episodes are associated with inflammasome activation

During ECOPD we observed leukocytosis, neutrophilia, lymphopenia and elevated C-reactive protein values (table 2). In the entire population of COPD patients studied, the concentrations of released caspase-1, IL-1 β and IL-18 in sputum were similar during the ECOPD episode and at recovery (figure 4a).

Next, patients were stratified according to the nature of exacerbation. An ECOPD episode was considered infectious when a positive bacterial culture and/or a positive viral PCR were identified [18, 19]. In infectious ECOPD, 53% of the cases were of viral origin, 41% were bacterial and only 6% had both causes. The ECOPD was considered noninfectious when both viral PCR and bacterial culture were negative. We observed that the sputum concentrations of caspase-1, IL-1 β and IL-18 were significantly higher when infection was present (figure 4b).

During ECOPD we detected oligomeric ASC in sputum, a hallmark of inflammasome activation (figure 4c), indicating that extracellular oligomers of ASC are present during ECOPD. As a methodological control, we show that these ASC oligomers disappeared when samples were reduced prior to analysis (figure 4c). The data support recent reports describing an extracellular function of inflammasome particles [20, 21].

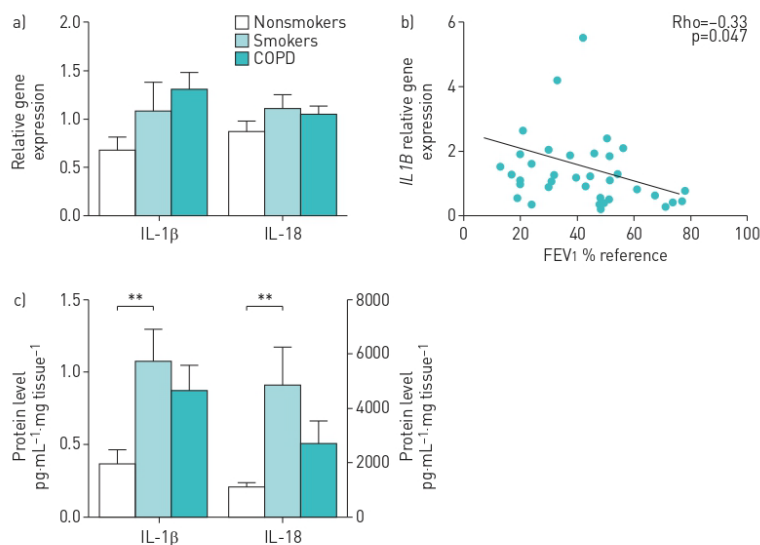


FIGURE 2 Interleukin (IL)-1 β and IL-18 in stable chronic obstructive pulmonary disease (COPD) patients. a) IL-1 β and IL-18 relative transcript levels in lung tissues of nonsmokers, smokers or COPD patients (relative quantification of mRNA levels relative to glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase). b) Spearman correlation of IL-1 β mRNA expression levels in lungs of patients with stable COPD with forced expiratory volume in 1 s (FEV1 % reference). c) IL-1 β and IL-18 protein levels measured by Luminex and ELISA, respectively, in lung tissue. a, c) Data is presented as mean \pm SEM of n=14 nonsmokers, n=15 smokers and n=38 COPD individuals; b) each point represents an individual patient. **: p<0.01.

Discussion

This study shows that: 1) NLRP3 and IL-1 β mRNA are upregulated in lung tissue of stable COPD, but both caspase-1 and ASC are found mostly in inactive form, suggesting that the NLRP3 inflammasome is primed, but not activated, in stable COPD, and 2) during infectious ECOPD, caspase-1, oligomeric ASC and associated cytokines (IL-1 β , IL-18) are upregulated in sputum, indicating that inflammasome activation occurs under these circumstances.

