



PROGRAMA DE DOCTORADO DE MEDICINA Y CIENCIAS DE LA SALUD

**CARACTERIZACIÓN DE LA DISFUNCIÓN SECRETORA
EXTRACELULAR DEPENDIENTE DE LAS MITOCONDRIAS
(MITOKINAS) EN LOS PACIENTES CON EPOC**

PAULA MARTÍN AUDERA

**Tesis presentada para aspirar al grado de Doctor en Medicina y Ciencias de la Salud
realizada bajo la dirección de los Doctores:**

María Teresa García Unzueta

Carlos Antonio Amado Diago

Santander, mayo de 2023



DÑA. MARÍA TERESA GARCÍA UNZUETA, DOCTORA EN MEDICINA, PROFESORA ASOCIADA POR LA UNIVERSIDAD DE CANTABRIA Y FACULTATIVA ESPECIALISTA DE ÁREA DE BIOQUÍMICA CLÍNICA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO MARQUÉS DE VALDECILLA DE SANTANDER,

CERTIFICA que la presente TESIS DOCTORAL titulada **CARACTERIZACIÓN DE LA DISFUNCIÓN SECRETORA EXTRACELULAR DEPENDIENTE DE LAS MITOCONDRIAS (MITOKINAS) EN LOS PACIENTES CON EPOC**, realizada bajo mi dirección por Dña. Paula Martín Audera, responde a las exigencias científicas de originalidad y rigor propias de un trabajo de esta índole y son fruto de la capacidad técnica e interpretativa de la doctoranda.

Santander, mayo de 2023



D. CARLOS ANTONIO AMADO DIAGO, DOCTOR EN MEDICINA, PROFESOR ASOCIADO POR LA UNIVERSIDAD DE CANTABRIA Y FACULTATIVO ESPECIALISTA DE ÁREA DE NEUMOLOGÍA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO MARQUÉS DE VALDECILLA DE SANTANDER,

CERTIFICA que la presente TESIS DOCTORAL titulada **CARACTERIZACIÓN DE LA DISFUNCIÓN SECRETORA EXTRACELULAR DEPENDIENTE DE LAS MITOCONDRIAS (MITOKINAS) EN LOS PACIENTES CON EPOC**, realizada bajo mi dirección por Dña. Paula Martín Audera, responde a las exigencias científicas de originalidad y rigor propias de un trabajo de esta índole y son fruto de la capacidad técnica e interpretativa de la doctoranda.

Santander, mayo de 2023

“Un país sin investigación es un país sin desarrollo”

Margarita Salas

“El investigador sufre las decepciones, los largos meses pasados en una dirección equivocada, los fracasos. Pero los fracasos también son útiles, porque, bien analizados pueden conducir al éxito. Y para el investigador no existe alegría comparable a la de un descubrimiento, por pequeño que sea...”.

Alexander Fleming

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. María Teresa García Unzueta y al Dr. Carlos Antonio Amado Diago, mis directores de tesis, por su intensa y constante dedicación, su confianza y generosidad durante la realización de este proyecto, así como por sus consejos, su apoyo continuado y su guía. Me siento tremendamente afortunada de haber podido contar con vosotros.

Al Dr. Bernardo Alio Lavín Gómez, quien ha sido mi tutor durante los cuatro años de residencia, en los que además de ayudarme en mi proceso de formación y transmitirme los valores de la profesión, incentivó mi curiosidad investigadora y me impulsó y animó a inscribirme como doctoranda. Gracias por tus consejos, tu tiempo, tu apoyo y paciencia.

A Ana Berja Miguel, Técnica de laboratorio, por su ayuda en este proyecto. Gracias por tu profesionalidad, tu colaboración desinteresada y por tu asistencia y acompañamiento en las largas mañanas de laboratorio durante tantos meses.

A la Dra. Elena Urrestarazu Bolumburu, mi tutora en la Facultad de Medicina y mi primer referente, por haberme apoyado en cada uno de mis pasos. Gracias por tus siempre acertados consejos y por tu cariño.

A mis padres, Inma y Luis, y a mi hermano Miguel (quien inspiró mi vocación de ser médico), increíbles ejemplos de trabajo duro, esfuerzo, constancia y sacrificio, así como de amor y apoyo incondicional.

A Eneko, a quien le he hurtado tanto tiempo por la realización de esta tesis. Gracias por estar a mi lado día a día, por ser mi apoyo en los momentos de flaqueza y por tu confianza eterna.

Y por último a todos mis amigos y compañeros del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla de Santander que, de una forma u otra me ayudaron, me escucharon siempre que lo necesitaba y contribuyeron a que este proyecto saliera adelante.

MUCHISIMAS GRACIAS a todos.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. ETIOLOGÍA DE LA EPOC.....	4
1.1.1. Factores de riesgo	4
1.1.2. Cambios fisiopatológicos	5
1.1.3. Cambios estructurales a largo plazo	6
1.2. PROCESOS FISIOPATOLÓGICOS CLAVE EN NUESTRO ESTUDIO	8
1.2.1. Disfunción muscular en la EPOC	8
1.2.1.1 Fisiopatología de la disfunción muscular en la EPOC ...	10
1.2.1.2 Etiología de la disfunción muscular en la EPOC.....	11
1.2.2. Senescencia celular acelerada	13
1.3. DIAGNÓSTICO	15
1.4. CLÍNICA.....	17
1.4.1. Escala mMRC.....	17
1.4.2. Calidad de vida	18
1.4.3. Bronquitis crónica	20
1.4.4. Agudizaciones.....	20
1.4.4.1 Biomarcadores de las agudizaciones	21
1.4.4.2 Implicaciones para la EPOC.....	25
1.5. CLASIFICACIÓN DE LOS PACIENTES CON EPOC.....	26
1.6. PRONÓSTICO.....	29
1.6.1. Espirometría	29
1.6.2. Test de la marcha de 6 minutos	29
1.6.3. Índice BODE e índice BODEX	29
1.6.4. Disfunción muscular medida por FFMI	32

1.7. TRATAMIENTO	32
1.8. MOLÉCULAS ASOCIADAS CON LAS MITOCONDRIAS	35
1.8.1. Humanina	37
1.8.2. GDF-15.....	39
1.8.3. FGF-21	41
1.8.4. MOTS-c.....	42
1.8.5. Romo1	43
2. HIPÓTESIS.....	45
3. OBJETIVOS.....	49
3.1. OBJETIVO PRINCIPAL.....	51
3.2. OBJETIVOS CONCRETOS.....	51
4. MATERIAL Y MÉTODOS	53
4.1. DISEÑO DEL ESTUDIO	55
4.2. SELECCIÓN DE LOS CASOS A ESTUDIO Y GRUPO CONTROL	55
4.2.1. Ámbito de estudio.....	55
4.2.2. Criterios de inclusión y exclusión	55
4.3. VARIABLES RECOGIDAS	56
4.4. DETERMINACIONES ANALÍTICAS.....	60
4.4.1. Determinaciones básicas	60
4.4.1.1 Creatinina	60
4.4.1.2 Ácido úrico	60
4.4.1.3 Albúmina	61
4.4.1.4 Creatina cinasa	61
4.4.1.5 Proteína C reactiva	61
4.4.2. Determinaciones específicas.....	62
4.4.2.1 Humanina	62

4.4.2.2	GDF-15	63
4.4.2.3	FGF-21	64
4.4.2.4	MOTS-c.....	65
4.4.2.5	Romo1.....	66
4.5.	PROCESAMIENTO DE DATOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO	66
5.	RESULTADOS.....	69
5.1.	POBLACIÓN INCLUIDA EN EL ESTUDIO	71
5.1.1.	Estudio 1.....	73
5.1.2.	Estudio 2.....	77
5.2.	CORRELACIONES ENTRE LAS MOLÉCULAS RELACIONADAS CON LA MITOCONDRIA EN PACIENTES CON EPOC.....	80
5.3.	ASOCIACIÓN DE LOS NIVELES CIRCULANTES DE LAS MOLÉCULAS RELACIONADAS CON LA MITOCONDRIA Y LAS CARACTERÍSTICAS BASALES DE LA EPOC	81
5.3.1.	Humanina.....	82
5.3.2.	GDF-15.....	84
5.3.3.	FGF-21	86
5.3.4.	MOTS-c.....	88
5.3.5.	Romo1.....	90
5.4.	MOLÉCULAS RELACIONADAS CON LA MITOCONDRIA Y SU RELACIÓN CON LA CAPACIDAD DE EJERCICIO	92
5.4.1.	Como predictores del TM6M	92
5.4.2.	Como predictores de desaturación de oxígeno.....	93
5.5.	MOLÉCULAS RELACIONADAS CON LA MITOCONDRIA COMO PREDICTORES DE AGUDIZACIONES.....	94
5.5.1.	Como predictores de agudizaciones moderadas.....	94
5.5.2.	Como predictores de hospitalizaciones	97

6. DISCUSIÓN.....	101
6.1. NIVELES DE MOLÉCULAS RELACIONADAS CON LA MITOCONDRIA EN LOS PACIENTES CON EPOC.....	103
6.1.1. Humanina.....	103
6.1.2. GDF-15.....	105
6.1.3. FGF-21	106
6.1.4. MOTS-c.....	108
6.1.5. Romo1	109
6.2. RELACIÓN DE LAS MOLÉCULAS RELACIONADAS CON LA MITOCONDRIA ENTRE SÍ EN EL CONTEXTO DE LA EPOC.....	110
6.3. ASOCIACIÓN DE LAS MOLÉCULAS RELACIONADAS CON LA MITOCONDRIA CON CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LA EPOC	110
6.3.1. Humanina.....	111
6.3.2. GDF-15.....	111
6.3.3. FGF-21	112
6.3.4. MOTS-c.....	113
6.3.5. Romo1	114
6.4. MOLÉCULAS RELACIONADAS CON LA MITOCONDRIA COMO PREDICTORES DEL TM6M Y DE LA DESATURACIÓN DE OXÍGENO	114
6.5. MOLÉCULAS RELACIONADAS CON LA MITOCONDRIA COMO PREDICTORES DE AGUDIZACIONES E INGRESOS HOSPITALARIOS.....	116
7. CONCLUSIONES.....	121
8. BIBLIOGRAFÍA	125
9. ANEXOS Y PUBLICACIONES.....	149

ABREVIATURAS

A1AT	Déficit de alfa-1-antitripsina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AMPK	Proteína cinasa activada por monofosfato de adenina
ATF	<i>Activating transcription factor</i>
ATS	<i>American Thoracic Society</i>
Bak	<i>Bcl-2-antagonist/killer</i>
BD	Broncodilatador
BCG	Verde de bromocresol
CAT	<i>COPD Assessment Test</i>
CCQ	<i>COPD Control Questionnaire</i>
CEIm	Comité de Ética de la investigación con medicamentos
CI	Corticoides inhalados
CK	Creatina cinasa
CRQ	<i>Chronic Respiratory Disease Questionnaire</i>
DM	Diabetes mellitus
DS	Desviación estandar
ECLIPSE	<i>Evaluation of COPD Longitudinally to Identify Predictive Surrogate Endpoints</i>
EIA	Enzimoinmunoensayo competitivo de alta sensibilidad
ELISA	<i>Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay</i>
EPISCAN	<i>Epidemiologic Study of COPD in Spain</i>
EPOC	Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica
ESPEN	<i>European Society for Clinical Nutrition and Metabolism</i>
EGR-1	<i>Early growth response 1</i>
FEV1	Volumen espiratorio forzado en el primer segundo
FFM	<i>Fat free mass</i> (masa libre de grasa)
FFMI	<i>Fat free mass index</i> (índice de masa corporal libre de grasa)
FGF-21	Factor de crecimiento fibroblástico 21
FVC	Capacidad vital forzada
GDF-15	Factor de crecimiento y desarrollo 15

GesEPOC	Guía española de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica
GFRAL	Receptor alfa-like del factor neurotrófico derivado de la glía
GMCSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos
GOLD	<i>Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease</i>
GPCR	<i>G protein-coupled receptor</i>
HN	Humanina
HR	<i>Hazard ratio</i>
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
HUMV	Hospital Universitario Marqués de Valdecilla
IC	Intervalo de confianza
IFCC	<i>The International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine</i>
IGF1	Factor de crecimiento similar a la insulina 1
IGFBP3	<i>Insulin-like growth factor binding protein 3</i>
IL	Interleucina
IMC	Índice de masa corporal
IPA	Índice paquetes-año
IMM	Índice de masa magra
LABA	<i>Long acting beta 2 agonists</i> (agonistas beta 2 adrenérgicos de acción larga)
LAMA	<i>Long acting muscarinic antagonist</i> (anticolinérgicos de acción larga)
LTB4	Leucotrieno-B4
MAFBx	<i>Muscle atrophy F-box</i>
MCP-1	Proteína quimiotáctica de monocitos 1
MMA	Índice de masa magra apendicular
MMPs	Metaloproteinasas de matriz
mMRC	<i>modified Medical Research Council</i>
MT-RNR2	Humanina
MOTS-c	<i>Mitochondrial ORF of the Twelve S-c</i>
MPO	Mieloperoxidasa
MRC	<i>Medical Research Council</i>
MR-proADM	Proadrenomedulina

mtDNA	Ácido desoxirribonucleico mitocondrial
mTOR	<i>Mammalian Target of Rapamycin</i>
MuRF1	<i>Muscle RING finger 1</i>
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducida
nDNA	Ácido desoxirribonucleico del núcleo
NF-Kb	Factor nuclear kappa B
nm	nanometros
NRF2	Factor nuclear derivado del eritroide 2
OR	<i>Odds ratio</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	Proteína C reactiva
PCT	Procalcitonina
PI3K	Fosfatidilinositol-3-cinasa
RNA	Ácido ribonucleico
RNS	Especies reactivas de nitrógeno
Romo1	<i>Reactive oxygen species modulator 1</i>
ROS	Especies reactivas de oxígeno
rRNA	RNA ribosómicos
SABA	<i>Short-acting beta 2 agonists</i> (beta 2 adrenérgicos de corta duración)
SAMA	<i>Short-acting antimuscarinics</i> (antimuscarínicos de corta duración)
SASP	Secretor asociado a la senescencia
SatO₂	Saturación de oxígeno
SHLPs 1-6	Seis péptidos pequeños similares a la Humanina
SMADs	<i>Mothers against decapentaplegic homologs</i>
sORFs	<i>Short open reading frames</i>
TM6M	Test de la marcha de 6 minutos
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
tRNA	RNA de transferencia
UDESTA	Unidad de deshabituación tabáquica
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

La enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) es una enfermedad pulmonar inflamatoria crónica caracterizada por una obstrucción de las vías aéreas, poco reversible, que afecta fundamentalmente a las vías de pequeño tamaño y se asocia a la destrucción del parénquima pulmonar (Barnes PJ 2017). Es una patología muy frecuente entre la población adulta, siendo además una patología prevenible ya que es causada principalmente por una exposición crónica y significativa a partículas o gases nocivos, fundamentalmente al humo del tabaco (GOLD 2022).

La EPOC es una de las tres principales causas de muerte en todo el mundo y el 90% de estas muertes ocurren en países de ingresos bajos y medios (Halpin DMG *et al* 2019). Es una patología que, aunque tradicionalmente se asociaba al género masculino, en los últimos años esta tendencia se ha equilibrado y es igualmente común en mujeres y hombres, lo que refleja la prevalencia del tabaquismo en la población, fundamentalmente en los países desarrollados (Barnes PJ 2017).

Concretamente en España, según el estudio EPISCAN-II (Epidemiologic Study of COPD in Spain, 2021) la prevalencia de esta enfermedad ha aumentado hasta casi el 12% en los últimos 10 años (14,6% en hombres y un 9,4% en mujeres). También en este estudio se ha observado un importante infradiagnóstico de la EPOC, con un 74,7%, todavía mayor en mujeres (80,6% versus un 70,4% en varones), datos que no han mejorado en los últimos años (Soriano JB *et al* 2021). Además, esta patología se ha relacionado con la edad, existiendo evidencias de una relación con los procesos de envejecimiento acelerado (Soriano JB *et al* 2021).

A nivel mundial se prevé que la carga asistencial de la EPOC aumente en las próximas décadas, fundamentalmente a causa del envejecimiento de la población y a la continua exposición de los factores de riesgo de la EPOC (principalmente debido al perpetuamiento del hábito tabáquico) (Mathers CD *et al* 2006). Este aumento de la carga asistencial supondrá que en los próximos años el coste sanitario de esta patología aumente considerablemente (Mannino DM *et al* 2007).

Si bien es cierto que existen estudios que dicen que solamente el 15-20% de los fumadores desarrollarán EPOC, lo que podría sugerir una predisposición genética y la posible implicación de otros factores ambientales en la patogénesis de la EPOC (Rovina N *et al* 2013), hay que tener en cuenta que existe un importante infradiagnóstico de esta enfermedad (Soriano JB *et al* 2021).

El diagnóstico de la EPOC se basa en la realización de una espirometría con test broncodilatador (BD), que puede presentar varias limitaciones. Entre ellas, el limitado acceso a este tipo de pruebas en determinadas regiones, la necesidad de un personal formado y especializado en este procedimiento, una técnica espirométrica adecuada por parte del paciente, etc. Además, existen una serie de alteraciones que pueden generar sintomatología pulmonar secundaria al humo del tabaco, como el enfisema, que no son detectables con la espirometría y que no se incluyen en la definición actual de EPOC. Es por ello por lo que, en los últimos años, ha habido varios intentos de utilizar biomarcadores en sangre que ayuden y faciliten el diagnóstico y seguimiento de esta enfermedad.

1.1. ETIOLOGÍA DE LA EPOC

1.1.1. FACTORES DE RIESGO

En los países desarrollados el tabaquismo es la principal causa de EPOC. Concretamente el humo del tabaco induce en nuestro organismo más de 4000 tóxicos, como los radicales libres de oxígeno, que actúan alterando el proceso de respiración celular (Steffl M *et al* 2015) y provoca el reclutamiento de granulocitos, eosinófilos y otras células inflamatorias que perpetúan la inflamación pulmonar.

Aunque la mayoría de los pacientes con EPOC tienen un historial previo de tabaquismo, solamente el 20% de los fumadores desarrollarán esta patología. Es por ello, por lo que se debate sobre la implicación de otros factores involucrados en el desarrollo de la EPOC (Rovina N *et al* 2013). Algunos de los factores que más se han relacionado han sido, el déficit de alfa-1-antitripsina (A1AT), el desarrollo anormal de los

pulmones durante el crecimiento, el asma o la bronquitis crónica, así como la existencia de una historia de infecciones pulmonares de repetición durante la niñez (GOLD 2022).

De ellos, el más estudiado ha sido el déficit de A1AT, una condición genética causada por mutaciones en el gen SERPINA1, que provoca un déficit de esta proteína con capacidad inhibitoria, fundamentalmente contra la elastasa de neutrófilos, y que está presente en un gran número de pacientes con EPOC (Blanco I *et al* 2020).

El período comprendido desde el desarrollo embrionario dentro del útero materno hasta la adolescencia es un momento significativo para el desarrollo normal de la función pulmonar. Ciertas circunstancias, como el asma infantil, las infecciones del tracto respiratorio inferior o la exposición a la contaminación medioambiental, podrían contribuir a una vía alternativa del desarrollo de la EPOC (Lange P *et al* 2015).

1.1.2. CAMBIOS FISIOPATOLÓGICOS

De modo esquemático se podría explicar la limitación al flujo aéreo en pacientes con EPOC por dos procesos: el remodelado y estrechamiento de las vías de pequeño calibre y la destrucción del parénquima pulmonar, con la consecuencia de pérdida de reclutamientos alveolares y el enfisema como último punto (Barnes PJ 2016). Estos cambios disminuyen la capacidad de las vías respiratorias para permanecer dilatadas durante la espiración, lo que puede contribuir a la limitación del flujo de aire y a la disfunción mucociliar, que es un rasgo característico de la enfermedad (GOLD 2022).

En condiciones normales, las células endoteliales revisten la estructura vascular pulmonar, formando una simple capa de células que producen una delgada envoltura extracelular de colágeno, proteoglicanos y lamininas, denominada membrana basal (Hallmann R *et al* 2005).

Las células epiteliales al entrar en contacto con las partículas nocivas se activan para producir mediadores inflamatorios, incluidos el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), la interleucina 1b (IL-1b), el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) y la interleucina 8 (IL-8), entre otros (Rovina N *et al* 2013).

Centrándonos en el tabaco, que es la principal causa de EPOC en nuestro medio, se sabe que el humo del cigarro aumenta la producción de granulocitos, causa infiltración neutrofílica y eosinofílica pulmonar e inflamación que conduce al reclutamiento de más neutrófilos y de otras células inflamatorias dentro del pulmón persistiendo la inflamación pulmonar (Aaron CP *et al* 2014).

Además, el tabaco no actúa solamente a nivel pulmonar como acabamos de ver, sino que altera también la síntesis proteica a nivel muscular y activa las vías inductoras de atrofia muscular como la miostatina-SMADs (mothers against decapentaplegic homologs), MAFBx (muscle atrophy F-box), NF-Kb (nuclear factor kB), ligasas músculo-específicas ubiquitina-E3, MuRF1 (muscle RING finger 1), entre otras (Steffl M *et al* 2015) (Springer J *et al* 2004) (Jaitovich A *et al* 2015). Esto cobra vital importancia cuando se presenta de forma concomitante con la sarcopenia como veremos más adelante.

Por último, como resultado de todo este proceso de inflamación producida por los contaminantes inhalados, los mediadores quimiotácticos activan las células del sistema inmune (linfocitos T CD8+, neutrófilos, monocitos y linfocitos) que perpetúan todo el proceso. Como consecuencia de esta inflamación, con el tiempo se van produciendo cambios estructurales permanentes (engrosamiento de la membrana basal, una mayor fragmentación...) dando lugar a obstrucción y síntomas respiratorios crónicos en las vías aéreas (Stockley RA *et al* 2009) (Rovina N *et al* 2013).

1.1.3. CAMBIOS ESTRUCTURALES A LARGO PLAZO

Como consecuencia indirecta del medio pulmonar alterado (hipoxia, vasoconstricción y lesión de la matriz extracelular) se producen cambios en el tejido relacionados con el revestimiento endotelial (Szucs B *et al* 2019). Además del estrechamiento de las vías respiratorias pequeñas, se produce una destrucción del parénquima pulmonar que conlleva la pérdida de las uniones alveolares de estas vías, disminuyendo el retroceso elástico pulmonar (GOLD 2022). En general, todos estos cambios persisten al dejar de fumar (GOLD 2022) y finalmente, se acaba produciendo una fibrosis local irreversible (Rovina N *et al* 2013).

Existen diversas citoquinas y quimioquinas que actúan como mediadores inflamatorios en la EPOC que facilitan los cambios estructurales a largo plazo. Entre esos mediadores inflamatorios se encuentran las metaloproteinasas de matriz (MMPs), que son enzimas proteolíticas que degradan los componentes de la matriz tanto en condiciones fisiológicas como en procesos patológicos (Churg A *et al* 2012). Las MMPs en la EPOC aumentan la inflamación al generar péptidos quimiotácticos que atraen a los neutrófilos. Más concretamente, las MMP-10 y MMP-12 juegan un papel importante sobre todo en el desarrollo del enfisema pulmonar (Gharib SA *et al* 2018) (Churg A *et al* 2012) (NavratilovaZ *et al* 2016).

El enfisema se desarrolla en alrededor del 20% de los fumadores y es el agrandamiento permanente de los espacios aéreos distales a los bronquiolos terminales (es decir, los alvéolos) (Gharib SA *et al* 2018). Algunos estudios han observado que la edad y el historial de tabaquismo acumulado, expresado como paquetes-año (que es el cálculo de multiplicar el número de paquetes de cigarrillos que una persona fuma cada día, por el número de años que ha estado fumando) se asociaron con más enfisema de base, desarrollándose lentamente después de fumar de 20 a 30 paquetes-año (Coxson HO *et al* 2013) (Gharib SA *et al* 2018).

En el estudio ECLIPSE (Evaluation of COPD Longitudinally to Identify Predictive Surrogate Endpoints), también se demostró que, a mayor severidad en el grado de obstrucción al flujo aéreo también había mayor enfisema. Además, aunque las mujeres tenían menos destrucción pulmonar al inicio del estudio, durante el seguimiento mostraron una progresión más rápida (Coxson HO *et al* 2013).

Lo que parece evidente es que la respuesta inflamatoria crónica característica de la EPOC puede inducir la destrucción del tejido parenquimatoso (lo que resulta en enfisema) y la interrupción de los mecanismos normales de reparación y defensa (lo que conduce a una fibrosis de las vías respiratorias pequeñas) (GOLD 2022).

La inflamación sistémica puede estar presente y podría desempeñar un papel añadido en las múltiples condiciones comórbidas que se encuentran en los pacientes con EPOC (Barnes PJ 2016). Por ejemplo, el proceso finalmente promueve la alteración del endotelio vascular pulmonar que conlleva a enfermedades cardiovasculares, tales

como la disfunción ventricular derecha, la hipertensión pulmonar, la enfermedad coronaria y la aterosclerosis (Falk JA *et al* 2008).

Varios estudios han mostrado un aumento de la prevalencia de las comorbilidades en pacientes con EPOC comparándolos con fumadores sin EPOC y con no fumadores. Teniendo en cuenta estos estudios, se plantea la cuestión de si las alteraciones pulmonares sistémicas y la EPOC se relacionan mediante un mecanismo patogénico común o si las manifestaciones sistémicas están directamente impulsadas y/o empeoradas por las alteraciones pulmonares (Boyer *et al* 2018).

Los últimos estudios publicados en este ámbito han propuesto que en el desarrollo y la progresión de la enfermedad intervienen procesos que van más allá de la inflamación crónica, como son la senescencia celular, la apoptosis y el estrés oxidativo, mecanismos que trataremos más adelante (Szucs B *et al* 2019) (Barnes PJ 2017).

1.2. PROCESOS FISIOPATOLÓGICOS CLAVE EN NUESTRO ESTUDIO

1.2.1. DISFUNCIÓN MUSCULAR EN LA EPOC

La masa muscular tiene un papel fundamental en la EPOC, cobrando cada vez más importancia clínica, ya que ha demostrado ser un factor pronóstico independiente de mala evolución de la enfermedad, además de un importante factor a tener en cuenta en la calidad de vida de estos pacientes (Swallow EB *et al* 2007).

La nutrición es también de gran relevancia en los pacientes con EPOC, ya que el grado de malnutrición se asocia con una mayor probabilidad de resultados adversos, entre los que se incluyen caídas, fracturas, discapacidad física y mortalidad (Cruz-Jentoft AJ *et al* 2019).

Según la ERS (European Respiratory Society) existen varios fenotipos metabólicos en la EPOC (Schols AM *et al* 2014) (Tabla 1) que tienen en cuenta el índice de masa muscular corporal (IMC), el índice de masa magra apendicular (MMA) o el índice de masa libre de grasa llamado por sus siglas en inglés FFMI (*fat free mass index*).

Tabla 1. Fenotipos metabólicos. Tabla adaptada de Schols AM *et al* 2014.

Fenotipos metabólicos	Definición	Riesgo clínico
Obesidad	IMC 30-35 kg/m ²	Riesgo cardiovascular aumentado
Obesidad mórbida	IMC >35 kg/m ²	Riesgo cardiovascular aumentado Deterioro del rendimiento físico
Obesidad sarcopénica	IMC 30-35 kg/m ² y MMA <2 DS por debajo de la media de los valores de referencia.	Riesgo cardiovascular aumentado Deterioro del rendimiento físico
Sarcopenia	MMA <2 DS por debajo de la media de los valores de referencia	Mayor riesgo de mortalidad Deterioro del rendimiento físico
Caquexia	Pérdida de peso involuntaria >0,5% en 6 meses y FFMI <17 kg/m ² en varones y <15 kg/m ² en mujeres	Mayor riesgo de mortalidad Deterioro del rendimiento físico
Precaquexia	Pérdida de peso >5% en 6 meses	Mayor riesgo de mortalidad

IMC: índice de masa corporal, MMA: índice de masa magra apendicular, DS: desviaciones estándar, FFMI: fat free mass index o índice de masa libre de grasa.

Existen otras formas de medir el grado de malnutrición, por ejemplo, según el consenso ESPEN (Early Career Faculty The European Society for Clinical Nutrition and Metabolism), el diagnóstico de desnutrición asociada a la enfermedad se determina con un IMC <18,5 kg/m² o 18,5-22 kg/m², combinado con FFMI bajo (<17 kg/m² para hombres y <15 kg/m² para mujeres) (Cederholm T *et al* 2015).

La compleja interacción entre los pacientes con EPOC, el estilo de vida y las comorbilidades producidas por los desencadenantes en músculo, hueso y tejido adiposo (Schols AM *et al* 2014), hacen que sea la malnutrición un problema complejo, cada vez más común, cuya prevalencia está aumentando a nivel mundial (Shafiee G *et al* 2017).

1.2.1.1 Fisiopatología de la disfunción muscular en la EPOC

El músculo está compuesto por distintos tipos de fibras musculares: las fibras tipo I, también llamadas fibras rojas o lentas y las tipo II (que a su vez se subdividen en tipo IIa y IIb) llamadas blancas o rápidas (Maltais F *et al* 2014).

Las fibras tipo I se caracterizan por tener una gran concentración de mitocondrias y más reservas de oxígeno. Además, se encuentran enervadas por unidades motoras “lentas” y se caracterizan por poseer una potente vascularización, haciéndolas ideales para realizar procesos aeróbicos y resistir a la fatiga, aunque tarden tiempo en responder a los estímulos. En cambio, las fibras tipo II se contraen más rápidamente, están menos vascularizadas y contienen menos mitocondrias, haciéndolas perfectas para procesos anaeróbicos, generando contracciones fuertes, pero poco resistentes (Barreiro E *et al* 2016).

Una contribución más a la caracterización de estas tres principales poblaciones de fibras se basa en estudios bioquímicos. En concreto, tanto las fibras IIa como las IIb tienen niveles altos de enzimas glicolíticas, pero diferentes complementos de enzimas oxidativas. Este hecho condujo a la clasificación de: fibras de tipo oxidativo lento (I), fibras glucolíticas oxidativas de contracción rápida o fibras musculares intermedias (IIa) y fibras glucolíticas de contracción rápida (IIb) (Schiaffino S *et al* 2011).

Cada músculo tiene una concentración diferente de fibras musculares dependiendo de la función que deba realizar, y es esta composición la que se ve alterada, no solamente con la edad, si no en otros procesos como en la EPOC (Gosker HR *et al* 2007). La disponibilidad nutricional (glucógeno almacenado en el músculo) es el principal contribuyente a la resistencia muscular, mientras que la masa muscular y el tamaño de las fibras musculares determinan la fuerza (Schiaffino S *et al* 2011).

La disfunción muscular se relaciona con varios factores de riesgo, entre los que destacan los factores hormonales, el aumento del estrés oxidativo intracelular, la reducción de la ingesta de alimentos, la edad avanzada, el bajo índice de masa corporal, o la baja actividad física (Jo D *et al* 2022).

En la EPOC, existe un elemento clave que determina la disfunción muscular conocido como cambio de tipo de fibra (Fibre-type switch), que ocurre fundamentalmente por dos procesos: la atrofia selectiva de las fibras musculares y la desregulación de la expresión génica.

La atrofia selectiva provoca en la musculatura esquelética un aumento relativo de las fibras blancas con respecto a las fibras rojas, mientras que en la musculatura respiratoria ocurre lo contrario. El segundo proceso ocurre debido a que incluso en ausencia de la atrofia, la expresión de los genes que regulan el desarrollo de un tipo de fibra puede desregularse y el otro realizarse, resultando en un cambio en su perfil metabólico (Jaitovich A *et al* 2018).

Todo ello se traduce en un peor manejo de la energía a nivel muscular que impacta de forma negativa en la masa muscular, generando mayor disnea, peor calidad de vida y peor pronóstico de estos pacientes (Gosker HR *et al* 2007). Hay que tener en cuenta que es posible que otros factores también puedan contribuir al cambio del tipo de fibra y al rendimiento del músculo en los pacientes con EPOC (Barreiro E *et al* 2016).

1.2.1.2 Etiología de la disfunción muscular en la EPOC

Muchos de los factores que están implicados en la disfunción muscular de la EPOC no actúan de forma aislada, si no que varias de sus vías se cruzan o se superponen en relación con el estrés oxidativo (Meng SJ *et al* 2010).

Entre los factores de riesgo para desarrollar disfunción muscular, se encuentra fundamentalmente el humo del tabaco (Steffl M *et al* 2015), aunque la relación causal todavía no está clara ya que no todos los fumadores acaban desarrollando alteraciones musculares como ya hemos comentado (Miravittles M *et al* 2014).

Otros factores identificados con un impacto negativo sobre la musculatura en pacientes con EPOC han sido la carga genética, la inflamación sistémica, la inactividad o la edad (Barreiro E *et al* 2016).

En cuanto a la predisposición genética a desarrollar atrofia muscular se explica fundamentalmente porque pacientes con EPOC con la misma gravedad, pueden tener distinta cantidad de masa muscular (Barreiro E 2016). Se sabe que la expresión de determinados microRNA influyen en la pérdida de masa muscular y son, por ello, potenciales dianas terapéuticas en la EPOC (Barreiro E 2016). Otro ejemplo conocido es la presencia de polimorfismos genéticos como el de la enzima convertidora de angiotensina, donde la expresión de un alelo en concreto está asociada con una mayor fuerza del cuádriceps independientemente de otros factores (Hopkinson NS *et al* 2004).

La inflamación de bajo grado causada, entre otros, por los efectos anoréxicos de las citoquinas proinflamatorias como el TNF- α , es otra causa conocida de disfunción muscular en la EPOC (Howard C *et al* 2007). La nutrición es un factor crucial en la prevención de la sarcopenia, concretamente, en el músculo esquelético de un adulto la reducción calórica se asocia con una reducción del tamaño de las fibras musculares y a una reducción de la masa muscular (Howard C *et al* 2007) (Lu Y *et al* 2017).

Uno de los síntomas principales de la EPOC es la disnea, que obstaculiza la realización de ejercicio y contribuye a la disfunción muscular. La inactividad de estos pacientes se explica por la dificultad respiratoria que genera la propia enfermedad, que viene determinada por varios mecanismos, como el hecho de que las vías respiratorias periféricas atrapan progresivamente el gas durante la espiración, provocando una hiperinsuflación, la alteración de la difusión, etc. Esto genera, además, una limitación de la capacidad de ejercicio (GOLD 2022) que puede llegar a alterar la composición corporal e inducir el “Fibre-type switch” mencionado anteriormente.

Es por ello que el ejercicio es un tratamiento recomendado para todo paciente (ajustado según sus capacidades físicas) independientemente de su estado basal (GOLD 2022), ya que incrementa la proporción de fibras musculares tipo I, la innervación y la angiogénesis muscular (Troosters T *et al* 2010), mejorando significativamente su calidad de vida.

En relación a la edad, es bien conocido que existe un deterioro significativo de la función pulmonar que se da con el aumento de los años, concretamente el envejecimiento está asociado con una reducción progresiva de la capacidad pulmonar

total, la fuerza de los músculos respiratorios y el retroceso pulmonar y hay, por tanto, una disminución de la capacidad para eliminar dióxido de carbono, características muy similares a los pacientes con EPOC (MacNee W 2016).

Otro importante mecanismo amplificador de la EPOC es el estrés oxidativo (Domej W *et al* 2014), que está causado por un desequilibrio en los niveles de oxidantes y antioxidantes (Barreiro E *et al* 2016), o lo que es lo mismo, entre la producción de radicales libres y la capacidad del cuerpo para combatirlos. Los oxidantes son generados fundamentalmente por la exposición a factores ambientales como el humo del cigarrillo, la contaminación y otras partículas inhaladas (Jiang Y *et al* 2017), y son liberados por las células inflamatorias activadas, como los macrófagos y los neutrófilos (GOLD 2022).

Los radicales libres son especies químicas altamente reactivas que pueden dañar las células y el ADN, y pueden contribuir a enfermedades crónicas como el cáncer o las enfermedades cardíacas (Siu PM *et al* 2008). Además de dañar directamente las células musculares, aumentando la degradación de las proteínas musculares y la inflamación del cuerpo, los radicales libres pueden afectar a la capacidad del cuerpo para metabolizar los nutrientes necesarios para desarrollar el tejido muscular y, por tanto, pueden contribuir a la pérdida de masa muscular y a la atrofia muscular (Meng SJ *et al* 2010) (Siu PM *et al* 2008) (Howard C *et al* 2007).

La predisposición del envejecimiento del músculo esquelético a consecuencia de la existencia de mayores niveles de estrés oxidativo tanto en reposo como durante la atrofia por desuso (Siu PM *et al* 2008), sugiere que el estrés oxidativo tiene un papel en la sarcopenia y en la pérdida de masa muscular, todo ello muy relacionado con la senescencia celular.

1.2.2. SENESCENCIA CELULAR ACELERADA

Existe una nueva corriente de investigación que considera que lo que subyace a la EPOC es un tipo de senescencia celular acelerada asociada a un proceso inflamatorio crónico ("inflammaging"), que no solo afecta al aparato respiratorio, sino también a muchas otras partes del organismo (músculo esquelético, aparato cardiovascular,

metabolismo global, sistema inmunológico, etc.) todo ello relacionado con el estrés oxidativo (Barnes PJ 2017) (Birch J *et al* 2018) (Campisi J 2016) (Choudhury G *et al* 2017) (Habiballa L *et al* 2019) (Lerner CA *et al* 2016) (MacNee W 2016) (Salvioli S *et al* 2013) (Yue L *et al* 2016).

El envejecimiento celular es un proceso caracterizado por la disminución progresiva de la homeostasis que ocurre después de la fase reproductiva de la vida, lo que resulta en un mayor riesgo de enfermedad o muerte (Kirkwood TB 2005). En cambio, la senescencia celular es una respuesta de estrés compleja, que ocurre en células que tienen el potencial de sufrir división celular (Campisi J 2016).

Las células senescentes pueden ser beneficiosas o perjudiciales para el organismo, porque, aunque el exceso de especies reactivas de oxígeno (ROS) induce la acumulación de moléculas dañinas, acortando la vida útil celular, se requiere un nivel óptimo de ROS para un envejecimiento saludable (Hekimi S *et al* 2011). Por ejemplo, la senescencia celular es un potente mecanismo anticancerígeno, tanto en prevenir la transformación maligna como en limitar el progreso del tumor, así como beneficioso durante el desarrollo embrionario y la cicatrización de heridas de manera aguda. En la EPOC, sin embargo, provoca un efecto perjudicial (Birch J *et al* 2018).

Existen una serie de factores que aceleran concretamente el envejecimiento en las células de los pacientes con EPOC además de la senescencia celular ya mencionada: el acortamiento de telómeros, la activación de la señalización PI3K-mTOR, la disminución de la autofagia, la reparación defectuosa del ADN, la disfunción mitocondrial, el agotamiento de células madre, la inmunosenescencia, el patrón anormal de microARN, cambios epigenéticos y disminución de moléculas antienvjecimiento (Barnes PJ 2017).

Una teoría popular del envejecimiento propone que el estrés oxidativo es un factor clave del envejecimiento acelerado y que las ROS formadas durante el metabolismo normal del oxígeno inducen daño, cuya acumulación explicaría los cambios progresivos descritos como senescencia celular (Barnes PJ 2017).

Estos ROS, junto a diferentes oncogenes y compuestos citotóxicos, se han incluido en una serie de factores que causan senescencia celular antes del inicio del agotamiento

replicativo, denominados "inductores de senescencia prematura inducida por el estrés" ("stress-induced premature senescence") (Kuilman T *et al* 2010).

Las ROS y las especies reactivas de nitrógeno (RNS) son el resultado tanto de fuentes ambientes como del humo del cigarrillo. Las ROS en el humo del cigarrillo incluyen especies no radicales, como el peróxido de hidrógeno, o radicales de oxígeno, como el anión superóxido (O_2^-) y el radical hidroxilo, que son extremadamente inestables capaces de provocar aún más la oxidación y acelerar la senescencia replicativa (Choudhury G *et al* 2017).

Las células tienen un número limitado de divisiones antes de que se detengan o se hagan senescentes. Sin embargo, estas células senescentes no son funcionalmente inertes ya que permanecen metabólicamente activas, por lo que además alteran el medio ambiente mientras persisten (Barnes PJ 2017).

Es entonces cuando muestran un fenotipo único, denominado "secretor asociado a la senescencia" (SASP), que se ha postulado como inicio de la cascada inflamatoria que se ve en los pacientes con EPOC, con secreción de citocinas proinflamatorias, quimiocinas y MMPs (Choudhury G *et al* 2017) (Salama R *et al* 2014).

El conjunto de estos tres aspectos, la acumulación de tejido inflamatorio dañado, la disregulación del sistema inmunitario y las células senescentes que siguen secretando citocinas, es lo que se ha denominado "inflammaging" y es lo que perpetúa el envejecimiento celular de los pacientes con EPOC (MacNee W 2016).

1.3. DIAGNÓSTICO

La espirometría es la principal prueba de función pulmonar y resulta imprescindible para la evaluación y el seguimiento de las enfermedades respiratorias (García-Rio F *et al* 2013). Según la GesEPOC (Guía Española de la EPOC), la sospecha diagnóstica debe estar presente ante un adulto fumador o exfumador de más de 10 paquetes-año o sometido a una exposición crónica a tóxicos inhalados, que presente síntomas respiratorios como disnea o tos crónica con o sin expectoración.

La realización de una espirometría, en situación clínica de estabilidad, permite confirmar el diagnóstico al demostrar un cociente inferior a 0,7 entre el volumen espiratorio máximo en el primer segundo (FEV1) y la capacidad vital forzada (FVC) tras la prueba broncodilatadora (Miravittles M *et al* 2021).

La prueba de reversibilidad de la limitación al flujo aéreo, comúnmente denominada prueba de broncodilatación, consiste en la medición de la función pulmonar antes y después de administrar un broncodilatador de acción rápida. El estudio de la reversibilidad bronquial está indicado ante la sospecha de distintas patologías respiratorias, entre las que se encuentra la EPOC (García-Rio F *et al* 2013).

Hay que tener en cuenta que, como resultado de la variación biológica, puede ser necesario reevaluar al paciente y repetir la prueba en los casos en los que el valor se encuentre entre 0,6 y 0,8 (GOLD 2022). Además, este criterio puede dar lugar a falsos negativos en jóvenes y falsos positivos en ancianos, ya que este cociente desciende fisiológicamente con el envejecimiento (Miravittles M *et al* 2021) (Vollmer WM *et al* 2009).

En cuanto a la validez de la técnica, se debe aceptar como correcta aquella cuyo inicio haya sido rápido, continuo y sin vacilaciones, y cuya finalización sea suave y no muestre una interrupción temprana ni abrupta de la respiración (García-Rio F *et al* 2013).

Las ventajas fundamentales de la espirometría en la práctica clínica habitual son la gran facilidad y reproductibilidad de los resultados, además de ser una prueba no invasiva y que se encuentra disponible en muchos hospitales y centros especializados (GOLD 2022).

En las últimas guías EPOC (GOLD 2022), ya no se recomienda evaluar el grado de reversibilidad de la limitación del flujo aéreo para tomar las decisiones terapéuticas. En consecuencia, no es necesario suspender la medicación inhalada antes de las mediciones de espirometría durante el seguimiento de los pacientes.

1.4. CLÍNICA

Se debe considerar la existencia de la EPOC en cualquier paciente que tenga disnea (que se define como la sensación subjetiva de falta de aire o dificultad para respirar), tos crónica o producción de esputo, y/o antecedentes de exposición a factores de riesgo de la enfermedad (GOLD 2022). La disnea crónica y progresiva es el síntoma más característico de la EPOC y es una de las principales causas de discapacidad y ansiedad asociadas con la enfermedad (Miravittles M *et al* 2014). También puede haber una limitación importante del flujo de aire sin disnea crónica y/o tos y producción de esputo y viceversa (Montes de Oca M *et al* 2010).

La tos con producción de esputo está presente hasta en el 30% de los pacientes (GOLD 2022). Si se produce de manera regular durante 3 meses o más en 2 años consecutivos, es la definición clásica de bronquitis crónica (Medical Research Council by their Committee on the Aetiology of Chronic Bronchitis, 1965), aunque no deja de ser una definición arbitraria que no concuerda con la totalidad de pacientes con EPOC, ya que muchos tienen recurrencias y periodos sin sintomatología (Vogelmeier CF *et al* 2017).

1.4.1. ESCALA mMRC

La disnea es el síntoma principal y constante en los pacientes con EPOC por lo que se han ido desarrollando diversos instrumentos de medida y valoración, pudiendo ser unidimensionales o multidimensionales (Casanova Macario C *et al* 2005).

La escala MRC (*Medical Research Council*) fue inicialmente propuesta por la sociedad británica, y posteriormente se creó la escala mMRC (*Modified British Medical Research Council* o escala modificada del Medical Research Council) (Fletcher CM *et al* 1959), una graduación de 5 rangos de fácil aplicación, con el objetivo de que sea el paciente quien gradúe de manera cuantitativa su propia disnea (Tabla 2).

Por su sencillez, fiabilidad y haber demostrado predecir la calidad de vida y la supervivencia, ha sido esta escala la que se ha recomendado globalmente (Bestall JC *et*

al 1999) (Sundh J *et al* 2012). Para considerar a los pacientes como sintomáticos el punto de corte deber ser un mMRC mayor o igual a dos (GOLD 2022).

Tabla 2. Grado de disnea según la mMRC. Tabla adaptada de GOLD 2022 (Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease, 2022).

mMRC Grado 0	Solamente me quedo sin aliento cuando hago ejercicio intenso.
mMRC Grado 1	Me falta el aire al andar deprisa en llano o al andar subiendo una pendiente poco pronunciada.
mMRC Grado 2	No puedo mantener el paso de otras personas de mi misma edad en llano o tengo que detenerme para respirar al andar en llano a mi propio paso.
mMRC Grado 3	Me detengo para respirar después de andar unos 100 metros o después de andar pocos minutos en llano.
mMRC Grado 4	Tengo demasiada dificultad respiratoria para salir de casa o me cuesta respirar al vestirme o desvestirme.