Previous studies

Over the last few years, knowledge about the inflammasome function in different inflammatory conditions has increased exponentially, mostly as a result of knockout mice and *in vitro* cell assays [20, 22, 23]. For instance, the pulmonary inflammatory response is blunted in NLRP3 knockout mice [4, 5, 9]. In patients with COPD, the evidence for inflammasome activation is scarce and contradictory. While some studies reported increased levels of IL-1 β [11, 12], others failed to find NLRP3, or increase in IL-1 β and IL-18 protein in stable COPD patients [13]. Most of them were, however, of limited size and, contrary to our study, did not assess whether the inflammasome is a primer or active.

Interpretation of findings

The inflammasomes form a family of multimeric intracellular protein complexes that most often include a NLR as a sensor molecule and, in some cases, the adaptor protein apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain (ASC) and pro-caspase-1 [24, 25]. The best-characterised inflammasome is that formed by NLRP3, which is activated in response to different pathogens, particles and danger signals [24, 25]. Full activation of the NLRP3 inflammasome requires two sequential biological steps. The first (priming step) increases pro-IL-1 β and NLRP3 transcription, and the second (activation step) induces inflammasome assembly, activation of caspase-1 and processing, and release of the pro-inflammatory cytokines IL-1 β and IL-18 [24, 25]. Priming is related to the presence of inflammation, whereas activation occurs only after exposure to specific danger signals [24, 25]. The activation involves the oligomerization of NLRP3 with ASC, in a large fibre-like complex called "speck", which can be detected by immunofluorescence or by ASC cross-linking in Western blots [26–28]. NLRP3 and IL-1 β