Esta escala está muy extendida en la práctica clínica habitual debido a su unidimensionalidad y por tanto a su simplicidad. Sin embargo, resulta poco precisa porque impide apreciar pequeñas variaciones en el grado de disnea conseguidas gracias a las intervenciones terapéuticas. De manera que un paciente con EPOC, que ha mejorado significativamente su sintomatología, puede permanecer en el mismo grado de esta escala a pesar de la mejoría (Casanova Macario C *et al* 2005).

1.4.2. CALIDAD DE VIDA

Existen diversos cuestionarios que intentan medir el impacto de los síntomas de la EPOC, como el COPD Control Questionnaire (CCQ) o el Chronic Respiratory Disease Questionnaire (CRQ), pero el que más se ha utilizado es sin duda el COPD Assessment Test, también llamado cuestionario CAT (GOLD 2022).

El cuestionario CAT (Tabla 3), recoge una serie de preguntas desarrolladas para ser aplicables de manera generalizada, concretamente 8 ítems sobre el deterioro del estado de salud en la EPOC (Jones PW *et al* 2009). Aunque esta escala categoriza el impacto

sintomático de la EPOC, no es útil para clasificar a los pacientes en grupos de gravedad de los síntomas con fines de tratamiento (GOLD 2022). El punto de corte para el CAT está establecido en 10, y por encima de él se considera a los pacientes sintomáticos (Jones PW *et al* 2011).

Tabla 3. Cuestionario CAT. Tabla adaptada de GOLD 2022.

CAT (COPD Assessment Test)			
Este cuestionario le ayudará a usted y al profesional sanitario encargado de tratarle a medir el impacto que la EPOC (Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica) está teniendo en su bienestar y su vida diaria.			
			Puntuación:
Ejemplo: Estoy muy contento	1 2 3 4 5 6	Estoy muy triste	
Nunca toso	1 2 3 4 5 6	Siempre estoy tosiendo	
No tengo flemas (mucosidad) en el pecho	1 2 3 4 5 6	Tengo el pecho completamente cargado de flemas (mucosidad)	
Cuando subo una pendiente o un tramo de escaleras no me falta aire	1 2 3 4 5 6	Cuando subo una pendiente o un tramo de escaleras me falta aire siempre	
No me siento limitado para realizar actividades domésticas	1 2 3 4 5 6	Me siento muy limitado para realizar actividades domésticas	
Me siento seguro al salir de casa a pesar de la afección pulmonar que padezco	1 2 3 4 5 6	No me siento nada seguro al salir de casa debido a la afección pulmonar que padezco	
Duermo sin problemas	1 2 3 4 5 6	Tengo problemas para dormir debido a la afección pulmonar que padezco	
Tengo mucha energía	1 2 3 4 5 6	No tengo ninguna energía	
Total:			

1.4.3. BRONQUITIS CRÓNICA

Existen diferentes definiciones, según la GesEPOC: “La bronquitis crónica se define clásicamente como la producción de expectoración durante al menos tres meses seguidos en dos años consecutivos, aunque a efectos prácticos se puede considerar como la producción habitual de expectoración en fase estable de la EPOC” (Miratvitlles M *et al* 2021).

Diferentes estudios han observado una asociación entre la hipersecreción de moco y una mayor disminución del FEV1, así como se ha asociado con un mayor riesgo en el número total y en la gravedad de las exacerbaciones o agudizaciones, como veremos más adelante.

Los desencadenantes pueden ser varios, aunque se sabe, concretamente, que la bronquitis crónica en pacientes con EPOC estables es un factor de riesgo de agudizaciones frecuentes y tiene un impacto importante en la calidad de vida y en la función pulmonar (Fletcher C *et al* 1977) (Miratvitlles M *et al* 2021). En adultos jóvenes fumadores, la presencia de bronquitis crónica se ha asociado también con una mayor probabilidad de desarrollar EPOC (Guerra S *et al* 2009).

1.4.4. AGUDIZACIONES

Para definir lo que era una agudización en la EPOC se propusieron, hace más de 35 años, los Criterios de Anthonisen (Anthonisen NR *et al* 1987). Son un conjunto de tres criterios que han sido ampliamente utilizados en la práctica clínica desde entonces e incluyen:

- a. Aumento del esputo purulento, ya sea en cantidad o consistencia.
- b. Aumento de la disnea.
- c. Aumento de la tos.

Si un paciente cumplía al menos dos de los tres criterios, se consideraba que tenía una exacerbación aguda de la enfermedad. Sin embargo, es importante mencionar que son subjetivos y no tienen una validez diagnóstica perfecta.

Es por esto por lo que se han ido proponiendo diferentes definiciones hasta que, en 2021, se publicó una nueva definición de agudización en la EPOC: “En un paciente con EPOC, una exacerbación es un evento caracterizado por disnea y/o tos y expectoración que puede empeorar durante más de 14 días, pudiendo ser acompañada de taquipnea y/o taquicardia y que se asocia a menudo con inflamación local y sistémica, causada por infección de las vías respiratorias, contaminación u otros agentes irritantes de las vías respiratorias” (Celli BR *et al* 2021).

La principal causa de las agudizaciones son las infecciones respiratorias, ya sea por bacterias o virus, pudiendo coexistir ambos procesos, aunque es cierto que pueden estar causadas por distintos agentes (GOLD 2022) (Celli BR *et al* 2007).

Las exacerbaciones, además, se clasifican en tres categorías según la gravedad (GOLD 2022):

- a. Leves: los síntomas son leves y pueden ser tratados con cambios en la medicación crónica.
- b. Moderadas: los síntomas deben tratarse con corticoides orales y antibióticos.
- c. Graves: Necesitan además ingreso hospitalario.

1.4.4.1 Biomarcadores de las agudizaciones

Se han estudiado diferentes tipos de biomarcadores (entendiendo como biomarcador cualquier molécula o material en muestra biológica que pueda ser determinado), que estuvieran relacionados con la fisiopatología de la enfermedad, la inflamación y el proceso destructivo en el pulmón (Barnes PJ *et al* 2006).

Los biomarcadores pueden medirse tanto en suero, como en orina, esputo, lavado bronquioalveolar o en aire exhalado (Celli BR *et al* 2007), aunque por su manejo y fácil obtención resultan mejores aquellos que pueden obtenerse directamente en una analítica de sangre.

Estos biomarcadores podrían servir para varias situaciones clínicas en la EPOC. Por ejemplo, algunos se han propuesto como posibles biomarcadores diagnósticos de las

agudizaciones de la EPOC, otros como indicadores para establecer tratamiento con antibióticos o con corticoides e incluso, en fase estable, podrían estimar el riesgo de padecer una agudización en los futuros meses.

A continuación, se detallan divididos en dos grupos, los biomarcadores más utilizados en sangre y suero por una parte y en esputo por otra.

Biomarcadores en sangre y suero:

Los biomarcadores inflamatorios más estudiados han sido la proteína C reactiva (PCR), seguido de la interleucina 6 (IL-6) y el TNF- α (Chen YW *et al* 2016). El TNF- α es una citocina relacionada con la inflamación, estimula las células mesoteliales para la producción de IL-8 (interleucina 8), MCP-1 (proteína quimiotáctica de monocitos 1) y VEGF (vascular endotelial growth factor), la IL-6 es una glucoproteína proinflamatoria que juega un papel a nivel sistémico y la PCR es un reactante de fase aguda, proteína plasmática de síntesis hepática que aumenta sus niveles significativamente en respuesta a la inflamación.

Se ha demostrado que estos factores están aumentados en el plasma de pacientes con EPOC estable y existe un aumento de estos durante las agudizaciones. Sin embargo, todavía no está demostrado que puedan relacionarse con el riesgo de desarrollar futuras agudizaciones (Celli BR *et al* 2007). En primer lugar, porque todavía no se ha encontrado un biomarcador específico ni de la EPOC, ni mucho menos de las agudizaciones en la EPOC, y, en segundo lugar porque muchos de los estudios en este campo cuentan con pequeño tamaño muestral (los que cuentan con mayores números de eventos agudizadores no superan los 100 casos por estudio) (Hoult G *et al* 2022).

Dentro de los biomarcadores relacionados con la inflamación, la más estudiada ha sido la PCR. Esta proteína se ha propuesto como biomarcador útil para identificar agudizaciones de la EPOC que pueden presentar mejor respuesta terapéutica a tratamiento con antibióticos. En concreto, ocho estudios independientes sugirieron un punto de corte para identificar aquellas infecciones producidas por bacterias de aquellas que no lo eran, con un rango entre 5-110 mg/L, obteniendo mejores resultados con un

corte en 15 mg/L (sensibilidad y especificidad del 95,5% y el 100% respectivamente) (Hoult G *et al* 2022). Sin embargo, aunque es la más selectiva, no es específica ni de la EPOC ni de las agudizaciones en pacientes con EPOC (Celli BR *et al* 2007).

Otro biomarcador a tener en cuenta durante las exacerbaciones de la EPOC es la procalcitonina (PCT), debido a su papel como predictor de la duración y el coste de las hospitalizaciones (Gong C *et al* 2020). Varios estudios propusieron un punto de corte de entre 0,03-1,03 ng/mL para diferenciar agudizaciones producidas por bacterias, de las que no lo eran, con una especificidad del 92,5% y una sensibilidad de casi el 79% si el punto de corte se establecía en 0,76 ng/mL (Hoult G *et al* 2022).

La procalcitonina es un polipéptido precursor de la calcitonina que se sintetiza fundamentalmente en las células C de la glándula tiroides, en el tejido neuroendocrino de otros órganos como los pulmones y el intestino, y en procesos inflamatorios o infecciones en el parénquima de diferentes órganos por el sistema mononuclear fagocítico. Por este motivo no es específica de las agudizaciones de los pacientes con EPOC, pudiendo estar elevada en multitud de procesos, por lo que su uso sigue siendo controvertido (GOLD 2022).

La adrenomedulina, y más concretamente la proadrenomedulina (MR-proADM), tiene un amplio rango de acciones incluyendo modular el sistema inmune e intervenir en el metabolismo y en el sistema vascular. Ambas se han estudiado ampliamente en otras patologías y parece que en la EPOC pueden ser biomarcadores prometedores en predecir el riesgo de desarrollar agudizaciones severas, e incluso mortalidad durante las agudizaciones (Citgez E *et al* 2018) (Zuur-Telgen MC *et al* 2021), aunque los estudios realizados hasta el momento solamente han valorado estos resultados en pacientes con EPOC estables. Además de elevarse en varios estados patológicos diferentes, son dos biomarcadores de los que todavía no hay mucha bibliografía publicada en la EPOC.

El fibrinógeno es un marcador de inflamación sistémica y pudiera tener su importancia en la patogénesis de la EPOC. Varios estudios han demostrado que niveles por encima de 350 mg/dL en pacientes con EPOC, tienen un mayor riesgo de sufrir una agudización de su EPOC (Hogea SP *et al* 2020). Sin embargo, al igual que en el resto de

los biomarcadores estudiados en suero, se trata de una proteína que se eleva en muchos otros procesos.

Biomarcadores en esputo:

Varios marcadores inflamatorios se encuentran elevados en el esputo inducido de los pacientes con EPOC, durante las exacerbaciones agudas. Existen diferentes estudios que han observado aumento de las concentraciones sobre todo de TNF- α e IL-6, pero también de IL-8, MPO (mieloperoxidasa), LTB₄ (leucotrieno-B₄) o endotelina-1 (Celli BR *et al* 2007) (Hoult G *et al* 2022). Sin embargo, los estudios publicados son inconclusos o no existe la suficiente evidencia científica para apoyarlos (Hoult G *et al* 2022).

Aunque se han medido estos y muchos otros biomarcadores para establecer el diagnóstico de la agudización en la EPOC, solamente la medición de la PCR en suero es la utilizada por los diferentes guías o comités de expertos (ROMA, GOLD, GesEPOC) para ayudar en el diagnóstico y el pronóstico de las agudizaciones. También, el color del esputo observado sigue siendo muy sensible y específico para reconocer alta carga bacteriana durante las agudizaciones (GOLD 2022).

Por otro lado, la evaluación de los eosinófilos en sangre periférica se recomienda en todos los pacientes EPOC en fase estable, ya que se relacionan con una mejor respuesta al tratamiento crónico con corticoides inhalados. Además, se ha demostrado que los pacientes con eosinofilia ($\geq 2\%$) en sangre periférica parecen tener un aumento de riesgo de sufrir exacerbaciones (Hogea SP *et al* 2020).

Dado lo anterior, los biomarcadores más establecidos en la práctica clínica habitual de estos pacientes son los niveles de eosinofilia en sangre periférica para establecer un tratamiento (GOLD 2022), y la PCR, en caso de poder medirla, como factor pronóstico durante las agudizaciones de la EPOC.

Es por esta falta de biomarcadores, entre otras causas, por lo que en GOLD se siguen clasificando las exacerbaciones en leves o graves según el tratamiento que reciben los pacientes, y la necesidad o no de hospitalización (GOLD 2022), en lugar de basarse en parámetros analíticos.

1.4.4.2 Implicaciones para la EPOC

La historia natural de la EPOC suele estar marcada por exacerbaciones periódicas que son de gran importancia, empeorando los síntomas habituales como la disnea o la producción de moco. Estas agudizaciones tienen una gran implicación en la salud de los pacientes, pudiendo acelerar la progresión de la enfermedad, el aumento en las visitas a urgencias y las hospitalizaciones (Chen YW *et al* 2016) (Celli BR *et al* 2007) (Anthonisen NR *et al* 1987) (Hurst JR *et al* 2007).

A pesar de la importancia de estas agudizaciones, se ha demostrado que hay un claro infradiagnóstico de ellas, ya que se estima que solamente el 50% se informan a los médicos, a pesar de asociarse con deterioro de la función pulmonar y aumento de la clínica respiratoria (Rodriguez-Roisin R 2000).

Las agudizaciones suelen durar entre 7 y 10 días, aunque algunos episodios pueden durar más, pero lo verdaderamente significativo es que menos de un 20% de los pacientes recuperan su estado basal previo tras 8 semanas (Seemungal TA *et al* 2000). Además, las exacerbaciones también pueden agruparse en el tiempo, y una vez que un paciente con EPOC experimenta una agudización, mostrará una mayor susceptibilidad a otro episodio (Donaldson GC *et al* 2015) (Soler-Cataluña JJ *et al* 2005).

Inicialmente los factores que se asociaban a una mayor mortalidad en los pacientes con EPOC incluían el FEV1, la edad, la hipoxemia e hipercapnia, las comorbilidades concomitantes, la hipertensión pulmonar y el índice de masa corporal.

Recientes estudios han demostrado que, en aquellos pacientes con exacerbaciones frecuentes, la función pulmonar se deteriora más rápidamente provocando una caída progresiva del FEV1 de manera independiente (Soler-Cataluña JJ *et al* 2005). Además, parece que tienen un impacto negativo, independientemente de otros factores, con aumento de la mortalidad y de la frecuencia de nuevas agudizaciones, particularmente aquellas que requieren ingreso hospitalario (Donaldson GC *et al* 2015) (Donaldson GC *et al* 2002) (Soler-Cataluña JJ *et al* 2005).

Es por esto por lo que se creó en 2009 un nuevo índice con todas estas variables, con el fin de poder objetivar el riesgo de estos pacientes, llamado el índice BODEX (Soler-Cataluña JJ *et al* 2009), del que hablaremos más adelante.

También se han asociado al riesgo de padecer una agudización de la EPOC otros factores, entre los que destacan las comorbilidades relacionadas a estos pacientes. Entre ellas destacan las enfermedades cardiovasculares, la sarcopenia, el reflujo gastroesofágico, las bronquiectasias e incluso cumplir criterios clínicos de bronquitis crónica (Hogea SP *et al* 2020).

Teniendo en cuenta el gran impacto de las agudizaciones en el curso natural de la EPOC, es de suma importancia reconocer que factores de riesgo se asocian a la aparición de exacerbaciones (Hogea SP *et al* 2020), y es imprescindible prevenir las recurrencias, para evitar que modifiquen negativamente el estado de salud de los pacientes con EPOC a largo plazo (Celli BR *et al* 2007).

Todo ello permitiría reducir de manera significativa la mortalidad y las hospitalizaciones, y así disminuir la utilización de los servicios de salud (Rodriguez-Roisin R 2000).

1.5. CLASIFICACIÓN DE LOS PACIENTES CON EPOC

Para catalogar a los pacientes, la gravedad de su enfermedad y predecir el riesgo de futuros eventos adversos se creó una primera clasificación de los pacientes con EPOC que utilizaba como factor clave la limitación al flujo de aire (Rabe KF *et al* 2007). De esta forma, se estratificaba en cuatro categorías, desde formas leves a muy severas.

Los cortes espirométricos propuestos y que se siguen utilizando en la actualidad fueron los siguientes (Tabla 4) (GOLD 2022).

Tabla 4. Clasificación GOLD. Tabla adaptada de GOLD 2022.

En pacientes con FEV1/FVC < 0,70:		
GOLD 1	FEV1 ≥ 80%	Leve
GOLD 2	FEV1 entre 50% y 79%	Moderada
GOLD 3	FEV1 entre 49% y 30%	Grave
GOLD 4	FEV1 < 30%	Muy grave

FEV1: forced expiratory volume in the first second o volumen espiratorio forzado en el primer segundo; FVC: forced vital capacity o capacidad vital forzada. GOLD: Global initiative for Chronic Obstructive Lung Disease.

El FEV1 tiene limitaciones a la hora de evaluar pacientes en situación aguda, como ocurre durante los ingresos hospitalarios y durante la toma de decisiones terapéuticas, como veremos más adelante (GOLD 2022). A esto se añade que la EPOC es una enfermedad tan compleja que no permite que estos pacientes se clasifiquen únicamente según la limitación del flujo aéreo, y es por lo que, en 2017, se adoptó una nueva clasificación, ABCD (GOLD 2017), que hoy en día se sigue utilizando y que complementa a la anteriormente mencionada (Figura 1).

Figura 1. Clasificación EPOC, ABCD. Tabla adaptada de GOLD 2022.

Antecedentes de exacerbaciones	≥ 2 exacerbaciones o ≥ 1 hospitalización	C	D
	0 o 1 exacerbación	A	B
		mMRC 0 - 1 CAT < 10	mMRC ≥ 2 CAT ≥ 10
		Síntomas	

mMRC: Modified British Medical Research Council o escala modificada del Medical Research Council, CAT: COPD Assessment Test o cuestionario CAT.

Esta nueva clasificación incluye cuatro nuevas categorías (ABCD) que se separan de los grados espirométricos. Estos nuevos grupos tienen en consideración otras variables, como los síntomas según el grado de disnea según la escala mMRC (Fletcher CM *et al* 1959) y la escala CAT (Jones PW *et al* 2009), así como el riesgo medido en la frecuencia de las exacerbaciones (GOLD 2022). Todos los componentes de esta clasificación de riesgo han demostrado poder predictivo sobre la mortalidad (Cabrera Lopez *et al* 2017).

Combinando ambas clasificaciones se obtiene que el número proporciona información sobre la gravedad de la limitación del flujo de aire (grado espirométrico 1 a 4), mientras que la letra (grupos A a D) proporciona información sobre la carga de síntomas y el riesgo de exacerbación, lo que se puede utilizar para guiar la terapia en los pacientes con EPOC (GOLD 2022).

En la última guía española de la GesEPOC, se ha propuesto una nueva clasificación para estratificar el nivel de riesgo entendido como probabilidad de presentar agudizaciones, progresión de la enfermedad, futuras complicaciones, mayor consumo de recursos o mayor mortalidad en dos niveles: bajo y alto (Miravittles M *et al* 2021) (Tabla 5). Además, todos los componentes de esta clasificación de riesgo han demostrado poder predictivo sobre la mortalidad (Cabrera Lopez *et al* 2017).

Tabla 5. Estratificación en bajo y alto riesgo. Tabla adaptada de GesEPOC.

	ESTRATIFICACIÓN	
	Riesgo BAJO (Se deben cumplir todos los criterios)	Riesgo ALTO (Se debe cumplir al menos 1 requisito)
OBSTRUCCIÓN (FEV1 post-BD %)	≥ 50%	< 50%
DISNEA (mMRC)	0 - 1	2 - 4
EXACERBACIONES (último año)	0 - 1 sin ingreso	2 o más o 1 ingreso

FEV1: forced expiratory volume in the first second o volumen espiratorio forzado en el primer segundo, BD: broncodilatador, mMRC: Modified British Medical Research Council o escala modificada del Medical Research Council.

1.6. PRONÓSTICO

1.6.1. ESPIROMETRÍA

La función primordial de la espirometría es el diagnóstico de los pacientes con EPOC. Además, el FEV1 es un parámetro muy importante para la predicción de resultados clínicos importantes, como la mortalidad y las hospitalizaciones. También se utiliza para considerar terapias no farmacológicas, como la reducción del volumen pulmonar o el trasplante de pulmón (GOLD 2022).

1.6.2. TEST DE LA MARCHA DE 6 MINUTOS

Uno de los indicadores del estado de salud y predictor de pronóstico en pacientes con EPOC es el ejercicio físico. Se puede evaluar de múltiples formas, siendo el test de la marcha de 6 minutos (TM6M) el más utilizado, debido a que es una prueba sencilla, fácil de efectuar y normalmente bien tolerada (GOLD 2022).

Esta prueba mide la distancia que un paciente puede caminar de manera ágil sobre una superficie plana y dura, en un periodo de 6 minutos. Evalúa de manera global e integrada todos los sistemas implicados durante el ejercicio, incluyendo el sistema pulmonar y cardiovascular, la circulación periférica, las unidades neuromusculares, y el metabolismo muscular (ATS statement: guidelines for the six-minute walk test, 2002).

Existen múltiples evidencias científicas sobre la relación entre los niveles reducidos de ejercicio físico con un mayor riesgo de mortalidad, de hospitalización y reingreso en el año siguiente por exacerbaciones de la EPOC (Cosio BG *et al* 2021).

1.6.3. ÍNDICE BODE E ÍNDICE BODEX

Existen muchas variables que ayudan a clasificar a los pacientes según el riesgo de mortalidad, pero uno de los más utilizados en la práctica clínica habitual ha sido el índice

BODE (Tabla 6) (Celli BR, Cote CG *et al* 2004).

Este índice se utiliza para categorizar a los pacientes con EPOC según cuatro características típicas:

- B: “Body-mass index” o índice de masa corporal medido por el IMC.
- O: “Obstruction” o el grado de obstrucción al flujo de aire mediante la medición del FEV1 en porcentaje.
- D: “Dyspnea” o disnea, medida por la mMRC.
- E: “Exercise capacity” o la capacidad de ejercicio medida por la prueba del TM6M.

Tabla 6. Índice BODE. Tabla adaptada de Celli BR, Cote CG *et al* 2004.

	Marcadores	Puntuación			
		0	1	2	3
B	IMC (kg/m ²)	> 21	≤ 21	-	-
O	FEV1 (%)	≥ 65	50 - 64	36 - 49	≤ 35
D	Disnea (mMRC)	0 - 1	2	3	4
E	TM6M (m)	≥ 350	250 - 349	150 - 249	≤ 149

IMC: índice de masa corporal; FEV1: forced expiratory volume in the first second o volumen espiratorio forzado en el primer segundo; mMRC: Modified British Medical Research Council o escala modificada del Medical Research Council; T6MM: distancia recorrida en metros a la prueba de los 6 minutos de marcha; m: metros.

La ponderación del índice BODE va de 0 a 10 puntos, y se divide en los siguientes cuartiles:

- Cuartil 1: 0-2 puntos
- Cuartil 2: 3-4 puntos
- Cuartil 3: 5-6 puntos
- Cuartil 4: 7-10 puntos

Aunque existen ciertos puntos que podrían ser conflictivos como, por ejemplo, que el IMC no distingue entre baja masa muscular y baja masa grasa (que por sí misma no sería un factor de riesgo), se sigue utilizando en la clínica habitual. Esto se debe fundamentalmente a que se ha demostrado que con el aumento de un punto del índice BODE, existe un aumento del 34% en la mortalidad por todas las causas y del 62% en la mortalidad de causa respiratoria (Celli BR, Cote CG *et al* 2004).

Sin embargo, el índice BODE no incluye las agudizaciones que se encuentran, además, entre los factores pronóstico que más interés tienen, sobre todo aquellas producidas en los últimos meses. Es por lo que se diseñó el índice BODEx (Tabla 7), que sustituye la “E” de capacidad de ejercicio, por la “Ex” de exacerbaciones graves (Soler-Cataluña JJ *et al* 2009).

Tabla 7. Índice BODEx. Tabla adaptada de Soler-Cataluña JJ *et al* 2009.

	Marcadores	Puntuación			
		0	1	2	3
B	IMC (kg/m ²)	> 21	≤ 21	-	-
O	FEV1 (%)	≥ 65	50 - 64	36 - 49	≤ 35
D	Disnea (mMRC)	0 - 1	2	3	4
Ex	Ex graves (nº)	0	1 - 2	≥ 3	-

IMC: índice de masa corporal; FEV1: forced expiratory volume in the first second o volumen espiratorio forzado en el primer segundo; mMRC: Modified British Medical Research Council o escala modificada del Medical Research Council; Ex: exacerbaciones; nº: número.

La clasificación de la gravedad según el índice BODEx posee los mismos puntos de corte por cuartiles que el índice BODE y puede ser útil sobre todo en aquellos pacientes con EPOC de reciente diagnóstico en los que no se cuenta con el TM6M (Soler-Cataluña JJ *et al* 2009).

1.6.4. DISFUNCIÓN MUSCULAR MEDIDA POR FFMI

La prevalencia de la debilidad muscular del músculo esquelético aumenta con la gravedad de la enfermedad respiratoria, y esto provoca una menor resistencia al ejercicio físico, mayor sedentarismo y peor calidad de vida, perpetuando por ende la debilidad muscular (Hogea SP *et al* 2020).

En los pacientes con EPOC la composición corporal sufre grandes variaciones por el proceso propio de la enfermedad (Maltais F *et al* 2014). El IMC, aunque ha sido muy utilizado en la clínica para medir estas variaciones, no tiene en cuenta datos de gran importancia en estos pacientes, como son la cantidad de grasa corporal o la masa libre de grasa (FFM).

Aunque la relación entre el IMC y la mortalidad en los pacientes con EPOC es bien conocida, recientemente se ha podido demostrar, de forma independiente, que el FFMI se asocia mejor con la mortalidad de los pacientes con EPOC, incluso con o sin ajuste por volumen pulmonar y, por tanto, con su pronóstico. Es por esto por lo que parece lógico pensar que las nuevas estrategias terapéuticas encaminadas a suplir esto, deberían depender de la composición corporal y no únicamente del IMC (Schols AM *et al* 2005).

1.7. TRATAMIENTO

Según la Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD 2022), todos los pacientes con EPOC deben tener una evaluación de la gravedad de la obstrucción del flujo de aire, síntomas, antecedentes de exacerbaciones, exposición a factores de riesgo y comorbilidades para guiar el manejo de estos pacientes y propone, además, cuatro puntos clave para el tratamiento de la EPOC estable:

- La estrategia para tratar a los pacientes con EPOC debe estar basada principalmente en la evaluación de los síntomas y el riesgo futuro de exacerbaciones.

- Los objetivos del tratamiento deben ser la reducción de los síntomas y el riesgo de futuras exacerbaciones.
- Se debe animar y apoyar al abandono tabáquico.
- Las estrategias deben incluir intervenciones farmacológicas y no farmacológicas.

Entre los fármacos que recomiendan se encuentran:

1. **Broncodilatadores:** Actúan modificando el tono del músculo liso de las vías respiratorias. Esta circunstancia produce un ensanchamiento de estas vías aumentando el FEV1. Existen broncodilatadores de dos tipos, de acción corta y de acción larga:
 - a. *De acción corta:*
 - SAMA (*Short-acting antimuscarinics* o antimuscarínicos de corta duración)
 - SABA (*Short-acting beta 2 agonists* o beta 2 adrenérgicos de corta duración)
 - b. *De acción larga:*
 - LAMA (*Long acting muscarinic antagonist* o anticolinérgicos de acción larga)
 - LABA (*Long acting beta 2 agonists* o agonistas beta 2 adrenérgicos de acción larga)
2. **Corticosteroides inhalados (CIs):** No deben usarse en monoterapia, ya que no modifica el curso de la enfermedad (ni mejora el FEV1 ni la mortalidad) pero se recomienda su uso en combinación con broncodilatadores en pacientes con EPOC moderado a severo, siempre que tengan niveles de eosinófilos altos, ya que mejora el estado de salud y reduce las exacerbaciones (GOLD 2022).
3. **Triple terapia (LABA/LAMA/CIs):** Ha demostrado mejorar la función pulmonar, reducir las exacerbaciones y mejorar las complicaciones comunicadas por los pacientes en determinadas circunstancias. Sobre todo,

han reportado mejoría en cuanto a la mortalidad en pacientes con EPOC sintomáticos con antecedentes de exacerbaciones frecuentes y/o graves que recibían previamente terapia de mantenimiento con broncodilatadores de acción prolongada simples o dobles, LABA/CIs o triple terapia (GOLD 2022).

Por último, si el paciente ha sido recientemente diagnosticado, se propone para iniciar el tratamiento un enfoque adaptado en función del nivel de síntomas y del riesgo de exacerbaciones, basado en el sistema ABCD (Figura 2).

Figura 2. Tratamiento farmacológico inicial adaptado de GOLD 2022.

≥ 2 exacerbaciones o ≥ 1 hospitalización	C LAMA	D LAMA or LAMA + LABA* o CIs + LABA**
0 o 1 exacerbación	A Broncodilatador	B Broncodilatador de larga acción (LABA o LAMA)
	mMRC 0 - 1 CAT < 10	mMRC ≥ 2 CAT ≥ 10

*Se debe considerar si el paciente es muy sintomático (por ejemplo; CAT > 20).

**Considerar si la cifra de eosinófilos es ≥ 300 células/microlitro.

LAMA (Long acting muscarinic antagonist o anticolinérgicos de acción larga), LABA (Long acting beta 2 agonists o agonistas beta 2 adrenérgicos de acción larga), CIs: inhaled corticosteroids o corticoids inhalados, mMRC: Modified British Medical Research Council o escala modificada del Medical Research Council, CAT: COPD Assessment Test o cuestionario CAT.

Sin embargo, la última guía española de la GesEPOC propone ajustar los tratamientos de los pacientes con EPOC según la clasificación de riesgo que vimos anteriormente (Tabla 5). De esta manera el tratamiento de los pacientes sería de acuerdo a su nivel de riesgo dividido en dos niveles: bajo y alto (Miravittles M *et al* 2021).

En el manejo de los pacientes con EPOC se deben incluir también tratamientos no farmacológicos o adicionales, como la rehabilitación pulmonar o la terapia con oxígeno domiciliario (GOLD 2022), así como tratamiento de las comorbilidades relacionadas con estos pacientes como son la disfunción muscular y la caquexia (Schols AM *et al* 2005).

Concretamente, la terapia con oxígeno domiciliario ha demostrado aumentar la supervivencia únicamente en aquellos pacientes con hipoxemia arterial severa, aunque no es beneficiosa, ni tampoco aporta ningún beneficio al resto de los pacientes. Sin embargo, la rehabilitación pulmonar sí que ha reportado mejores resultados en cualquier paciente con EPOC, ya que mejora la disnea, el estado de salud y la tolerancia al ejercicio, además de aliviar otros síntomas asociados a estos pacientes como la ansiedad y la depresión (GOLD 2022).

1.8. MOLÉCULAS ASOCIADAS CON LAS MITOCONDRIAS

La disfunción mitocondrial es un concepto amplio, en el que se incluye la excesiva generación de ROS mitocondriales, y desempeña un papel central, pero no único, en el estrés oxidativo, la senescencia celular y la inflamación crónica. Esta disfunción puede generarse por múltiples causas, como hemos visto, y están ampliamente documentadas las alteraciones de las mitocondrias en la EPOC a nivel broncopulmonar, muscular e inmunológico (Barreiro E *et al* 2016) (Bewley MA *et al* 2017) (Hara H *et al* 2018) (Jiang Y *et al* 2017) (Kang M-J *et al* 2016) (Liu X *et al* 2017) (Michaeloudes C *et al* 2017) (Prakash YS *et al* 2017).

Las células reaccionan continuamente a los cambios ambientales a los que están sometidas (Quirós PM *et al* 2016). En situaciones de estrés celular en el que las células se ven sometidas a condiciones ambientales adversas, como por ejemplo el daño en el ADN, la privación de nutrientes, los cambios en la temperatura o en el pH de la célula, se activan mecanismos de defensa para proteger la integridad de la célula. Un ejemplo de este hecho es cuando desde el núcleo celular se envían señales a las mitocondrias para que modifiquen su función y se adapten al cambio, lo que se denomina señalización

anterógrada del núcleo a las mitocondrias o “**señalización retrógrada no autónoma o extracelular**” (Quirós PM *et al* 2016) (Whelan SP *et al* 2013).

En cambio, la señalización “**retrógrada autónoma o intracelular**” se activa cuando las mitocondrias se encuentran bajo estrés, como cuando hay un exceso de producción de radicales libres de oxígeno o cuando hay proteínas intramitocondriales mal plegadas. En estas situaciones, las mitocondrias envían señales al núcleo de su propia célula para que modifique la producción de proteínas que ayudan a prevenir o corregir el daño mitocondrial producido. Estas proteínas incluyen chaperonas, antioxidantes y enzimas proteolíticas (Quirós PM *et al* 2016)

Se ha demostrado que las mitocondrias estresadas producen una serie de moléculas, con efectos en la célula que las produce y en células a distancia. Estos péptidos son conocidos, desde los trabajos del grupo de Dillin (Durieux J *et al* 2011) (Schinzel R *et al* 2015), como "mitokinas" y transmiten señales desde los tejidos con mitocondrias estresadas a todo el organismo, actuando como hormonas que preparan al organismo para responder al estrés celular al que va a ser sometido.

Existen al menos dos tipos distintos de mitokinas:

- Las mitokinas primarias, son aquellas que son producidas directamente por las mitocondrias y son, por tanto, codificadas en el DNA mitocondrial (mtDNA).
- Las mitokinas secundarias, son aquellas que son producidas indirectamente por las mitocondrias y se activan por una señalización retrógrada no autónoma (por ejemplo, el ATF4 o Activating Transcription Factor 4 y el ATF5 o Activating Transcription Factor 5). Son codificadas en el DNA del núcleo (nDNA).

Antes se pensaba que el mtDNA codificaba 37 genes, incluyendo 13 péptidos exclusivos de las mitocondrias, que son subunidades de la cadena de transporte de electrones y que son esenciales para la producción de energía celular. Además de estos péptidos, se pensaba que el mtDNA codificaba 22 RNAs de transferencia (tRNA) y 2 RNAs ribosómicos (rRNA). Sin embargo, actualmente se sabe que el mtDNA también contiene

sORFs (“short open reading frames”). Estas regiones son secuencias de ADN que codifican para proteínas de menos de 100 aminoácidos con funciones importantes en la célula, como las regulaciones transcripcionales, proteínas de señalización y mitokinas.

La Humanina (HN), la MOTS-c (“mitochondrial open reading frame of the 12S ribosomal RNA type-c”), o los seis péptidos pequeños similares a la Humanina (SHLPs 1-6), son ejemplos de mitokinas primarias que se conocen. Aunque no se sabe qué mecanismos provocan la síntesis y liberación de estas mitokinas, se sospecha que posiblemente se relacionen con una activación ribosomal.

Las proteínas conocidas como mitokinas secundarias, que son codificadas en el ADN nuclear, se secretan debido al estrés celular y a la activación previa de los genes ATF4 y ATF5, que se activan por disfunción mitocondrial. Entre las mitokinas secundarias identificadas se encuentran el FGF-21 (factor de crecimiento fibroblástico 21), el GDF-15 (factor de crecimiento y desarrollo 15), la folistatina y la intermedina (Quirós PM *et al* 2017).

Aunque todavía no se conoce bien el funcionamiento de las mitokinas, se han reportado tanto efectos positivos como negativos de estas moléculas en la literatura científica (Conte M *et al* 2019).

Se han estudiado varias mitokinas a lo largo de los últimos años. A continuación, se detallan aquellas que han sido objeto de investigación en este trabajo, concretamente la Humanina, el GDF-15, el FGF-21 y la MOTS-c. También se incluye la Romo1 (Reactive oxygen species modulator 1) que, aunque no sea una mitokina, es una molécula asociada a la mitocondria y ha sido estudiada al igual que las anteriores por su posible implicación con la EPOC.

1.8.1. HUMANINA

La Humanina es una de las mitokinas primarias que ha sido objeto de una gran cantidad de investigaciones científicas (junto con el GDF-15 del que hablaremos más adelante). La HN es un péptido que fue descubierto en 2001, en el tejido cerebral

superviviente de pacientes con enfermedad de Alzheimer, donde se demostró que tenía cierto efecto protector, al encontrar que protegía frente a la muerte neuronal producida por la proteína precursora de amiloide (Bachar AR *et al* 2010) (Lee C *et al* 2013) (Yen k *et al* 2013). El término “Humanina” fue acuñado por su descubridor, el profesor Nishimoto, para denotar el potencial de esta molécula para restaurar la “humanidad” de los pacientes con la enfermedad de Alzheimer (Hashimoto Y *et al* 2001) (Lee C *et al* 2013).

Poco después se descubrió que la Humanina podía unirse al IGFBP3 (insulin-like growth factor binding protein 3) y al Bak (Bcl-2-antagonist/killer), dos proteínas pro-apópticas, antagonizando su efecto, al evitar que se transloquen a las mitocondrias y, por tanto, protegiendo a las células de la muerte celular con una alta afinidad y especificidad (Ikonen M *et al* 2003) (Lee C *et al* 2013).

La Humanina es una proteína que difiere de longitud, dependiendo del lugar de síntesis, debido a las diferencias de traducción entre las mitocondrias y el citoplasma. Está compuesta por 21 o 24 aminoácidos, ya sea mitocondrial o citoplasmática respectivamente, y aunque la secuencia difiere ligeramente entre ambas, contienen los mismos dominios esenciales para la secreción y citoprotección (Charununtakorn ST *et al* 2016) (Gong Z *et al* 2018) (Sreekumar PG *et al* 2016) (Yen k *et al* 2013).

La vía extracelular de la HN depende de receptores transmembrana que se activan por la unión de ligandos específicos, los GPCR (“G protein-coupled receptor”) que son ampliamente distribuidos por todos los tejidos y juegan un importante papel en la regulación de la respuesta inflamatoria, la homeostasis celular y la respuesta al estrés. Los monocitos, las células alveolares y los eosinófilos expresan receptores de HN, pero la mayor expresión de estos receptores se encuentra en los macrófagos pulmonares (Devosse T *et al* 2009).

Entre otras funciones, la HN se ha demostrado que regula la fosforilación oxidativa, activa la síntesis de antioxidantes y chaperonas para las proteínas mal plegadas en muchos tejidos. Además, desempeña un papel en múltiples enfermedades, incluidas las enfermedades cardiovasculares, jugando un papel citoprotector frente al estrés oxidativo en la arterioesclerosis, la diabetes mellitus tipo 2 (DM2), la pérdida de

memoria, la esclerosis lateral amiotrófica, el epitelio pigmentario de la retina y muchas otras patologías relacionadas con la edad (Bachar AR *et al* 2010) (Cai H *et al* 2021) (Charununtakorn ST *et al* 2016) (Gong Z *et al* 2018) (Lee C *et al* 2013) (Sreekumar PG *et al* 2016) (Yen k *et al* 2013).

A nivel metabólico, tiene efectos beneficiosos ayudando a mejorar la sensibilidad a la insulina, protegiendo las células del páncreas de daño oxidativo y actuando como un regulador negativo del factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF1) (Gong Z *et al* 2014) (Kim SJ *et al* 2017) (Yen k *et al* 2013). La HN incluso empieza a ser estudiada en pacientes con cáncer, aunque su implicación todavía no está clara (Gong Z *et al* 2018).

A pesar de que la EPOC está estrechamente relacionada con la inflamación crónica y el estrés oxidativo (Domej W *et al* 2014), y que la mayor concentración de receptores para la HN se encuentra en los receptores de los macrófagos alveolares (Devosse T *et al* 2009), hasta el momento no se ha realizado ningún estudio para evaluar los niveles de HN en esta patología.

1.8.2. GDF-15

El GDF-15 es una mitokina secundaria pleiotrópica, que suele secretarse como una proteína dimérica de 224 aminoácidos, asociada a la inflamación y el metabolismo, que se expresa en muchos tejidos como el riñón, hígado, músculo, tejido adiposo, sistema nervioso central, placenta... (Chung HK *et al* 2017) (Mullican SE *et al* 2018) (Tsai vWW *et al* 2018).

Actúa a través de un receptor el GFRAL (receptor alfa-like del factor neurotrófico derivado de la glía) identificado en el área postrema y el núcleo del tracto solitario y, al igual que FGF-21, activa la vía Akt, lo que permite que las células respondan a los cambios producidos en el medio ambiente y regulen procesos biológicos importantes (Mullican SE *et al* 2018) (Tsai vWW *et al* 2018).

Además, se ha descubierto que el GDF-15 puede activar a través de factores de transcripción p53 y EGR-1 (early growth response 1), que desempeñan un papel

importante en la regulación del ciclo celular, lo que sugiere que podría tener un papel en la regulación de la supervivencia celular (Tsai vWW *et al* 2018).

Los niveles elevados de GDF-15 se han asociado con procesos fisiológicos, por ejemplo aumentan tras el ejercicio, y en múltiples procesos patológicos. Fundamentalmente se ha relacionado con el cáncer, la caquexia (a través de la regulación del apetito), las enfermedades cardiovasculares y renales, los procesos inflamatorios, así como con la EPOC (Adela R *et al* 2015) (Tsai vWW *et al* 2018) (Patel MS *et al* 2016).

Se ha demostrado que existen enfermedades mitocondriales primarias en las que se ha encontrado, de manera consistente, la sobreexpresión de GDF-15 y una elevación de los niveles séricos, por lo que también se ha planteado su uso como biomarcador de estos procesos (Tsai vWW *et al* 2018).

Concretamente los niveles de GDF-15 a menudo se han correlacionado con la pérdida de peso, y el mal pronóstico, e incluso, los niveles de esta mitokina pueden llegar a ser predictivos de mortalidad por cualquier proceso patológico o enfermedad, incluida la EPOC (Verhamme FM *et al* 2019) (Mullican SE *et al* 2018). El mecanismo que relaciona la proteína con la mortalidad no está claro, pero algunas pruebas sugieren que GDF-15 puede promover el desgaste muscular (Patel MS *et al* 2016).

Los niveles plasmáticos de GDF-15, y otras mitokinas como la HN o el FGF-21 del que hablaremos más adelante, se han visto elevados con la edad, siendo todavía más altos cuanto mayor era el grupo de edad. Entre estas tres mitokinas, la correlación con la edad era especialmente evidente en el caso de GDF-15 (Conte M *et al* 2019), y como hemos comentado, es además la única que se ha estudiado en el contexto de la EPOC.

Todos los mecanismos que pueden generar estrés mitocondrial y elevan GDF-15 incluyen la hipoxia, el estrés oxidativo y el aumento de citokinas inflamatorias, todas ellas relevantes en la patogénesis de la EPOC (Patel MS *et al* 2016). Además, el GDF-15 se ha estudiado como posible biomarcador de la gravedad de los pacientes con EPOC y como posible factor etiológico en la progresión de la enfermedad (Verhamme FM *et al* 2019)

Por último, el GDF-15 se ha asociado con la pérdida muscular en los pacientes EPOC de manera independiente a la regulación y supresión del apetito. Concretamente Patel PM *et al*, observaron que no había asociación de GDF-15 con el IMC y, además, demostraron en modelos animales que la sobreexpresión de GDF-15 provocó un desgaste muscular local directo. Sin embargo, la contribución relativa de cada mecanismo todavía no está clara, pudiendo ser un mecanismo en tándem con la supresión del apetito, característica propia de la mitokina (Patel MS *et al* 2016).

1.8.3. FGF-21

El FGF-21 es una mitokina secundaria con un total de 208 aminoácidos en su secuencia, que se secreta principalmente por el hígado y el tejido adiposo a través del receptor PPAR alfa y gamma (Hanks LJ *et al* 2015), aunque puede encontrarse en otros órganos como el corazón, el músculo, el páncreas o en sangre periférica, en respuesta al estrés mitocondrial (Fisher FM *et al* 2015) (Oost LJ *et al* 2019).

Es un gran regulador de la homeostasis de lípidos locales y sistémicos, de la glucosa y del metabolismo energético (Luo Y *et al* 2017), que aumenta en las situaciones de ayuno estimulando la cetogénesis y la beta oxidación de los ácidos grasos (Fisher FM *et al* 2015) y en cualquier situación de estrés mitocondrial que active las señales mitocondria-núcleo (Luo Y *et al* 2017) (Restelli LM *et al* 2018).

En condiciones normales se secreta por el hígado, pero en otras situaciones como en procesos de ayuno, estrés en el retículo endoplasmático, disfunción mitocondrial u obesidad, su síntesis depende del músculo esquelético por la vía insulina/Akt. Esta vía desempeña un papel importante en la regulación del ciclo celular, la apoptosis celular, la regulación del metabolismo energético y la homeostasis (Hanks LJ *et al* 2015) (Gifford JR *et al* 2018) (Oost LJ *et al* 2019).

En algunos modelos in vitro, se ha observado que el FGF-21 secretado por los músculos participó en respuestas integradas causando efectos a nivel sistémico no autónomo, como en la cascada de la inflamación, alteraciones metabólicas, así como se vio implicado en procesos de envejecimiento y senescencia precoz (Hanks LJ *et al* 2015)

(Oost LJ *et al* 2019). Dado que el proceso de envejecimiento está asociado a cambios en la composición corporal con aumento del tejido adiposo y con pérdida de masa corporal, se considera que la síntesis de FGF-21 en estos tejidos, podría cambiar de forma concomitante estos y otros órganos (Hanks LJ *et al* 2015).

El FGF-21 se considera, por tanto, una hormona metabólica y un marcador de estrés nutricional (Scholle LM *et al* 2018), aunque todavía están en discusión los mecanismos que median esta mitokina y su rol preciso en el contexto de la homeostasis del músculo esquelético (Oost LJ *et al* 2019), por lo que se necesitan nuevas investigaciones en estos campos.