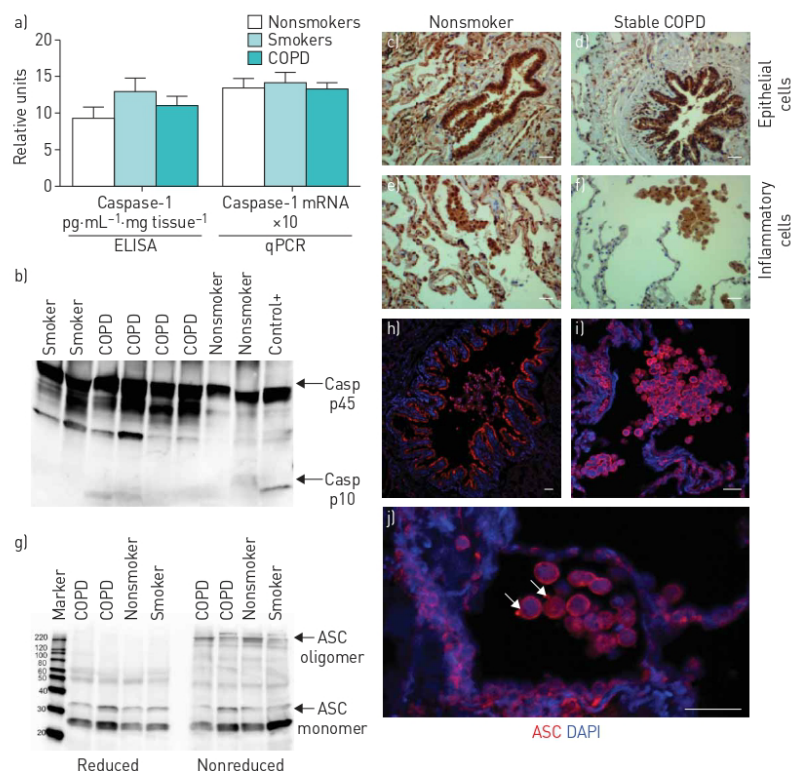


FIGURE 3 Inflammasome is not activated in stable chronic obstructive pulmonary disease (COPD). **a)** Caspase-1 protein levels measured by ELISA and relative mRNA expression measured by quantitative PCR (qPCR) in lung tissue of stable COPD. Data is presented as mean±SEM of n=14 nonsmokers, n=15 smokers and n=38 COPD individuals. **b)** Representative Western blot analysis of caspase-1 (Casp); positive control (+) is a lysate of human peripheral blood mononuclear cells treated with the NLRP3 activator nigericin (10 μM). **c-f)** Caspase-1-positive cells (brown) detected by immunohistochemistry in **c, d)** bronchial epithelial cells and alveolar epithelial cells and **e, f)** macrophages in a representative tissue sample from a nonsmoker and a COPD patient. The primary antibody used in immunohistochemistry detects both the p45 inactive precursor and the small subunit of active caspase-1 (p10). Scale bars: 100 μm. **g)** Western blot for ASC in representative lung samples from two COPD patients, a nonsmoker (NS) and a smoker (S), denoting the monomeric (22 kDa) and oligomeric (220 kDa) ASC. ASC oligomeric complexes were not detected when samples were run under reduced conditions. **h-j)** ASC immunofluorescence staining (red) and nuclei (blue) in lung tissue of a representative COPD patient: **h)** alveolar epithelial cells and macrophages, **i)** bronchial epithelial cells, and **j)** macrophages. Arrows in **j)** denote macrophages with detectable ASC speck. DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole. Scale bars: 36 μm.

mRNA levels are generally considered markers of inflammasome priming, whereas NLRP3 and ASC oligomerization and presence of active caspase-1 are readouts of inflammasome activation [20, 21, 29–31].

In line with previous studies reporting an association of IL-1β with COPD [4, 5, 8], we found increased NLRP3 transcripts in the lungs of stable COPD patients. In addition, we also found that NLRP3 mRNA expression correlated positively with the severity of airflow limitation, and with mRNA expression for IL-1α, IL-18, IL-1β, IL-8 and neutrophil elastase. However, we could not observe any direct indicator of inflammasome formation and activation during stable COPD. These results are in keeping with those reported by DI STEFANO *et al.* [13], but in contrast to those by ELTOM *et al.* [32], who reported increased caspase-1 activity in lung tissue of patients with emphysema. Although we observed increased protein levels of IL-1β and IL-18 in current smokers with normal spirometry, current smoking did not influence the levels of these proteins in patients with COPD. Accordingly, these findings suggest that the production of IL-1β and IL-18 is driven by a different mechanism in each situation.

TABLE 2 Plasma inflammatory markers during exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease (ECOPD) and clinical recovery

	ECOPD	Recovery	p-value
Subjects	56	41	
Leukocytes $\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$	11.59 \pm 0.47	8.67 \pm 0.3	<0.0001
Neutrophils $\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$	85.4 \pm 1.3	62.6 \pm 1.6	<0.0001
Lymphocytes $\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$	9.3 \pm 0.6	24.35 \pm 1.0	<0.0001
C-reactive protein $\text{mg}\cdot\text{dL}^{-1}$	6.5 \pm 0.9	1.1 \pm 0.3	<0.0001

Data are presented as n or mean \pm SEM, unless otherwise stated. Data were compared using a Mann-Whitney test.

However, we also found, for the first time to our knowledge, that the inflammasome becomes activated in human lungs during infectious ECOPD. This was evidenced by the increased sputum concentrations of caspase-1, IL-1 β and IL-18 observed in infectious ECOPD (as compared with noninfectious exacerbations). The fact that we found these cytokines in sputum supernatant indicates that these proteins have actually been released from the cells, suggesting that they correspond to their active forms [30, 31]. In keeping with this interpretation is the fact that we also detected oligomers of ASC in sputum during infectious ECOPD, supporting recent studies indicating that ASC oligomeric particles are released from activated macrophages and contribute to perpetuate inflammation [20, 21]. The fact that cell-free ASC oligomeric particles have been observed in the bronchoalveolar lavage of a small series of COPD patients further supports these observations [21]. Finally, our results are also in agreement with those reported by BAFADHEL *et al.* [19], which showed different patterns of inflammatory response during ECOPD and reported that the biomarker