Aunque esta hormona ha sido propuesta como biomarcador sérico de trastornos mitocondriales específicos del músculo (Suomalainen A *et al* 2011), no hay estudios que describan el FGF-21 en la EPOC, al igual que ocurre con la HN y la MOTS-c.

1.8.4. MOTS-c

La MOTS-c es una mitokina primaria compuesta por solamente 16 aminoácidos, de reciente descubrimiento y que se encuentra en el ADN mitocondrial, sintetizada únicamente en los ribosomas citosólicos. Se ha observado que tiene propiedades antioxidantes y metabólicas beneficiosas ayudando a reducir la resistencia a la insulina y prevenir la obesidad (Lee C *et al* 2015) (Kim KH *et al* 2018) (Kumagai H *et al* 2021) (Mangalhara KC *et al* 2018). Recientes investigaciones han revelado que, además, aumenta con el ejercicio intenso agudo, aunque disminuye en asociación con la diabetes mellitus, la enfermedad coronaria y la insuficiencia renal (Merry TL *et al* 2020).

Por otra parte, se ha hipotetizado que puede disminuir la resorción ósea, por lo que puede tener efectos antiosteoporóticos (Ming W *et al* 2016), así como se ha sugerido que puede existir un vínculo entre los niveles elevados de MOTS-c y una vida prolongada (Lee C *et al* 2015) (Fuku N *et al* 2015).

El órgano diana principal, parece ser el músculo esquelético (Lee C *et al* 2015) y se cree que pueda tener un papel en la atrofia muscular, aunque se desconoce en profundidad su posible implicación (Kumagai H *et al* 2021)

Recientemente se ha detectado en sangre periférica, aunque todavía se desconoce como penetra en las células diana a pesar de ser una mitokina similar a la HN, debido a que no se han identificado receptores específicos (Reynolds JC *et al* 2021).

In vitro, ante una restricción de glucosa se incrementa la producción de MOTS-c, que activa la proteína cinasa activada por monofosfato de adenina (AMPK), enzima que al activarse induce una serie de cambios metabólicos que ayudan a la célula a conservar energía. Posteriormente, se transloca al núcleo, donde se une a secuencias de elementos de respuesta antioxidante en las regiones promotoras del factor nuclear derivado del eritroide 2 (NRF2) y otros factores de transcripción, modulando así actividad del gen diana (Kim KH *et al* 2018).

1.8.5. ROMO1

Romo1 no se considera una mitokina, pero sí una molécula asociada a la mitocondria, ya que se encuentra localizada en la membrana mitocondrial interna, regulando la integridad de las crestas mitocondriales (Swarnabala S *et al* 2015). Es una proteína sensible al redox que tiene la capacidad de modificar la producción de ROS, participando en la regulación del equilibrio entre antioxidantes y oxidantes, involucrada en la protección celular (Swarnabala S *et al* 2015).

Concretamente, existen varias dianas de ROS en las vías respiratorias de los pacientes con EPOC, que afectan a la inflamación, la senescencia celular, la defensa de la mucosa contra bacterias y virus, incluida la reducción de la fagocitosis (Swarnabala S *et al* 2015).

Los estudios sugieren que Romo1 interviene en enfermedades asociadas al estrés oxidativo y la inflamación, pero hasta el momento solamente hay un artículo publicado que mida la asociación entre Romo1 y pacientes con EPOC, con un número muy bajo de

pacientes (n=49) comparándolos con controles (n=39), donde se encontró una correlación negativa entre los niveles de esta proteína y el FEV1 (Ye L *et al* 2019).

Sin embargo, es una molécula que parece de gran importancia en los pacientes con EPOC, ya que se ha encontrado en las mitocondrias de las células del epitelio respiratorio de estos pacientes, así como en las crestas mitocondriales defectuosas y en orgánulos fragmentados (Mumby S *et al* 2022).

Se cree que el desequilibrio entre antioxidantes y oxidantes es un factor crucial en el desarrollo de la EPOC, ya que el estrés oxidativo contribuye a varios de los síntomas de la EPOC. Estos síntomas incluyen la inflamación, el enfisema, la fibrosis pulmonar, el aumento de la mucosidad, la producción de anticuerpos, problemas metabólicos, el envejecimiento y la resistencia a los corticosteroides. Todos estos hechos hacen de Romo1 una posible diana terapéutica importante (Mumby S *et al* 2022).

HIPÓTESIS

2. HIPÓTESIS

Las mitocondrias estresadas se encuentran alteradas en los pacientes con EPOC y generan mitokinas frente a estímulos inflamatorios o frente al acúmulo de radicales libres, asociándose a peores variables clínicas.

En los pacientes con EPOC la inflamación crónica y el estrés oxidativo son característicos por lo que estas mitokinas podrían utilizarse como factores pronósticos de riesgo de agudizaciones y de riesgo de hospitalización.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO PRINCIPAL

Estudiar el papel de las moléculas asociadas a la mitocondria en pacientes con EPOC en fase estable, evaluando su relación con distintas variables clínicas y su papel predictor de agudizaciones.

3.2. OBJETIVOS CONCRETOS

1. Describir los niveles de las distintas moléculas asociadas a la mitocondria en un grupo de pacientes con EPOC y en un grupo control de fumadores sin EPOC.
2. Estimar la correlación de las distintas moléculas asociadas a la mitocondria entre sí en el grupo de pacientes con EPOC.
3. Valorar la asociación de las distintas moléculas asociadas a la mitocondria analizadas con las características clínicas de los pacientes con EPOC.
4. Estudiar la relación de las moléculas asociadas a la mitocondria con variables relacionadas con la capacidad de ejercicio evaluada mediante el test de la marcha de 6 minutos.
5. Estudiar las moléculas asociadas a la mitocondria como factores pronósticos de agudizaciones moderadas y de hospitalización.

MATERIAL Y MÉTODOS

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. DISEÑO DEL ESTUDIO

Estudio transversal y observacional de cohortes prospectivo que se llevó a cabo en el Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (HUMV) en Santander (España).

Este proyecto fue aprobado por el Comité de Ética de la Investigación con medicamentos (CEIm) (anexo 1) y se obtuvo el consentimiento informado y por escrito de todos los participantes (anexo 2).

4.2. SELECCIÓN DE LOS CASOS A ESTUDIO Y GRUPO CONTROL

4.2.1. ÁMBITO DE ESTUDIO

Los pacientes se reclutaron desde octubre de 2018, hasta 2021 en la consulta externa de EPOC de Neumología. Además, fueron seguidos durante 1 año de forma prospectiva.

El grupo control consistió en voluntarios fumadores sin EPOC emparejados por edad y sexo; se reclutaron desde la consulta de deshabituación tabáquica, tanto de especializada como de la consulta de deshabituación tabáquica de primaria (UDESTA) y desde la consulta monográfica de EPOC del HUMV.

4.2.2. CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN

En cuanto a los criterios de inclusión:

- El diagnóstico de los pacientes con EPOC se realizó según criterios GesEPOC (Miravittles M *et al* 2021): mayores de 40 años (pacientes con antecedentes de tabaquismo de más de 10 paquetes-año y una espirometría forzada tras test-BD con un cociente de $< 0,7$).

- El grupo control lo constituyeron fumadores sin EPOC emparejados por edad, sexo y hábito tabáquico, seleccionados desde las consultas indicadas en el apartado anterior.

En cuanto a los criterios de exclusión:

- Se excluyeron, en todos los grupos, aquellos que habían sido sometidos a rehabilitación respiratoria durante al menos 6 meses antes de entrar en el estudio.
- Pacientes con insuficiencia renal conocida o un filtrado glomerular $< 50 \text{ mL/min/1,73m}^2$.
- Pacientes con EPOC que hubieran tenido una agudización 8 semanas antes de incluirse en el estudio.
- Pacientes con niveles de PCR $> 2,5 \text{ mg/dL}$.
- Pacientes con niveles elevados de creatina cinasa (CK) para excluir a pacientes con una posible disfunción muscular.
- Pacientes con otras enfermedades o tratados con fármacos que puedan causar alteraciones en los parámetros estudiados (enfermedades tumorales activas, insuficiencia cardíaca congestiva, sepsis, otras enfermedades respiratorias crónicas, situaciones críticas de otro origen, déficit de A1AT, etc.).

4.3. VARIABLES RECOGIDAS

Cuando los pacientes fueron reclutados en consulta al comienzo del estudio, se tomaron las muestras de sangre y se recogieron simultáneamente las siguientes variables:

Variables clínicas:

- Edad.

- Sexo (hombre/mujer).
- Hábito tabáquico: Fuma SI/NO e índice de paquetes año (IPA).
- Índice de Charlson (Charlson ME *et al* 1987).

Variables antropométricas:

- Talla (cm).
- Peso (kg).
- Índice de Masa Corporal (kg/m^2) e índice de masa magra (kg/m^2). El IMC se estimó mediante impedanciometría (OMROM BF511, Omrom, Japan), y el IMM se calculó mediante el cociente entre la masa magra y el cuadrado de la altura.
- Fuerza de miembros superiores determinada por manometría de prensión de mano. La prensión de mano mide la fuerza en miembros superiores (se solicitó a los pacientes que apretasen con la mayor fuerza posible en un dinamómetro que mide la fuerza que pueden realizar).
- Función pulmonar: espirometría donde se valoró la FEV1, FVC y FEV1/FVC pre y post-BD (en valores absolutos en mL y %) y saturación de O_2 (SatO_2) (GOLD 2022).
- T6MM con distancia caminada en metros. Se realizó de acuerdo con el protocolo de la American Thoracic Society (ATS statement: guidelines for the six-minute walk test, 2002). Se solicitó a los pacientes que caminasen todo lo que pudieran en un circuito consistente en 2 conos separados 29 metros, al final del trayecto se recogió la distancia caminada en metros, la saturación inicial y final.

Variables de control clínico de la EPOC:

- Puntuación en el cuestionario CAT (Jones PW *et al* 2009).
- Grado de disnea de la mMRC (Fletcher CM *et al* 1959).

- Número de agudizaciones (definidas como “empeoramiento agudo de los síntomas respiratorios que resultan en una terapia adicional” según las guías GOLD) en el año previo, recogidas como agudizaciones moderadas de la EPOC (exacerbaciones tratadas con antibióticos y/o corticoides sistémicos) y las hospitalizaciones como exacerbaciones graves de la EPOC.
- Número de ingresos por agudización de EPOC en el año previo.
- La desaturación de oxígeno, definida como una caída en la saturación de oxígeno $\geq 4\%$ o $\text{SatO}_2 < 90\%$ durante el TM6M (Casanova C *et al* 2008).
- Tratamiento farmacológico que está tomando para la EPOC (LAMA, doble broncodilatación o triple terapia).

Dentro del grupo de pacientes con EPOC se clasificó a los pacientes estables en subgrupos según criterios GOLD (GOLD 2022):

- En función del FEV1:
 - GOLD 1 ($\text{FEV1} \geq 80\%$ por espirometría post BD).
 - GOLD 2 (FEV1 entre 50% y 79%).
 - GOLD 3 (FEV1 entre 49% y 30%).
 - GOLD 4 ($\text{FEV1} < 30\%$).
- En función de los antecedentes de exacerbaciones, el mMRC y el cuestionario CAT:
 - GOLD A (pacientes con 1 o ninguna hospitalización y mMRC 0-1 y CAT < 10).
 - GOLD B (pacientes con 1 o ninguna hospitalización y mMRC ≥ 2 o CAT ≥ 10).
 - GOLD C (pacientes con ≥ 2 agudizaciones moderadas o ≥ 1 hospitalización y mMRC 0-1 y CAT < 10).
 - GOLD D (pacientes con ≥ 2 agudizaciones moderadas o ≥ 1 hospitalización y mMRC ≥ 2 o CAT ≥ 10).

Además de la clasificación de los pacientes según los criterios de inclusión, los pacientes fueron subdivididos en categorías clínicas en función de variables dicotómicas:

- Se consideraron como elevado riesgo de agudizar si tenía 2 o más exacerbaciones durante el año previo o una hospitalización previa (GOLD 2022).
- Distancia en el TM6M a los 350 m de acuerdo con el índice BODE (Celli BR *et al* 2004).
- Composición corporal (normal, obesidad y malnutrición). El diagnóstico de desnutrición asociada a la enfermedad se determinó según el consenso ESPEN (IMC <18,5 kg/m² o 18,5-22 kg/m², combinado con FFMI bajo (<17 kg/m² para hombres y <15 kg/m² para mujeres) (Cederholm T *et al* 2015).
- Índice de Charlson: como comorbilidad baja con 2 puntos o menos, y alta comorbilidad si tenía una puntuación mayor a 2 puntos (Charlson ME *et al* 1987).
- Fumador (paciente que fume o haya dejado de fumar hace menos de 6 meses) o exfumador (paciente que haya dejado de fumar hace más de 6 meses).

Posteriormente, los pacientes fueron seguidos durante 12 meses. Las exacerbaciones moderadas de la EPOC (exacerbaciones tratadas con antibióticos y/o corticoides sistémicos) y las hospitalizaciones por exacerbaciones graves de la EPOC se registraron prospectivamente durante las visitas de seguimiento preguntando al paciente en las visitas de seguimiento (6 y 12 meses después de ingresar al estudio), así como consultando las historias clínicas del hospital y de atención primaria.

Durante el seguimiento, los médicos con potencial decisión sobre el tratamiento de las agudizaciones desconocían los resultados de las muestras de sangre. La decisión de hospitalizar o no a los pacientes se hizo de acuerdo con sus propios criterios clínicos e independiente de los investigadores de este estudio.

4.4. DETERMINACIONES ANALÍTICAS

A todos los casos (pacientes y controles) se les realizó una extracción analítica de manera estandarizada entre las 08:00 y las 10:00 horas de la mañana de manera programada. En el caso de los pacientes con EPOC se extrajo la muestra durante la fase estable de su enfermedad.

Las muestras para suero y plasma (tubo sin anticoagulante y tubo con EDTA) se enviaron de manera inmediata al Biobanco de muestras y tejidos de Cantabria (IDIVAL) (anexo 3) donde se identificaron, alicuotaron y guardaron a -80°C hasta su procesamiento.

4.4.1. DETERMINACIONES BÁSICAS

Los parámetros séricos más habituales en el seguimiento clínico de estos pacientes (creatinina, ácido úrico, albúmina, CK y PCR) se cuantificaron mediante análisis automatizado estandarizado en un equipo Atellica CH Solution (Siemens® Healthineers, Tarrytown, NY, USA) usando los reactivos suministrados por Siemens y siguiendo estrictamente las instrucciones suministradas por el fabricante en ficha técnica.

4.4.1.1 Creatinina

La determinación de creatinina (mg/dL) se basa en la reacción enzimática de Fossati, Prencipe y Berti. (Fossati P *et al* 1983). La concentración de creatinina se obtiene midiendo la absorbancia del color azul a 596/694 nm. La absorbancia del color es proporcional a la concentración de creatinina.

4.4.1.2 Ácido úrico

La determinación de ácido úrico (mg/dL) se basa en la reacción enzimática de Fossati usando uratoxidasas con un punto final tipo Trinder (Fossati P *et al* 1980) (Trinder P 1969). El nivel del complejo resultante es directamente proporcional al nivel

de ácido úrico de la muestra. La absorbancia del complejo se mide como una reacción de punto final a 545/694 nm.

4.4.1.3 Albúmina

La determinación de albúmina (g/dL) se basa en el método de Doumas, Watson y Biggs y en él se usa verde de bromocresol (BCG) como colorante de reacción (Doumas BT *et al* 1972). Forma un complejo albúmina-BCG que se mide como reacción de punto final a 596/694 nm.

4.4.1.4 Creatina cinasa

La determinación de CK (U/L) es una adaptación del método de referencia de la IFCC (The International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine). La reacción se basa en el procedimiento modificado de Szasz (German Society for Clinical Chemistry 1977) (Szasz G *et al* 1976). La medición de creatina cinasa se mide gracias a la generación de NADPH (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducida). Este aumento en la concentración se mide por absorbancia a 340/596 nm.

4.4.1.5 Proteína C reactiva

La determinación de PCR (mg/dL) se basa en un ensayo inmunoturbidimétrico potenciado con látex (Keevil BG *et al* 1998). Estas partículas están recubiertas de anticuerpos anti-PCR y se aglutinan con rapidez en presencia de la proteína C reactiva, provocando un aumento de la turbidez que se mide a 571 nm.

El laboratorio del servicio de Análisis Clínicos y Bioquímica Clínica del HUMV, donde realizamos las determinaciones básicas, participa en el Control de Calidad externo y cumple los criterios de calidad (anexo 4).

4.4.2. DETERMINACIONES ESPECÍFICAS

Las moléculas asociadas a las mitocondrias las analizamos mediante ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay). El inmunoensayo es una técnica que utiliza anticuerpos específicos (monoclonales o policlonales) para la cuantificación de diferentes parámetros con capacidad antigénica. En nuestro trabajo hemos utilizado tanto el ELISA (inmunoensayo tipo sándwich con doble anticuerpo) como EIA (enzimoinmunoensayo competitivo de alta sensibilidad).

Se realizaron los diferentes ensayos incluyendo siempre en cada uno de ellos pacientes con EPOC en fase estable y controles para minimizar las variaciones intra e interensayo que pudieran interferir en los resultados y conclusiones obtenidas en el estudio. Además, en cada ensayo se repitieron algunos de los pacientes o controles ya realizados para analizar la reproductibilidad de los datos obtenidos.

4.4.2.1 Humanina

Las determinaciones de Humanina (pg/mL) se realizaron mediante inmunoensayo específico tipo sándwich con un kit comercial de Cusabio (Human Putative Humanin Peptide MT-RNR2 ELISA kit, Cusabio Biotech CO, Houston, TX).

Este ensayo emplea la técnica de inmunoensayo enzimático tipo sándwich cuantitativo. Las muestras fueron prediluidas a 1/5 de acuerdo con nuestras necesidades con el diluyente específico del kit utilizado, tal y como recomendaba el fabricante. Los estándares fueron preparados mediante diluciones seriadas de un estándar madre según como indicaba el protocolo.

Posteriormente se añadieron las muestras a una microplaca de pocillos recubiertos con el anticuerpo específico para MT-RNR2 donde se une la sustancia a determinar al primer anticuerpo y se deja incubar durante 2 horas a 37°C. Después de eliminar cualquier sustancia no unida mediante lavados con buffer, se agrega a los pocillos un anticuerpo conjugado con biotina específico para MT-RNR2 y se incuba durante 1 hora más. Tras un segundo lavado, se añade a los pocillos avidina-HRP (Horseradish

Peroxidase) conjugada y se deja incubando durante otra hora. La avidina es importante en la señal colorimétrica que se produce tras la reacción enzimática.

En un tercer lavado, para eliminar cualquier sustancia que no intervenga en la unión antígeno-anticuerpo final, se agrega el sustrato TMB a los pocillos que junto a la biotina-avidina va a producir una reacción enzimática colorimétrica directamente proporcional a la concentración de Humanina. La lectura de la intensidad espectrofotométrica se realizó a 450 nm de longitud de onda y los valores se calcularon de forma directa a partir de la curva de calibración (Autospline).

La sensibilidad de este ensayo es <7 pg/mL; Especificidad: no existe reacción cruzada significativa con análogos. Precisión intra e interensayo fue $<8\%$ y $<10\%$ respectivamente. La linealidad se encuentra entre 28 pg/mL - 1800 pg/mL.

4.4.2.2 GDF-15

Las determinaciones de GDF-15 (pg/mL) se realizaron por inmunoensayo específico tipo sándwich con un kit comercial de ThermoFisher Scientific (ThermoFisher Scientific Human GDF-15 ELISA Kit, EHGF15, Carlsbad, CA).

El ensayo incluye una predilución a 1/5 de las muestras con el buffer específico del kit. La preparación de los estándares de la curva de calibración se realizó mediante diluciones seriadas con el buffer específico del ensayo a partir de una muestra primaria.

Las muestras y los estándares de la curva de calibración se añadieron a los pocillos recubiertos de la placa y se incubaron durante 2 horas y media a temperatura ambiente.

Tras un primer lavado se añade un conjugado biotinizado y se incuba durante 1 hora. Tras un segundo lavado se añade un preparado de estreptavidina-HRP que se incuba durante 45 minutos. Tras el último lavado se añade el sustrato para la reacción enzimática directamente proporcional a la cantidad de antígeno de la muestra.

Por último, tras el último lavado se añadió el sustrato para la reacción enzimática que se valoró espectrofotométricamente a 450 nm y los valores se calcularon de forma directa a partir de la curva de calibración (Autospline).

La sensibilidad es de 2 pg/mL; Especificidad: no existe reacción cruzada significativa con: Human Angiogenin, BDNF, BLC, CNTF, ENA-78, FGFs 4, 6 y 7, Interleukins 1alfa, 1beta, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12 p70, 12p40, 13 y 15, I309, IP-10, G-CSF, GDNF, GM-CSF, IF-gamma, IGFBPs 2,3 y 4, Leptin (OB), MCP-1, 2 y 3, MDC, MIF, MIG, MIPs 1alfa, 1beta, 1delta, PARC, PDGF, RANTES, SCF, SDF-1alfa, TARC, TGF-beta, TIMP 1 y 2, TNF-alfa y beta, TPO y VEGF. Precisión intra e interensayo fue <10% y <12% respectivamente. Linealidad entre 1,1 pg/mL - 800 pg/mL.

4.4.2.3 FGF-21

Las determinaciones de FGF-21 (pg/mL) se realizaron por inmunoensayo específico tipo sándwich con un kit comercial de RayBiotech (RayBioR Human FGF-21 ELISA kit, ELH-FGF21, RayBiotech, Norcross, GA).

El ensayo incluye una predilución a 1/3 de las muestras con el buffer específico suministrado por el kit. La preparación de los estándares de la curva de calibración se consiguió mediante diluciones seriadas con el buffer del ensayo a partir de una concentración.

Se añadieron a los pocillos de la placa recubiertos de anticuerpo los estándares de la curva de calibración y las muestras a determinar y se incubaron durante 2 horas y media a temperatura ambiente.

Tras un primer lavado se añadió el conjugado de biotina y se dejó incubar nuevamente durante una hora. Tras un segundo lavado se añadió el preparado de estreptavidina-HRP, que se une a la biotina y la HRP conjugada proporciona la actividad enzimática para la detección con un sistema de sustratos apropiados, la cual se incubó durante 45 minutos.

Por último, tras el último lavado se añadió el sustrato para la reacción enzimática que espectrofotométricamente valoraremos a 450 nm y los valores se calcularon de forma directa a partir de la curva de calibración (Autospline).

La sensibilidad de ensayo es 8 pg/mL; Especificidad: no existe reacción cruzada significativa con los siguientes compuestos: Human ADAM 12 y 8, B7-H3, BMPR-IB, Cadherins 13 y 4, CDs 155, 229, 48, 58, 84 y 99, CEACAM-5, CFXIV, Cystatins A, B y E/M, Desmoglein2, DR3, ErbB4, ESAM, Galectin 2 y 9, ICOS, JAM A y B, Kallicrein 5, Mickine, Pentraxin 3, Pref-1, Siglec-10, SLAM, SP-D, Syndecan-4, Testican-2, TIM-3, TLR4, TRAIL y ULBP-1análogos. La precisión intra e interensayo fue <10% y <12% respectivamente y la linealidad entre 8 pg/mL - 2000 pg/mL.

4.4.2.4 MOTS-c

Las determinaciones de MOTS-c (ng/mL) se realizaron mediante inmunoensayo de tipo competitivo con un kit comercial de Cloud-Clone Corp. [Mitochondrial Open Reading Frame of the 12S rRNA-c (MOTS-c) kit, CEX132Hu, Katy, TX].

En este ensayo las muestras fueron prediluidas con PBS (Phosphate Buffered Saline) a 1/20. Los estándares fueron preparados mediante diluciones seriadas, también con PBS tal y como recomendaba el fabricante.

Tras añadir los estándares y las muestras a la microplaca de pocillos recubiertos de anticuerpo se añadió MOTS-c ligada a biotina que competirá con la propia de la muestra dejándolo incubar durante una hora. Tras un lavado que elimina los antígenos marcados con biotina no unidos y otras sustancias que no entran en la reacción, se añade una solución de avidina conjugada a peroxidasa y se incuba 30 minutos a 37°C. Tras un nuevo lavado se añade el substrato para la reacción enzimática desarrollando una reacción espectrofotométrica inversamente proporcional a la cantidad de MOTS-c en la muestra.

La lectura espectrofotométrica se realiza a 450 nm y los valores se calculan de forma directa a partir de una curva de calibración (4PL).

Sensibilidad <0,96 ng/mL; Especificidad: no existe reacción cruzada significativa con análogos. Precisión intra e interensayo fue <10% y <12% respectivamente. Linealidad entre 2,47 ng/mL - 200 ng/mL.

4.4.2.5 ROMO1

Las determinaciones de Romo1 (ng/mL) se realizaron por inmunoensayo específico tipo sándwich con un kit comercial de Elabscience Biotechnology Inc. [Elabscience® Human ROMO1 (Reactive oxygen species modulator 1) ELISA Kit, USA].

Este inmunoensayo utiliza el principio Sandwich-ELISA. La microplaca está recubierta previamente con un anticuerpo específico de Romo1 humano. Las muestras (previamente diluidas a 1/2) y los estándares de la curva de calibración previamente reconstituidos se agregan a los pocillos de la placa que se combinaran con el anticuerpo específico.

Tras los sucesivos lavados y de manera secuencial se añaden un anticuerpo de detección biotinilado y un conjugado de avidina-HRP y se incuban durante una hora a 37°C. Tras la incubación procedemos a un nuevo lavado y se añade la solución de sustrato que se incuba durante una hora más. La reacción enzima-sustrato finaliza con la adición de solución de parada midiendo la densidad óptica de la reacción espectrofotométricamente a una longitud de onda de 450 nm. Los resultados se extrapolan directamente de la curva de calibración (Autospline).

Sensibilidad 0,1 ng/mL; Especificidad: no existe reacción cruzada significativa con análogos. Precisión intra e interensayo fue <10%. Linealidad entre 0,16 ng/mL - 10 ng/mL.

4.5. PROCESAMIENTO DE DATOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El cálculo del tamaño muestral se realizó utilizando Stata Statistical Software: Release 15. College Station, TX: StataCorp LLC.), aceptando un riesgo α de 0,05 y un riesgo β de 0,2.

Los datos de todos los sujetos incluidos en el estudio se introdujeron en la base de datos Excel 2019 versión 17.0, de la cual en el momento del análisis se transfirieron al programa estadístico IMB SPSS Statistics v 25.0.

Se comprobó la distribución normal o no de las diferentes variables con el test de Kolmogorov-Smirnov. Para aquellas variables con distribución paramétrica los datos se presentaron como media $\pm$ desviación estándar (SD) y para variables de distribución no paramétrica como mediana (rango intercuartílico).

Las diferencias entre los grupos se analizaron mediante pruebas t no pareadas para datos paramétricos o pruebas de Mann-Whitney para datos no paramétricos. Las diferencias entre variables cualitativas se analizaron mediante chi-cuadrado.

Para el análisis multivariante se dicotomizaron las variables HN, MOTS-c, GDF-15, FGF-21 y Romo1 con un corte en la mediana, lo que proporcionó el mejor poder de discriminación para nuestros resultados longitudinales, ya que aportó el valor más bajo del criterio de información de Akaike, como se observa en otros estudios similares (Husebø GR *et al* 2017) (Kempf T *et al* 2007).

Se realizó una regresión lineal univariante y multivariante para evaluar qué factores explican la varianza de HN, MOTS-c, GDF-15, FGF-21 y Romo1. Las asociaciones transversales entre las características de la enfermedad de la EPOC y los niveles sistémicos de HN, MOTS-c, GDF-15, FGF-21 y Romo1 se evaluaron mediante regresión logística univariante y multivariante, con HN, MOTS-c, GDF-15, FGF-21 y Romo1 alto versus bajo, como variables de resultado.

Se utilizaron estimaciones de supervivencia de Kaplan-Meier para calcular la proporción de participantes que tuvieron un evento a lo largo del tiempo. Se realizó un análisis univariante y multivariante utilizando el análisis de riesgo proporcional de Cox mediante el software SPSS versión 25.00 para PC para identificar los factores de riesgo asociados con las exacerbaciones moderadas de la EPOC y la hospitalización debido a las exacerbaciones de la EPOC.

Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando se obtuvieron valores $p < 0,05$. Todos los valores informados son bilaterales.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. POBLACIÓN INCLUIDA EN EL ESTUDIO

En nuestro estudio valoramos una muestra de 247 participantes (54 controles fumadores sin EPOC y 193 pacientes con EPOC) que se recogieron entre octubre de 2018 hasta 2021 en la consulta externa de EPOC de Neumología en el HUMV y en la consulta de deshabituación tabáquica de primaria (UDESTA).

Durante el seguimiento, se descartaron 24 participantes que fueron excluidos por enfermedad renal crónica (5 en el grupo control y 19 del grupo EPOC); 3 pacientes por presentar durante el seguimiento un diagnóstico alternativo a EPOC (asma y dos pacientes con mala técnica espirométrica), y 6 pacientes por presentar elevación de PCR en sangre. Además, en algunos casos la muestra obtenida no fue suficiente para hacer todas las determinaciones, por lo que la evaluación de MOTs-c y Romo1 se realizaron en una muestra ligeramente inferior.

Dado lo anterior los resultados se muestran como 2 subestudios:

- 1) Población de 247 sujetos (165 pacientes con EPOC y 49 controles fumadores sin EPOC) en los que se ha evaluado HN, GDF-15 y FGF-21 (Figura 3).
- 2) Población de 222 sujetos (142 pacientes con EPOC y 47 controles fumadores sin EPOC) en los que se evaluó específicamente MOTs-c y Romo1 (Figura 4).

Figura 3. Estudio 1: Distribución de las muestras con HN, GDF-15 y FGF-21.

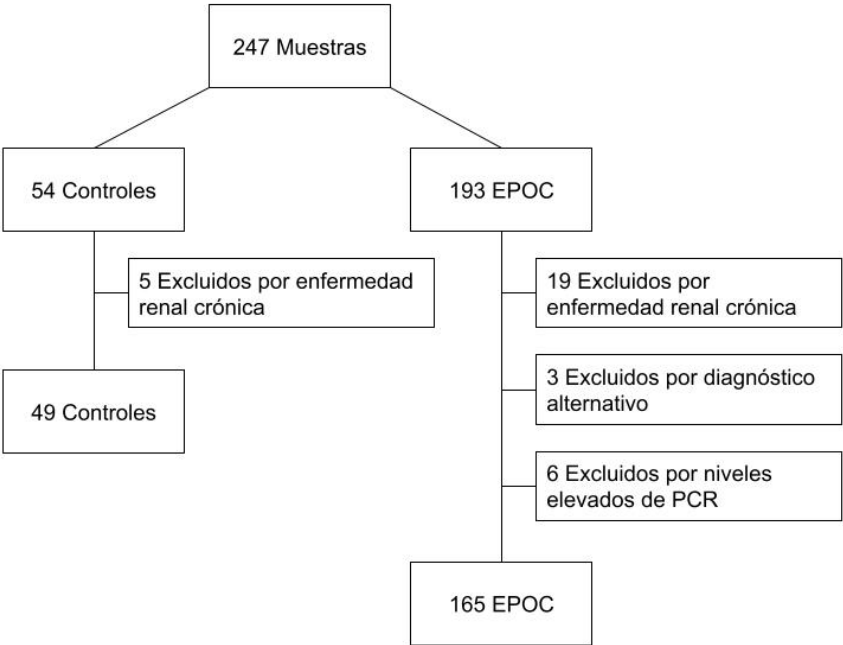
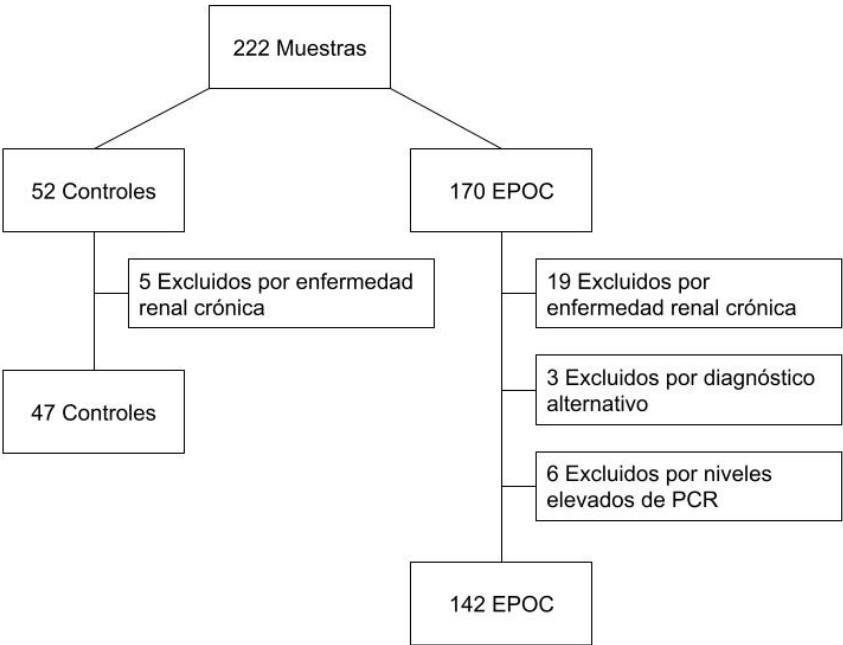


Figura 4. Estudio 2: Distribución de las muestras con MOTS-c y Romo1.



5.1.1. ESTUDIO 1

Se presentan en la Tabla 8 las características demográficas, clínicas y bioquímicas de las 214 muestras analizadas en las cuales se determinaron los valores de HN, GDF-15 y FGF-21.

Se incluyeron 165 pacientes y 49 controles fumadores sin EPOC, emparejados por sexo y edad. En el grupo de pacientes con EPOC, la edad media fue de $68,0 \pm 7,6$ años, y el 65,5% eran hombres. Hubo una alta prevalencia de fumadores activos (29,7%), y la mayoría de los pacientes tenía una obstrucción moderada o grave al flujo de aire en las vías respiratorias. Aunque no se encontraron diferencias significativas en el FFMI y el IMC, los pacientes con EPOC tenían una malnutrición significativamente mayor que el grupo control ($p = 0,017$). Además, el índice de Charlson fue significativamente mayor en los pacientes con EPOC ($p = 0,018$).

El grupo control tenía una función pulmonar normal ($p < 0,001$), así como un cuestionario CAT ($p < 0,001$) y un índice de Charlson más bajo como era de esperar ($p = 0,018$). Además, tenían una mayor distancia recorrida en el TM6M que los pacientes con EPOC ($p < 0,001$).

No hubo diferencias significativas entre el número de fumadores activos entre ambos grupos. Tampoco existen diferencias en el análisis de las variables bioquímicas basales estudiadas entre ambos grupos (albúmina, creatinina, ácido úrico y CK).

En cuanto al nivel de las mitokinas, los pacientes con EPOC mostraron niveles significativamente más altos de HN frente a los controles: 246 (69-507) pg/mL versus 186 (39-338) pg/mL ($p = 0,037$) (Figura 5), así como de GDF-15: 1244 (913-1716) pg/mL frente a los controles: 1050 (737-1488) pg/mL ($p = 0,013$) (Figura 6). En cambio, los niveles de FGF-21 no difirieron entre pacientes y controles (Figura 7).

Tabla 8. Características demográficas, clínicas y bioquímicas de HN, GDF-15 y FGF-21.

Variable	EPOC n = 165	Grupo control n = 49	p
Edad (años)	68,0 ± 7,6	66,2 ± 6,3	0,116
Sexo Masculino n (%)	108 (65,5)	29 (59,2)	0,498
FVC (mL)	2664 ± 810	3435 ± 971	<0,001
FVC (%)	83,3 ± 69	100,0 ± 19	<0,001
FEV1 (mL)	1250 (870-1725)	2610 (2030-2930)	<0,001
FEV1 (%)	52 (36,5-68,0)	95 (84,0-109,0)	<0,001
FEV1/FVC	50 (38,6-60,3)	75 (72,0-78,0)	<0,001
Peso (kg)	74,5 ± 16,3	75,9 ± 14,0	0,579
IMC (kg/m ²)	27,0 (24,1-31,6)	27,5 (25,2-29,8)	0,820
TM6M (m)	427 (330-490)	525 (447-572)	<0,001
Dinamometría de presión de mano (kg)	30 (23-38)	31 (25-41)	0,409
FFMI (kg/m ²)	18,8 ± 2,9	18,6 ± 1,5	0,802
CAT score	13 (7-19,3)	3 (1-5,3)	<0,001
Índice de Charlson	1 (1-2)	1 (0-2)	0,018
Puntuación mMRC 0/I/II/III/IV n (%)	42 (25,5) / 49 (29,7) / 45 (27,3) / 29 (17,6) / 0 (0)	39 (79,6) / 9 (18,4) / 1 (2,0) / 0 (0) / 0 (0)	<0,001
Fumadores actuales n (%)	49 (29,7)	21 (42,9)	0,085
Pacientes con malnutrición n (%)	34 (20,6)	4 (8,1)	0,017
GOLD 1/2/3/4 n (%)	22 (13,3) / 69 (41,8) / 51 (30,9) / 23 (13,9)	-	-
GOLD A/B/C/D n (%)	52 (31,5) / 51 (30,9) / 13 (7,9) / 49 (29,7)	-	-
Riesgo alto de agudizar n (%)	61 (37)	-	-
1 o más ingresos en el año previo n (%)	31 (18,8)	-	-
Corticoides inhalados n (%)	86 (52,1)	-	
Diabetes mellitus n (%)	26 (15,7)	8 (16,3)	0,870
Humanina (pg/mL)	246 (69-507)	186 (39-338)	0,037
GDF-15 (pg/mL)	1244 (913-1716)	1050 (737-1488)	0,013
FGF-21 (pg/mL)	321,9 (176,9-514,1)	242,1 (136,5-396,9)	0,880
Albumina (g/dL)	4,80 ± 0,30	4,78 ± 0,27	0,695

(Continuación Tabla 8)

Variable	EPOC n = 165	Grupo control n = 49	p
Creatinina (mg/dL)	0,83 (0,69-0,96)	0,82 (0,70-0,94)	0,975
Ácido úrico (mg/dL)	6,20 ± 1,88	5,80 ± 1,49	0,149
CK (U/L)	66 (44-95)	68 (41-93)	0,910

FEV1: volumen espiratorio forzado en el primer segundo; FVC: capacidad vital forzada, IMC: índice de masa corporal, TM6M: Test de la Marcha de 6 Minutos, m: metros, FFMI: índice de masa libre de grasa, CAT score: cuestionario CAT, mMRC: escala modificada del Medical Research Council, Malnutrición: IMC <18,5 kg/m² o 18,5-22 kg/m² combinado con FFMI bajo (<17 kg/m² para hombres y <15 kg/m² para mujeres), GOLD: Global initiative for Chronic Obstructive Lung Disease, CK: creatina cinasa. **Las variables resaltadas en negrita mostraron significación estadística.**

Figura 5. Distribución de los niveles séricos de HN en el grupo control y en el grupo EPOC.

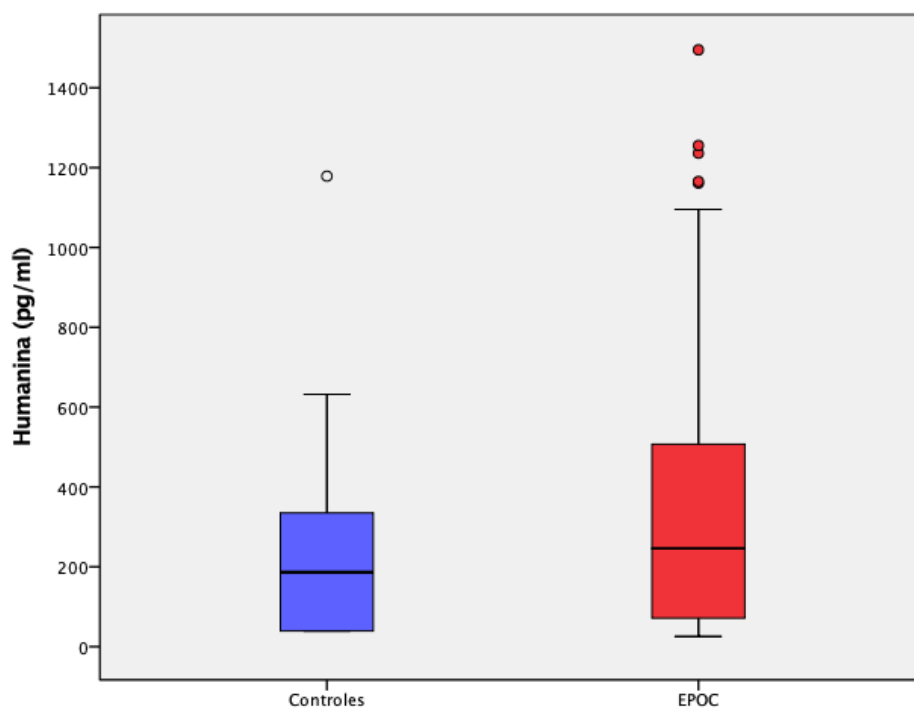


Figura 6. Distribución de los niveles séricos de GDF-15 en el grupo control y en el grupo EPOC.

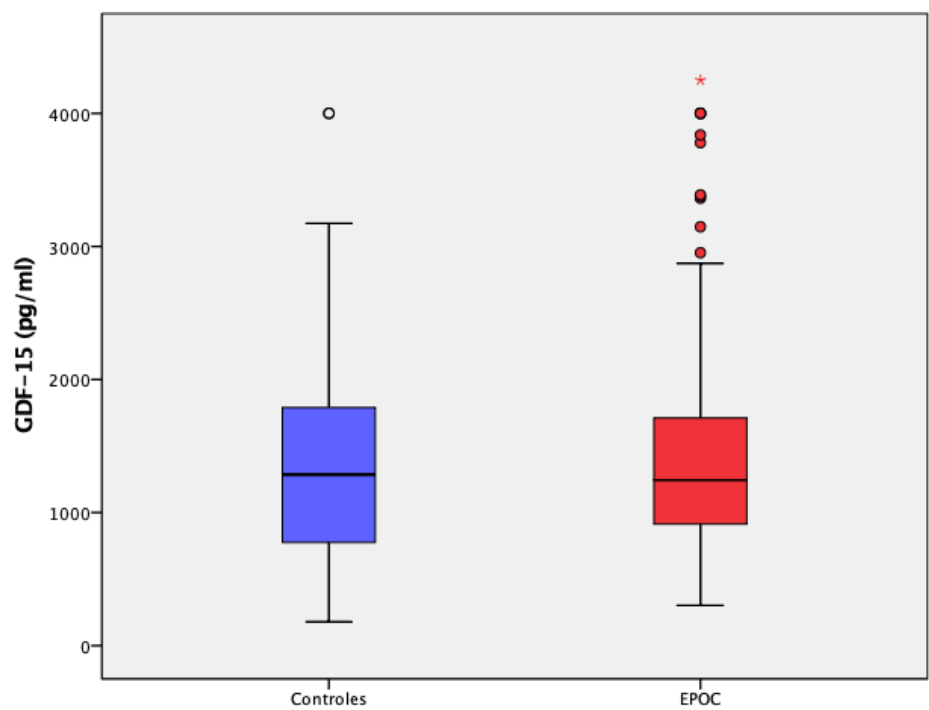
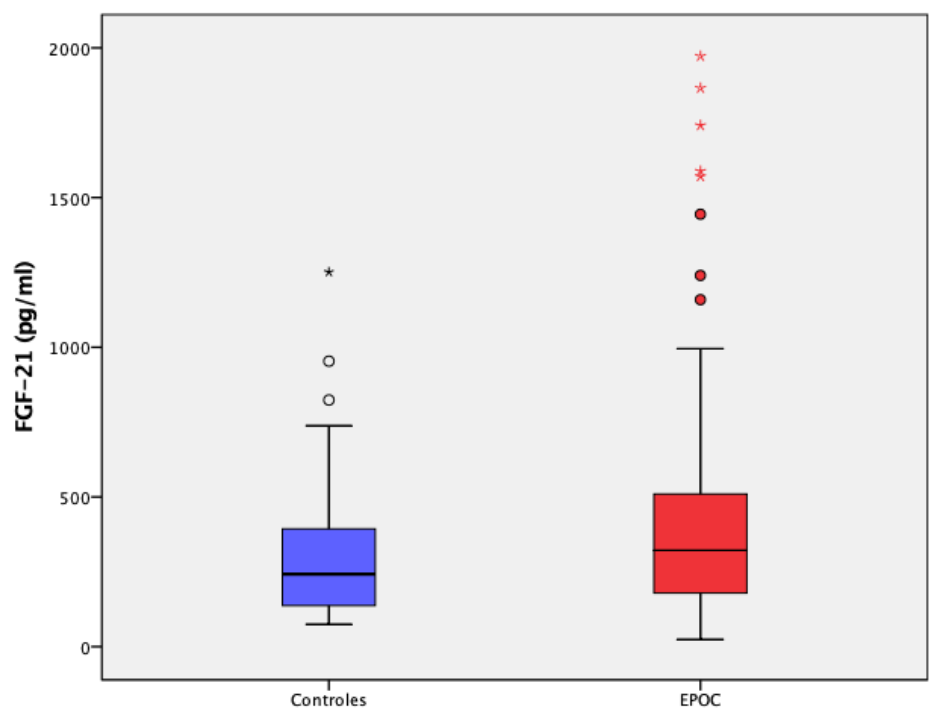


Figura 7. Distribución de los niveles séricos de FGF-21 en el grupo control y en el grupo EPOC.



5.1.2. ESTUDIO 2

En la Tabla 9 se presentan las características demográficas, clínicas y bioquímicas del segundo estudio, en el cual se determinaron los valores de MOTS-c y Romo1.

Esta muestra estaba formada por 142 pacientes con EPOC y 47 controles emparejados por edad y sexo. En el grupo EPOC la edad media de los pacientes fue de $67,5 \pm 7,7$ años y el 66,2% eran hombres, sin haber diferencias significativas con el grupo control. En el grupo EPOC, hubo una alta prevalencia de fumadores activos y la mayoría presentaba obstrucción moderada o grave al flujo de aire de las vías respiratorias.