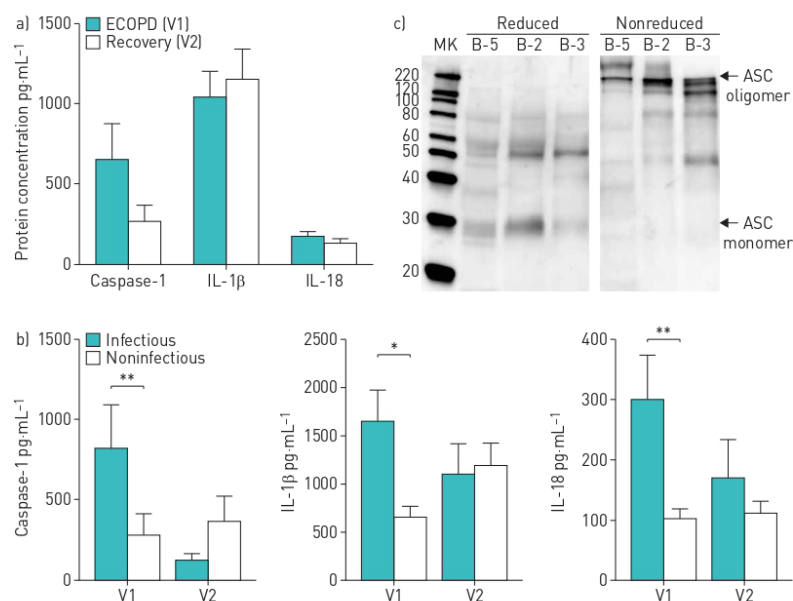


FIGURE 4 NLRP3 inflammasome is activated during infectious exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease (ECOPD). a) Protein concentration of caspase-1, interleukin (IL)-1 β and IL-18 in sputum of COPD patients studied during an ECOPD (V1) and at recovery (V2). Data are presented as mean \pm SEM of n=41 (V1) and n=41 (V2). b) Sputum concentrations of caspase-1, IL-1 β and IL-18 in COPD patients studied during an episode of ECOPD of infectious or noninfectious origin. Data are presented as mean \pm SEM of n=17 infectious V1 (during ECOPD), n=14 infectious V2 (recovery), n=30 noninfectious V1 and n=21 noninfectious V2 individuals. *: p<0.05; **: p<0.01. c) Representative Western blot for ASC sputum samples from ECOPD patients, denoting oligomeric ASC complexes, a hallmark of inflammasome activation. ASC oligomeric complexes were not detected when samples were run under reduced conditions. MK: marker.

that best identified ECOPD of bacterial origin was sputum IL-1 β concentration. Whether or not this inflammasome response in infectious ECOPD can be protective or detrimental to the host requires further research. The results of our study show that the inflammasome is involved in the inflammatory burst of infectious ECOPD. It is plausible that controlling the primed status of the inflammasome in stable COPD might result in a decrease in the inflammasome-induced inflammation observed in infectious ECOPD.

Strengths and limitations

This is the largest study investigating the participation of the NLRP3 in lung tissue samples of COPD patients (and appropriate controls) and the first to assess its potential involvement during episodes of ECOPD. It has, however, some limitations. Due to clinical constraints, we were unable to obtain all measurements in all patients and lung tissue samples were not accessible during ECOPD. ECOPD blood and sputum samples were collected during the first 72 h of hospitalisation, but we did not have information at discharge and during recovery. 98% of ECOPD patients were on inhaled corticosteroids previously, so that differences between infectious/noninfectious groups could not be attributed to different treatments. Finally our definition of infectious ECOPD (bacterial culture and/or viral PCR), although previously used in similar studies [19], may potentially lead to over/underdiagnosis.

Conclusions

Our results indicate that NLRP3 is primed in the lungs of patients with clinically stable COPD and that infectious ECOPD constitutes a robust second signal that triggers inflammasome activation.

Acknowledgements

The authors thank the participating patients for their willingness to contribute to biomedical research, Ms Gemma Sunyer (IDIBAPS, Barcelona, Spain) for her excellent technical support during the study, and Dr Cristina Villena (CIBERES Pulmonary Biobank, Barcelona, Spain) and Drs Joan Albert Barbera Barberá and Victor I. Peinado (IDIBAPS, Barcelona, Spain) for providing the tissue samples used in the study, as well as all clinical investigators of the ECOS (Exacerbations of COPD in Spain) study.

References

- 1 Cosio MG, Saetta M, Agusti A. Immunologic aspects of chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2009; 360: 2445–2454.
- 2 Vestbo J, Hurd SS, Agusti AG, et al. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary. *Am J Respir Crit Care Med* 2013; 187: 347–365.
- 3 Perera WR, Hurst JR, Wilkinson TM, et al. Inflammatory changes, recovery and recurrence at COPD exacerbation. *Eur Respir J* 2007; 29: 527–534.
- 4 Yazdi AS, Guarda G, Riteau N, et al. Nanoparticles activate the NLR pyrin domain containing 3 (Nlrp3) inflammasome and cause pulmonary inflammation through release of IL-1alpha and IL-1beta. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107: 19449–19454.
- 5 Gasse P, Mary C, Guenon I, et al. IL-1R1/MyD88 signaling and the inflammasome are essential in pulmonary inflammation and fibrosis in mice. *J Clin Invest* 2007; 117: 3786–3799.
- 6 Lucattelli M, Cicko S, Muller T, et al. P2X7 receptor signaling in the pathogenesis of smoke-induced lung inflammation and emphysema. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2011; 44: 423–429.
- 7 Gasse P, Riteau N, Charron S, et al. Uric acid is a danger signal activating NALP3 inflammasome in lung injury inflammation and fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2009; 179: 903–913.
- 8 Riteau N, Gasse P, Fauconnier L, et al. Extracellular ATP is a danger signal activating P2X7 receptor in lung inflammation and fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2010; 182: 774–783.
- 9 Cassel SL, Eisenbarth SC, Iyer SS, et al. The Nalp3 inflammasome is essential for the development of silicosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105: 9035–9040.
- 10 Lommatzsch M, Cicko S, Muller T, et al. Extracellular adenosine triphosphate and chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2010; 181: 928–934.
- 11 Chung KF. Cytokines in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J Suppl* 2001; 34: 50s–59s.
- 12 Gessner C, Scheibe R, Wotzel M, et al. Exhaled breath condensate cytokine patterns in chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Med* 2005; 99: 1229–1240.
- 13 Di Stefano A, Caramori G, Barczyk A, et al. Innate immunity but not NLRP3 inflammasome activation correlates with severity of stable COPD. *Thorax* 2014; 69: 516–524.
- 14 Villena C, Pozo F, Barbera JA, et al. The CIBERES Pulmonary Biobank Consortium: an opportunity for cooperative international respiratory research. *Eur Respir J* 2011; 37: 204–206.
- 15 American Thoracic Society. Standardization of Spirometry, 1994 Update. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152: 1107–1136.
- 16 Roca J, Sanchis J, Agusti-Vidal A, et al. Spirometric reference values from a Mediterranean population. *Bull Eur Physiopathol Respir* 1986; 22: 217–224.
- 17 Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods* 2001; 25: 402–408.
- 18 Rodriguez-Roisin R. Toward a consensus definition for COPD exacerbations. *Chest* 2000; 117: 5 Suppl. 2, 398S–401S.
- 19 Bafadhel M, McKenna S, Terry S, et al. Acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease: identification of biologic clusters and their biomarkers. *Am J Respir Crit Care Med* 2011; 184: 662–671.
- 20 Baroja-Mazo A, Martin-Sanchez F, Gomez AI, et al. The NLRP3 inflammasome is released as a particulate danger signal that amplifies the inflammatory response. *Nat Immunol* 2014; 15: 738–748.