La prevalencia de la malnutrición fue significativamente mayor en el grupo EPOC que en el grupo control ($p = 0,018$) a pesar de tener el FFMI y el IMC similares.

El grupo de control tenía una función pulmonar normal, un CAT más bajo y una distancia recorrida en el TM6M más alta que los pacientes con EPOC. La prevalencia de diabetes mellitus (una causa bien conocida de niveles bajos de MOTS-c) fue similar en ambos grupos ($p = 0,842$).

No se encontraron diferencias significativas entre el número de fumadores activos entre ambos grupos. Tampoco se encontraron en el análisis de las variables bioquímicas basales estudiadas entre ambos grupos (albúmina, creatinina, ácido úrico y CK).

En cuanto al nivel de las mitokinas, los niveles de MOTS-c fueron significativamente más bajos en el grupo con EPOC: 622 (482-848) ng/mL frente al grupo control 764 (604-906) ng/mL ($p = 0,022$) (Figura 8).

No encontramos diferencias significativas en los niveles séricos de MOTS-c en pacientes con EPOC con diabetes: 681 (452-1150) ng/mL o sin diabetes: 688 (504-924) ng/mL ($p = 0,853$). Los niveles de MOTS-c no se correlacionaron con HbA1c ($r = 0,165$, $p = 0,649$) en pacientes diabéticos, por lo que todos los pacientes con EPOC se consideraron como un único grupo.

Los niveles de Romo1 fueron mayores en el grupo con EPOC: 5,42 (2,84-8,72) ng/mL frente a los controles: 3,72 (1,64-7,59) ng/mL ($p = 0,038$) (Figura 9).

Tabla 9. Características demográficas, clínicas y bioquímicas de MOTS-c y Romo1.

Variable	EPOC n = 142	Grupo control n = 47	p
Edad (años)	67,5 ± 7,7	65,6 ± 6,8	0,113
Sexo Masculino n (%)	94 (66,2)	31 (62,0)	0,592
FVC (mL)	2723 ± 814	3429 ± 861	<0,001
FVC (%)	83 ± 20	102 ± 18	<0,001
FEV1 (mL)	1285 (900-1820)	2635 (2072-3002)	<0,001
FEV1 (%)	52 (37-68)	98 (86-111)	<0,001
FEV1/FVC	49 (39-60)	75 (72-79)	<0,001
Peso (kg)	74,7 ± 16,2	74,3 ± 14,8	0,830
IMC (kg/m ²)	27,0 (24,1-31,6)	27,3 (25,1-29,8)	0,810
TM6M (m)	445 (355-495)	525 (448-578)	<0,001
Dinamómetro de presión de mano (kg)	31 (24-40)	33 (23-40)	0,667
FFMI (kg/m ²)	18,9 ± 2,7	19,2 ± 2,4	0,166
CAT score	12 (7-18)	3 (1-5)	<0,001
Índice de Charlson	1 (1-2)	1 (0-2)	0,092
Puntuación mMRC 0/I/II/III/IV n (%)	39 (27,5) / 43 (30,3) / 38 (26,8) / 22 (15,5)	38 (80,8) / 8 (17,0) / 1 (2,1) / 0 (0) / 0 (0)	<0,001
Fumadores actuales n (%)	43 (30,6)	22 (46,8)	0,059
Pacientes con malnutrición n (%)	36 (25,4)	4 (8,5)	0,018
GOLD 1/2/3/4 n (%)	19 (13,4) / 59 (41,5) / 47 (33,1) / 17 (12,0)	-	-
GOLD A/B/C/D n (%)	49 (34,5) / 39 (27,5) / 13 (9,2) / 41 (28,9)	-	-
Riesgo alto de agudizar n (%)	56 (39,4)	-	-
1 o más ingresos en el año previo year n (%)	28 (19,7)	-	-
Corticoides inhalados n (%)	71 (50,0)	-	
Diabetes mellitus n (%)	26 (18,3)	8 (17,0)	0,842
MOTS-c (ng/mL)	622 (482-848)	764 (604-906)	0,022
Romo1 (pg/mL)	5,42 (2,84-8,72)	3,72 (1,64-7,59)	0,038
Albumina (g/dL)	4,80 ± 0,31	4,83 ± 0,28	0,681
Creatinina (mg/dL)	0,82 (0,70-0,96)	0,87 (0,71-0,98)	0,528

(Continuación Tabla 9)

Variable	EPOC n = 142	Grupo control n = 47	p
Ácido úrico (mg/dL)	6,19 ± 1,73	5,98 ± 1,38	0,464
CK (U/L)	65 (45-95)	64 (41-113)	0,785

FEV1: volumen espiratorio forzado en el primer segundo; FVC: capacidad vital forzada, IMC: índice de masa corporal, TM6M: Test de la Marcha de 6 Minutos, m: metros, FFMI: índice de masa libre de grasa, CAT score: cuestionario CAT, mMRC: escala modificada del Medical Research Council, Malnutrición: IMC <18,5 kg/m² o 18,5-22 kg/m² combinado con FFMI bajo (<17 kg/m² para hombres y <15 kg/m² para mujeres), GOLD: Global initiative for Chronic Obstructive Lung Disease, CK: creatina cinasa. **Las variables resaltadas en negrita mostraron significación estadística.**

Figura 8. Distribución de los niveles séricos de MOTS-c en el grupo control y en el grupo EPOC.

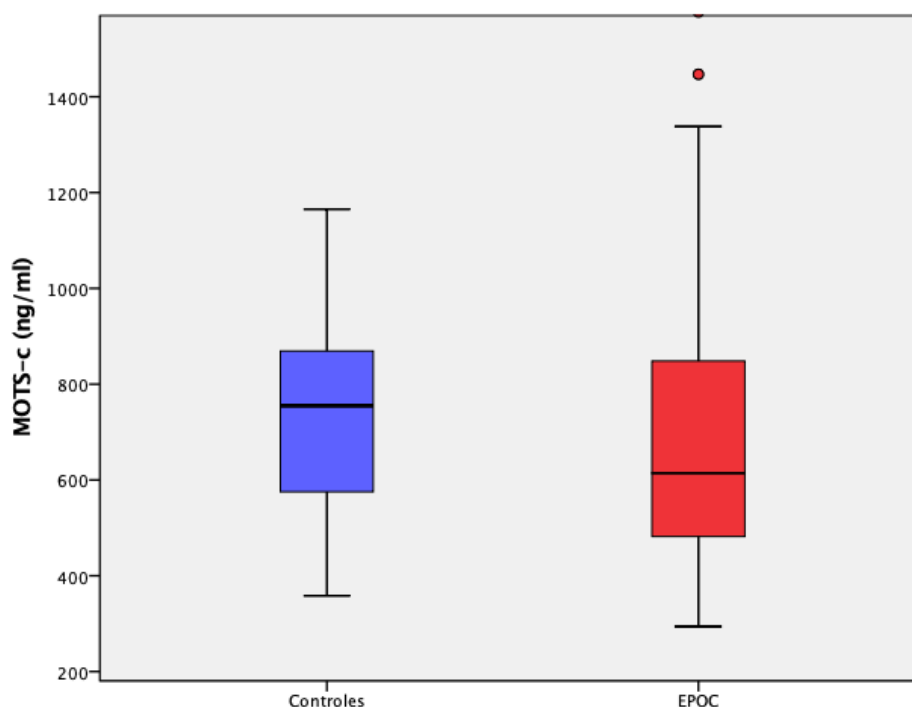
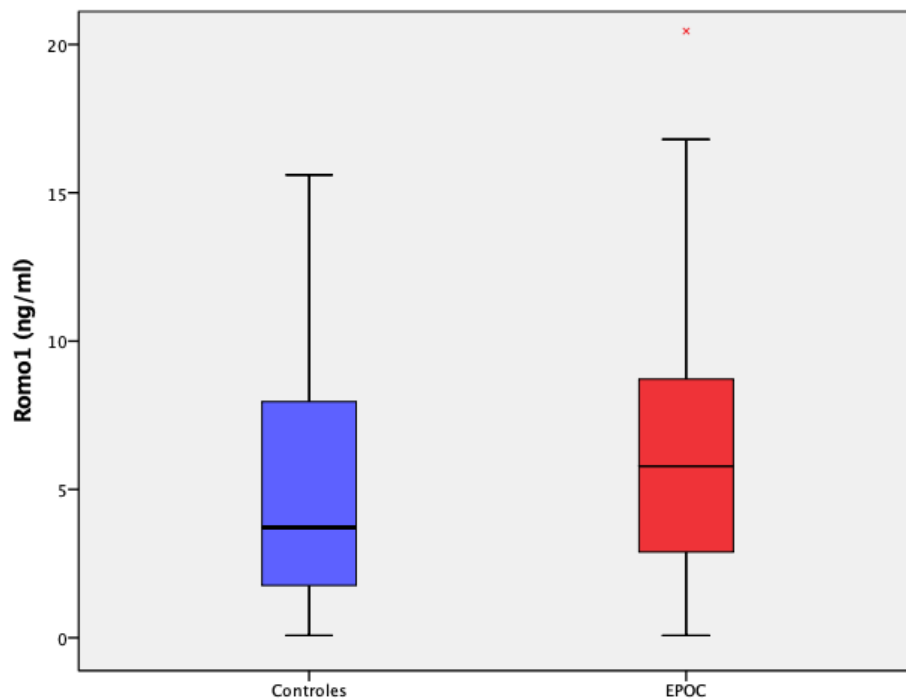


Figura 9. Distribución de los niveles séricos de Romo1 en el grupo control y en el grupo EPOC.



5.2. CORRELACIONES ENTRE LAS MOLÉCULAS RELACIONADAS CON LA MITOCONDRIA EN PACIENTES CON EPOC

Al inicio del trabajo de esta tesis, se realizó un estudio de correlación simple donde se observó que las moléculas relacionadas con la mitocondria no se correlacionaron entre sí, a excepción de la MOTS-c y la Romo1 como se observa a continuación (Tabla 10).

Tabla 10. Correlaciones entre las moléculas relacionadas con la mitocondria.

		HN	GDF-15	FGF-21	Romo1	MOTS-c
HN	Coeficiente de correlación	1,000	-0,083	0,010	-0,043	0,129
	Sig. (bilateral)	.	0,326	0,896	0,586	0,123
	N	164	144	164	164	145
GDF-15	Coeficiente de correlación		1,000	0,133	0,000	0,053
	Sig. (bilateral)		.	0,111	0,997	0,544
	N		145	145	145	132
FGF-21	Coeficiente de correlación			1,000	0,093	0,047
	Sig. (bilateral)			.	0,235	0,576
	N			165	165	146
Romo1	Coeficiente de correlación				1,000	0,300
	Sig. (bilateral)				.	<0,001
	N				165	146
MOTS-c	Coeficiente de correlación					1,000
	Sig. (bilateral)					.
	N					146

Las variables resaltadas en negrita mostraron significación estadística.

5.3. ASOCIACIÓN DE LOS NIVELES CIRCULANTES DE LAS MOLÉCULAS RELACIONADAS CON LA MITOCONDRIA Y LAS CARACTERÍSTICAS BASALES DE LA EPOC

A continuación, se presentan los resultados obtenidos para cada una de las moléculas asociadas con la mitocondria en relación con los datos clínicos de los pacientes con EPOC.

Es importante detallar que ningún paciente de los dos grupos EPOC (aquellos en los que se midieron la HN, GDF-15 y FGF-21 y aquellos en los que se midió MOTS-c y Romo1) fue tratado de manera crónica o aguda, con esteroides sistémicos. En cuanto a los corticoides inhalados, no existieron diferencias significativas en ninguno de los casos (Tabla 11).

Tabla 11. Corticoides inhalados, diferencias entre los grupos.

variable	Pacientes en tratamiento con corticoides inhalados (n = 88)	Pacientes sin tratamiento (n = 77)	P
HN (pg/mL)	298,3 (100,6-530,0)	187,8 (43,5-454,0)	0,144
GDF-15 (pg/mL)	1246,0 (918,5-1246,0)	1230,8 (895,4-1773,5)	0,766
FGF-21 (pg/mL)	301,2 (152,4-472,2)	360,5 (182,8-560,9)	0,088
MOTS-c (ng/mL)	715,4 (519,8-1033,0)	662,0 (481,0-891,0)	0,224
Romo1 (pg/mL)	6,0 (2,2-8,4)	5,3 (3,3-9,0)	0,809

Por último, es importante detallar que se consideraron niveles altos de cada una de las mitokinas, siempre que el valor estuviera por encima de la mediana: HN >246 pg/mL, GDF-15 >1244 pg/mL, FGF-21 >321,9 pg/mL, MOTS-c >622 ng/mL y Romo1 >5,42 pg/mL.

5.3.1. HUMANINA

En la Tabla 12 se muestran los resultados obtenidos respecto a la Humanina. La regresión logística univariante indicó que los niveles altos de HN se asociaron con el riesgo alto de agudizar (considerando 2 o más exacerbaciones durante el año anterior o 1 ingreso el año previo), el TM6M, la desnutrición, el FFMI y la diabetes mellitus.

Además, la regresión logística multivariable indicó que los niveles altos de HN se asociaron de forma independiente con el riesgo alto de exacerbación (OR 3,546; 95% IC 1,472-5,649; $p = 0,005$), la obesidad (OR 0,039; IC 95% 0,007-0,219; $p = 0,001$), la malnutrición (OR 58,823; IC 95% 7,518-500; $p < 0,001$) y el TM6M (OR 0,995; IC del 95% 0,991-0,999; $p = 0,025$), mientras que el FFMI y la diabetes mellitus no.

Tabla 12. Análisis univariante y multivariante de HN.

	HN (n = 165)			
	Univariante		Multivariante	
Variables	OR (95% IC)	p	OR (95% IC)	P
Edad (años)	1,007 (0,967-1,048)	0,745	0,974 (0,918-1,035)	0,400
Sexo				
Masculino	1		1	
Femenino	0,851 (0,447-1,619)	0,623	1,364 (0,440-4,225)	0,591
Fumador				
Exfumador	1		1	
Activo	1,060 (0,543-2,069)	0,865	0,855 (0,350-2,087)	0,730
Agudizaciones				
0-1	1		1	
>1	3,255 (1,675-6,326)	<0,001	3,546 (1,472-5,649)	0,005
Composición corporal				
Normal	1		1	
Obeso	0,587 (0,287-1,200)	0,114	0,039 (0,007-0,219)	0,001
Malnutrición	4,015 (1,558-10,349)	0,004	58,823 (7,518-500,000)	<0,001
TM6M (m)	0,996 (0,993-0,998)	0,002	0,995 (0,991-0,999)	0,025
Índice de Charlson				
1	1		1	
2	1,171 (0,547-2,504)	0,684	0,735 (0,217-2,494)	0,622
>2	1,756 (0,794-3,886)	0,165	1,181 (0,389-3,585)	0,769
FEV1 (%)	0,987 (0,972-1,001)	0,072	1,012 (0,981-1,045)	0,452
FVC (%)	0,996 (0,982-1,011)	0,604	1,008 (0,978-1,039)	0,599
FFMI (kg/m²)	0,886 (0,793-0,990)	0,032	1,173 (0,930-1,478)	0,177
Diabetes mellitus	0,409 (0,173-0,968)	0,042	2,092 (0,691-6,335)	0,192
SatO₂	0,961 (0,859-1,075)	0,488	0,983 (0,852-1,134)	0,812

Malnutrición: IMC <18,5 kg/m² o 18,5-22 kg/m² combinado con FFMI bajo (<17 kg/m² para hombres y <15 kg/m² para mujeres); TM6M: Test de la Marcha de 6 Minutos, m: metros, FEV1: forced expiratory volume in the first second; FVC: capacidad vital forzada, FFMI: índice de masa libre de grasa, SatO₂: Saturación de oxígeno. Las variables resaltadas en negrita mostraron significación estadística.

5.3.2. GDF-15

En cuanto al GDF-15, los niveles altos se asociaron con la edad, el sexo femenino, la desnutrición, el TM6M, una mayor prevalencia de comorbilidades medida por el índice de Charlson y la diabetes mellitus (Tabla 13).

En la regresión logística multivariante se observó que los niveles altos de GDF-15 se asociaron de forma independiente con el sexo femenino (OR 0,254; IC 95% 0,079-0,818; $p = 0,022$), el riesgo alto de agudizar (OR 3,043; IC 95% 1,125-8,235; $p = 0,028$), el TM6M (OR 0,993; IC 95% 0,990-0,989; $p = 0,007$) y una mayor prevalencia de comorbilidades expresada por el índice de Charlson (OR 11,628; IC 95% 3,125-40,000; $p < 0,001$).

Tabla 13. Análisis univariante y multivariante de GDF-15.

	GDF-15 (n = 165)			
	Univariante		Multivariante	
Variables	OR (95% IC)	p	OR (95% IC)	P
Edad (años)	1,063 (1,019-1,110)	0,005	0,999 (0,935-1,067)	0,970
Sexo				
Masculino	1		1	
Femenino	0,433 (0,224-0,837)	0,013	0,254 (0,079-0,818)	0,022
Fumador				
Exfumador	1		1	
Activo	0,580 (0,295-1,142)	0,115	1,504 (0,558-4,051)	0,420
Agudizaciones				
0-1	1		1	
>1	1,032 (0,551-1,935)	0,921	3,043 (1,125-8,235)	0,028
Composición corporal				
Normal	1		1	
Obeso	1,195 (0,618-2,312)	0,597	0,481 (0,075-3,076)	0,439
Malnutrición	2,319 (1,006-5,343)	0,048	0,961 (0,237-3,902)	0,956
TM6M (m)	0,995 (0,992-0,998)	<0,001	0,993 (0,989-0,998)	0,007
Índice de Charlson				
1	1		1	
2	10,495 (4,236-26,000)	<0,001	1,241 (0,348-4,424)	0,739
>2	10,833 (4,184-28,050)	<0,001	11,628 (3,125-40,000)	<0,001
FEV1 (%)	0,991 (0,977-1,006)	0,225	0,979 (0,947-1,013)	0,230
FVC (%)	0,992 (0,978-1,007)	0,300	1,015 (0,984-1,047)	0,339
FFMI (kg/m²)	1,024 (0,913-1,149)	0,683	0,868 (0,665-1,133)	0,299
Diabetes mellitus	2,937 (1,211-7,123)	0,017	0,708 (0,210-2,394)	0,579
SatO₂	0,923 (0,820-1,040)	0,187	1,025 (0,871-1,206)	0,766

Malnutrición: IMC <18,5 kg/m² o 18,5-22 kg/m² combinado con FFMI bajo (<17 kg/m² para hombres y <15 kg/m² para mujeres), TM6M: Test de la Marcha de 6 Minutos, m: metros, FEV1: volumen espiratorio forzado en el primer segundo; FVC: capacidad vital forzada, FFMI: índice de masa libre de grasa, SatO₂: Saturación de oxígeno. Las variables resaltadas en negrita mostraron significación estadística.

5.3.3. FGF-21

En cuanto al FGF-21, en la regresión logística univariante no se asoció con ninguna característica típica de la enfermedad. Sin embargo, la regresión multivariante indicó que niveles altos de FGF-21 sí estaban asociados con el riesgo alto de agudizar (OR 2,298; IC 95% 1,019-5,182; $p = 0,045$) (Tabla 14).

Tabla 14. Análisis univariante y multivariante de FGF-21.

Variables	FGF-21 (n = 165)			
	Univariante		Multivariante	
	OR (95% IC)	p	OR (95% IC)	P
Edad (años)	1,013 (0,971-1,056)	0,552	0,984 (0,931-1,041)	0,581
Sexo				
Masculino	1		1	
Femenino	1,472 (0,756-2,869)	0,256	0,547 (0,199-1,528)	0,244
Fumador				
Exfumador	1		1	
Activo	1,473 (0,738-2,938)	0,272	1,432 (0,632-3,243)	0,390
Agudizaciones				
0-1	1		1	
>1	1,800 (0,934-3,469)	0,079	2,298 (1,019-5,182)	0,045
Composición corporal				
Normal	1		1	
Obeso	0,784 (0,528-2,334)	0,784	2,458 (0,536-11,263)	0,247
Malnutrición	0,728 (0,317-1,671)	0,454	3,002 (0,938-9,604)	0,064
TM6M (m)	0,999 (0,996-1,002)	0,492	0,997 (0,993-1,001)	0,097
Índice de Charlson				
1	1		1	
2	1,622 (0,677-3,883)	0,278	2,095 (0,696-6,304)	0,188
>2	1,003 (0,457-2,197)	0,995	1,440 (0,521-3,981)	0,428
FEV1 (%)	1,002 (0,987-1,017)	0,836	0,992 (0,962-1,023)	0,607
FVC (%)	1,000 (0,985-1,016)	0,972	1,005 (0,977-1,034)	0,714
FFMI (kg/m²)	1,038 (0,927-1,162)	0,522	0,919 (0,733-1,151)	0,461
Diabetes mellitus	0,580 (0,230-1,460)	0,248	0,505 (0,167-1,531)	0,227
SatO₂	1,066 (0,951-1,194)	0,273	1,138 (0,989-1,309)	0,071

Malnutrición: IMC <18,5 kg/m² o 18,5-22 kg/m² combinado con FFMI bajo (<17 kg/m² para hombres y <15 kg/m² para mujeres), TM6M: Test de la Marcha de 6 Minutos, m: metros, FEV1: volumen espiratorio forzado en el primer segundo; FVC: capacidad vital forzada, FFMI: índice de masa libre de grasa, SatO₂: Saturación de oxígeno. Las variables resaltadas en negrita mostraron significación estadística.

5.3.4. MOTS-c

Niveles altos de MOTS-c se correlacionaron en la regresión logística univariante con el TM6M y con el número de exacerbaciones previas. Además, la regresión logística multivariable confirmó que los niveles altos de MOTS-c se asociaron de forma independiente con el TM6M (OR 1,006; IC 95 % 1,001-1,011; $p = 0,016$) y con el número de exacerbaciones previas (OR 2,793; IC 95 % 1,098-7,092; $p = 0,031$) (Tabla 15).

Además, como puede verse en la Tabla 15, los niveles altos de MOTS-c se asociaron con Romo1 (OR 1,089; IC 95% 1,008-1,175; $p = 0,030$).

Tabla 15. Análisis univariante y multivariante de MOTS-c.