- 21 Franklin BS, Bossaller L, De Nardo D, *et al.* The adaptor ASC has extracellular and 'prionoid' activities that propagate inflammation. *Nat Immunol* 2014; 15: 727–737.
- 22 Franchi L, Nunez G. The Nlrp3 inflammasome is critical for aluminium hydroxide-mediated IL-1beta secretion but dispensable for adjuvant activity. *Eur J Immunol* 2008; 38: 2085–2089.
- 23 Franchi L, Eigenbrod T, Nunez G. Cutting edge: TNF-alpha mediates sensitization to ATP and silica via the NLRP3 inflammasome in the absence of microbial stimulation. *J Immunol* 2009; 183: 792–796.
- 24 Schroder K, Tschopp J. The inflammasomes. *Cell* 2010; 140: 821–832.
- 25 Latz E, Xiao TS, Stutz A. Activation and regulation of the inflammasomes. *Nat Rev Immunol* 2013; 13: 397–411.
- 26 Stutz A, Horvath GL, Monks BG, *et al.* ASC speck formation as a readout for inflammasome activation. *Methods Mol Biol* 2013; 1040: 91–101.
- 27 Lu A, Magupalli VG, Ruan J, *et al.* Unified polymerization mechanism for the assembly of ASC-dependent inflammasomes. *Cell* 2014; 156: 1193–1206.
- 28 Cai X, Chen J, Xu H, *et al.* Prion-like polymerization underlies signal transduction in antiviral immune defense and inflammasome activation. *Cell* 2014; 156: 1207–1222.
- 29 Lee JK, Kim SH, Lewis EC, *et al.* Differences in signaling pathways by IL-1beta and IL-18. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 8815–8820.
- 30 Sarkar A, Mitra S, Mehta S, *et al.* Monocyte derived microvesicles deliver a cell death message via encapsulated caspase-1. *PLoS One* 2009; 4: e7140.
- 31 Laliberte RE, Egger J, Gabel CA. ATP treatment of human monocytes promotes caspase-1 maturation and externalization. *J Biol Chem* 1999; 274: 36944–36951.
- 32 Eltom S, Stevenson CS, Rastrick J, *et al.* P2X7 receptor and caspase 1 activation are central to airway inflammation observed after exposure to tobacco smoke. *PLoS One* 2011; 6: e24097.

Papel del Inflamasoma en la EPOC estable y agudizada

Anexo 7 Protocolo afectación Caspasa-1 con metilprednisolona

- Medir la actividad basal de caspasa-1
- Rellenar las celdas a concentración de 2 millones/ml y sembrar, 5 pozos de una placa de 48 con un ml.

Las condiciones a testar son:

- 0 mg dosis	0	
- 40 mg dosis	0.0008 µg/ml	1 µl de 0.8 µg/ml
- 60 mg dosis	0.0012 µg/ml	1.5 µl de 0.8 µg/ml
- 80 mg dosis	0.0016 µg/ml	2 µl de 0.8 µg/ml
- 200 mg dosis	0.0040 µg/ml	5 µl de 0.8 µg/ml

Urbason 20 mg polvo y disolvente para solución inyectable

1 ampolla contiene 20 mg de metilprednisolona = 20000 µg. Se resuspende con 1000 µl y de esto se hace una dilución 1/10 para que esté a 2000 µg/ml.

Entonces para poder poner 0.0008µg añadiendo 1µl; significa que la solución concentrada debe estar a 0.8µg/ml.

$$V_i \cdot C_i = V_f \cdot C_f$$

$$\frac{5 \mu\text{l} \cdot 2000 \mu\text{g/ml}}{0.8 \mu\text{g/ml}} = V_f = 12,5 \text{ ml}$$

- Dejar 24 horas.
- Medir la actividad de caspasa-1, en situación no estimulada de cada pozo, y estimulando un tubo con ATP y un tubo con nigericina de cada pozo.

- 1- 0 res
- 2- 0 atp
- 3- 0 nig
- 4- 40 res
- 5- 40 atp
- 6- 40 nig
- 7- 60 res
- 8- 60 atp
- 9- 60 nig
- 10- 80 res0
- 11- 80 atp1
- 12- 80 nig2
- 13- 200 res0
- 14- 200 atp1
- 15- 200 nig2

Anexo 8 Afectación Caspasa-1 con metilprednisolona