Variables	MOTS-c (n = 142)			
	Univariante		Multivariante	
	OR (95% IC)	p	OR (95% IC)	P
Edad (años)	0,994 (0,952-1,037)	0,777	1,012 (0,954-1,073)	0,691
Sexo				
Masculino	1		1	
Femenino	1,660 (0,822-3,353)	0,157	1,702 (0,539-5,377)	0,365
Fumador				
Exfumador	1		1	
Activo	1,222 (0,596-2,503)	0,584	0,805 (0,324-2,000)	0,641
Agudizaciones				
0-1	1		1	
>1	2,680 (1,246-5,765)	0,012	2,793 (1,098-7,092)	0,031
Composición corporal				
Normal	1		1	
Obeso	1,527 (0,562-4,149)	0,406	0,923 (0,169-5,047)	0,926
Malnutrición	1,002 (0,391-2,570)	0,996	0,405 (0,110-1,488)	0,176
TM6M (m)	1,003 (1,000-1,006)	0,038	1,006 (1,001-1,011)	0,016
Índice de Charlson				
1	1		1	
2	0,743 (0,273-2,021)	0,561	0,822 (0,592-6,342)	0,756
>2	1,479 (0,635-3,445)	0,364	1,938 (0,592- 6,342)	0,274
FEV1 (%)	1,003 (0,987-1,019)	0,735	0,983 (0,948-1,019)	0,360
FVC (%)	1,007 (0,991-1,024)	0,400	1,016 (0,983-1,049)	0,356
FFMI (kg/m²)	1,081 (0,960-1,217)	0,201	1,017 (0,786-1,316)	0,940
Romo1	1,050 (0,990-1,114)	0,104	1,089 (1,008-1,175)	0,030
Diabetes mellitus	0,228 (0,353-1,943)	0,665	1,340 (0,425-4,226)	0,425
SatO₂	0,978 (0,863-1,108)	0,726	0,937 (0,784-1,119)	0,474

Malnutrición: IMC <18,5 kg/m² o 18,5-22 kg/m² combinado con FFMI bajo (<17 kg/m² para hombres y <15 kg/m² para mujeres), TM6M: Test de la Marcha de 6 Minutos, m: metros, FEV1: volumen espiratorio forzado en el primer segundo; FVC: capacidad vital forzada FFMI: índice de masa libre de grasa, SatO₂: Saturación de oxígeno. Las variables resaltadas en negrita mostraron significación estadística.

5.3.5. ROMO1

Por último, los niveles altos de Romo1 se asociaron con los fumadores activos, con la saturación de oxígeno y con MOTS-c. De igual manera, estos niveles elevados de Romo1, en la regresión logística multivariante se asociaron de forma independiente con los fumadores activos (OR 2,673; IC 95% 1,036-6,896; $p = 0,042$), la saturación de oxígeno (OR 0,812; IC 95% 0,665-0,990; $p = 0,039$) y, como ya se ha comentado en el apartado anterior, con los niveles de MOTS-c (OR 1,001; IC 95% 1,000-1,003; $p = 0,015$) (Tabla 16).

Tabla 16. Análisis univariante y multivariante de Romo1.

Variables	Romo1 (n = 142)			
	Univariante		Multivariante	
	OR (95% IC)	p	OR (95% IC)	P
Edad (años)	0,980 (0,937-1,024)	0,361	0,967 (0,908-1,029)	0,291
Sexo				
Masculino	1		1	
Femenino	0,880 (0,430-1,799)	0,726	0,738 (0,233-2,341)	0,606
Fumador				
Exfumador	1		1	
Activo	2,411 (1,119-5,195)	0,025	2,673 (1,036-6,896)	0,042
Agudizaciones				
0-1	1		1	
>1	0,805 (0,373-1,736)	0,581	0,919 (0,367-2,297)	0,856
Composición corporal				
Normal	1		1	
Obeso	1,127 (0,427-2,979)	0,809	2,185 (0,396-12,068)	0,370
Malnutrición	1,642 (0,588-4,585)	0,344	1,823 (0,473-7,026)	0,383
TM6M (m)	0,999 (0,996-1,002)	0,502	0,998 (0,993-1,003)	0,364
Índice de Charlson				
1	1		1	
2	0,726 (0,252-2,092)	0,554	0,786 (0,226-2,729)	0,705
>2	0,444 (0,180-1,095)	0,078	0,394 (0,117- 1,331)	0,134
FEV1 (%)	1,006 (0,989-1,023)	0,501	1,004 (0,969-1,040)	0,823
FVC (%)	1,008 (0,990-1,025)	0,387	1,024 (0,991-1,057)	0,154
FFMI (kg/m²)	1,009 (0,896-1,137)	0,881	0,970 (0,746-1,260)	0,817
MOTS-c	1,001 (1,000-1,002)	0,031	1,001 (1,000-1,003)	0,015
Diabetes mellitus	0,420 (0,167-1,057)	0,066	0,582 (0,181-1,877)	0,365
SatO₂	0,816 (0,694-0,960)	0,014	0,812 (0,665-0,990)	0,039

Malnutrición: IMC <18,5 kg/m² o 18,5-22 kg/m² combinado con FFMI bajo (<17 kg/m² para hombres y <15 kg/m² para mujeres), TM6M: Test de la Marcha de 6 Minutos, FEV1: volumen espiratorio forzado en el primer segundo, FVC: capacidad vital forzada, FFMI: índice de masa libre de grasa, SatO₂: Saturación de oxígeno. Las variables resaltadas en negrita mostraron significación estadística.

5.4. MOLÉCULAS RELACIONADAS CON LA MITOCONDRIA Y SU RELACIÓN CON LA CAPACIDAD DE EJERCICIO

5.4.1. COMO PREDICTORES DEL TM6M

En el primer grupo estudiado, en el que se evaluó la relación de la HN, GDF-15 y FGF-21, hubo 48 pacientes con EPOC que caminaron menos de 350 m en el TM6M (36 pacientes con HN alta, 33 pacientes con GDF-15 alto y 31 pacientes con FGF-21 alto), mientras que, en el segundo grupo, fueron 35 pacientes (10 pacientes con MOTs-c alto y 14 con Romo1 alto).

El análisis de regresión logística multivariable se ajustó por la edad, el sexo, el índice de Charlson, el grado de disnea mMRC, el FEV1, el riesgo elevado de agudizar y por hábito tabáquico. Los resultados obtenidos indicaron que los niveles elevados de HN (OR 3,231; IC 95% 1,212-8,613; $p = 0,019$) y los niveles de MOTs-c alto (OR 0,314; IC 95% 0,118-0,835; $p = 0,020$) fueron predictores de caminar menos de 350 m en el TM6M (Tabla 17). Con el mismo modelo, ni GDF-15 alto ni FGF-21 alto ni Romo1 alto fueron predictores independientes de baja distancia caminada en el TM6M.

Tabla 17. Análisis de regresión logística que muestra factores asociados a caminar menos de 350 m en el TM6M.

Variable	B	p	OR	95% IC OR	
				Bajo	Alto
Niveles altos de HN	1,173	0,019	3,231	1,212	8,613
Niveles altos de GDF-15	0,613	0,231	1,845	0,677	5,031
Niveles altos de FGF-21	0,095	0,843	1,099	0,431	2,805
Niveles altos de MOTs-c	-1,158	0,020	0,314	0,118	0,835
Niveles altos de Romo1	0,469	0,365	1,598	0,579	4,409

Niveles altos = niveles por encima de la mediana (HN >246 pg/mL, GDF-15 >1244 pg/mL, FGF-21 >321,9 pg/mL MOTs-c >622 ng/mL y Romo1 >5,42 pg/mL). Ajustado por la edad, el sexo, el índice de Charlson, el grado de disnea mMRC (escala modificada del Medical Research Council), el FEV1 (volumen espiratorio forzado en el primer segundo), el riesgo alto de agudizar y por hábito tabáquico. Las variables resaltadas en negrita mostraron significación estadística.

5.4.2. COMO PREDICTORES DE DESATURACIÓN DE OXÍGENO

Un total de 62 pacientes del primer grupo (HN, GDF-15 y FGF-21) presentaron desaturación de oxígeno (39 pacientes con HN alta, 42 pacientes con GDF-15 alto y 38 pacientes con FGF-21 alto), mientras que en el segundo grupo fueron un total de 48 pacientes (18 pacientes con MOTs-c elevado y 23 con Romo1 elevado).

El análisis de regresión logística multivariable se ajustó por la edad, el sexo, el índice de Charlson, el grado de disnea mMRC, el FEV1, el riesgo elevado de agudizar y por hábito tabáquico. Se observó que niveles altos de HN (OR 2,358; IC 95% 1,067-5,213; $p = 0,034$), niveles altos de GDF-15 (OR 2,686; IC 95% 1,100-6,558; $p = 0,030$) y niveles altos de MOTs-c (OR 0,388; IC 95% 0,168-0,896; $p = 0,027$) (Tabla 18) fueron predictores independientes de desaturación de oxígeno. En cambio, ni FGF-21 ni Romo1 alto fueron predictores independientes de desaturación de oxígeno.

Tabla 18. Análisis de regresión logística que muestra predictores de desaturación de oxígeno en el TM6M.

Variable	B	p	OR	95% IC OR	
				Bajo	Alto
Niveles altos de HN	0,858	0,034	2,358	1,067	5,213
Niveles altos de GDF-15	0,988	0,030	2,686	1,100	6,558
Niveles altos de FGF-21	-0,449	0,277	0,638	0,284	1,434
Niveles altos de MOTs-c	-0,947	0,027	0,388	0,168	0,896
Niveles altos de Romo1	0,216	0,629	1,241	0,516	2,984

La desaturación de oxígeno se definió como $\geq 4\%$ reducción entre la saturación de oxígeno arterial antes y después de la prueba ($\Delta \text{SpO}_2 \geq 4\%$) y SpO_2 posttest $< 90\%$ medido por oximetría de pulso. *Niveles altos = niveles por encima de la mediana (HN $> 246 \text{ pg/mL}$, GDF-15 $> 1244 \text{ pg/mL}$, FGF-21 $> 321,9 \text{ pg/mL}$ MOTs-c $> 622 \text{ ng/mL}$ y Romo1 $> 5,42 \text{ pg/mL}$). Ajustado por la edad, el sexo, el índice de Charlson, el grado de disnea mMRC (escala modificada del Medical Research Council), el FEV1 (volumen espiratorio forzado en el primer segundo), el riesgo alto de agudizar y por hábito tabáquico. Las variables resaltadas en negrita mostraron significación estadística.*

5.5. MOLÉCULAS RELACIONADAS CON LA MITOCONDRIA COMO PREDICTORES DE AGUDIZACIONES

5.5.1. COMO PREDICTORES DE AGUDIZACIONES MODERADAS

Durante los 12 meses de seguimiento, en el primer grupo 93 de los 165 pacientes presentaron al menos una agudización moderada de la EPOC (57 en el grupo de HN alta, 44 en el grupo de GDF-15 alto y 35 en el grupo de FGF-21 alta), mientras que en el segundo grupo fueron 77 de los 142 pacientes (50 en el grupo MOTS-c alto y 37 en el grupo Romo1 alto).

El modelo de riesgo proporcional de Cox se ajustó por la edad, el sexo, el índice de Charlson, el grado de disnea mMRC, el FEV1, el riesgo elevado de agudizar y por hábito tabáquico (Tabla 19). Se observó que niveles de HN altos (HR 1,826; IC 95% 1,181-2,822; $p = 0,007$) (Figura 10) y MOTS-c altos (HR 2,003; IC 95% 1,201-3,340; $p = 0,008$) (Figura 13) fueron factores de riesgo independientes para presentar exacerbaciones moderadas de la EPOC, mientras que niveles elevados de GDF-15 (Figura 11), FGF-21 (Figura 12) y Romo1 (Figura 14) no lo fueron.

Tabla 19. Modelo multivariable de riesgo proporcional de Cox que muestra predictores de exacerbaciones moderadas de la EPOC.

Variable	B	p	HR	95% IC HR	
				Bajo	Alto
Niveles altos de HN	0,602	0,007	1,826	1,181	2,822
Niveles altos de GDF-15	0,335	0,171	1,386	0,869	2,209
Niveles altos de FGF-21	0,014	0,986	1,014	0,640	1,518
Niveles altos de MOTS-c	0,695	0,008	2,003	1,201	3,340
Niveles altos de Romo1	-0,159	0,539	0,853	0,514	1,415

Niveles altos = niveles por encima de la mediana (HN >246 pg/mL, GDF-15 >1244 pg/mL, FGF-21 >321,9 pg/mL MOTS-c >622 ng/mL y Romo1 >5,42 pg/mL). Ajustado por la edad, el sexo, el índice de Charlson, el grado de disnea mMRC (escala modificada del Medical Research Council), el FEV1 (volumen espiratorio forzado en el primer segundo), el riesgo alto de agudizar y por hábito tabáquico. Las variables resaltadas en negrita mostraron significación estadística.

Figura 10. Niveles de HN (más altos que la mediana) como predictores de agudizaciones.

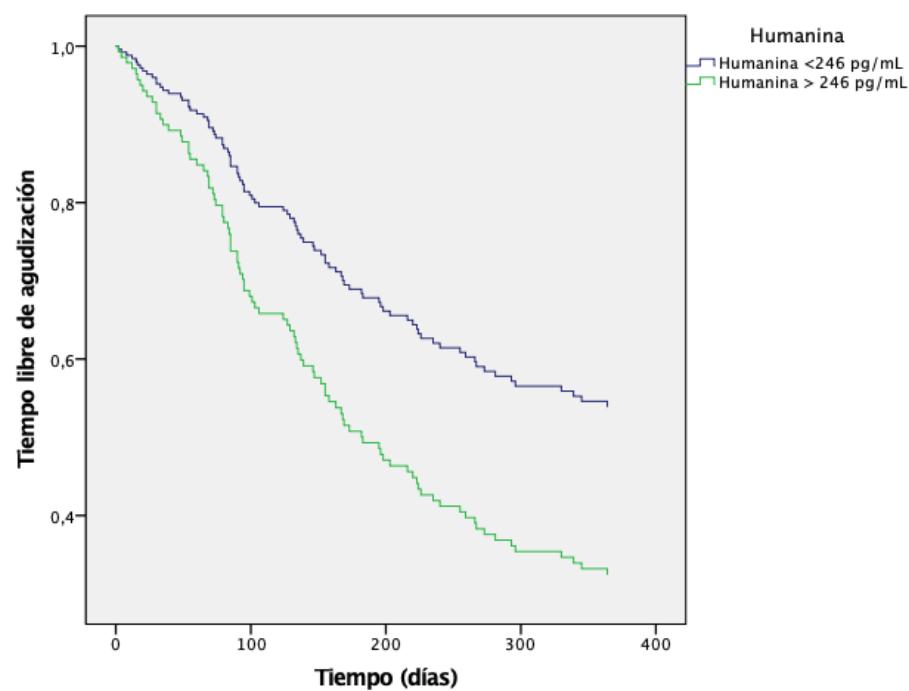


Figura 11. Niveles de GDF-15 (más altos que la mediana) como predictores de agudizaciones.

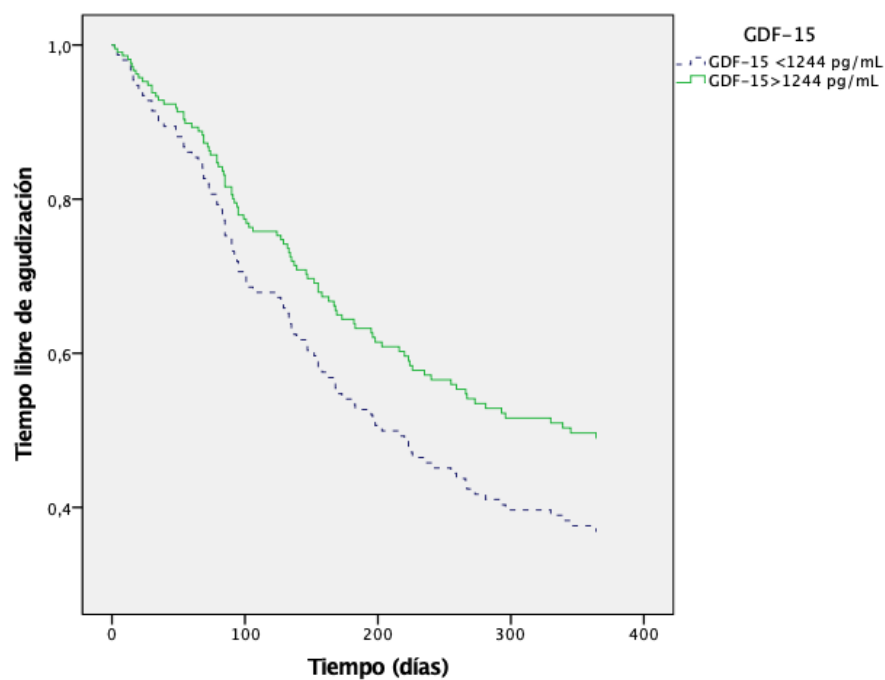


Figura 12. Niveles de FGF-21 (más altos que la mediana) como predictores de agudizaciones.

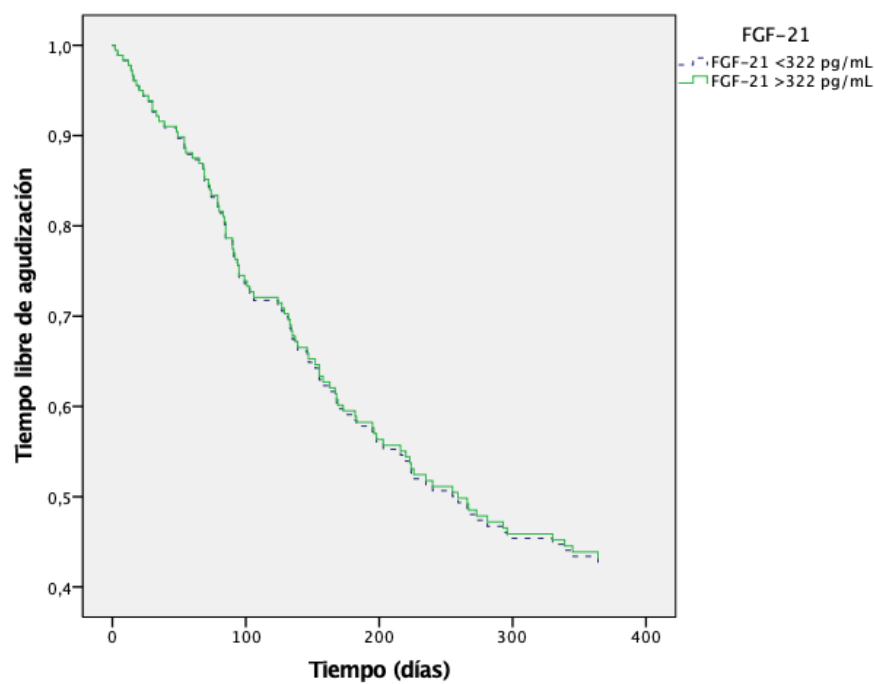


Figura 13. Niveles de MOTS-c (más altos que la mediana) como predictores de agudizaciones.

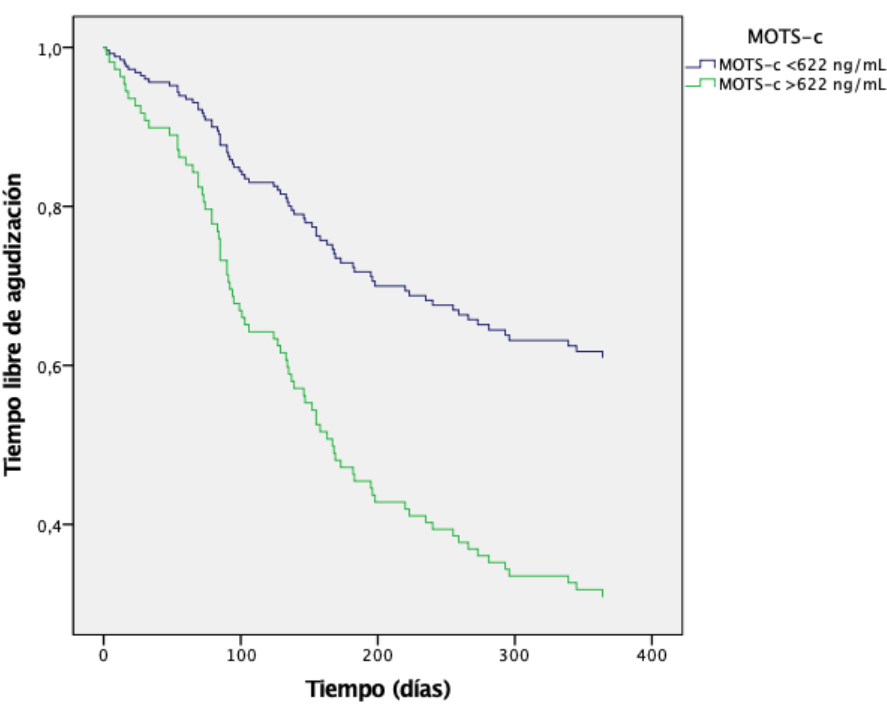
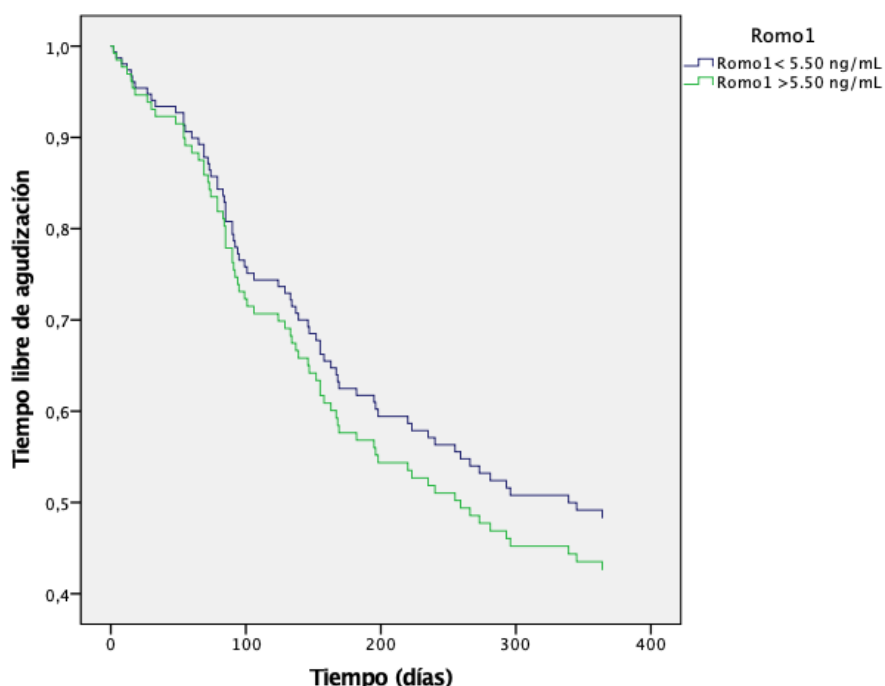


Figura 14. Niveles de Romo1 (más altos que la mediana) como predictores de agudizaciones.



5.5.2. COMO PREDICTORES DE HOSPITALIZACIONES

Durante los 12 meses de seguimiento, en el primer grupo 29 de los 165 pacientes presentaron al menos una agudización severa de la EPOC (23 en el grupo HN alta, 20 en el grupo GDF-15 alto y 23 en el grupo FGF-21 alta), mientras que en el segundo grupo fueron 21 de los 142 pacientes (17 en el grupo de MOTS-c alto y 14 en el grupo de Romo1 alto).

El modelo de riesgo proporcional univariable de Cox se ajustó por la edad, el sexo, el índice de Charlson, el grado de disnea mMRC, el FEV1, el riesgo elevado de agudizar y por hábito tabáquico (Tabla 20). El análisis de riesgo proporcional de Cox multivariado indicó que la HN alta (HR 3,445; IC 95% 1,357-8,740; $p = 0,009$) (Figura 15), FGF-21 alta (HR 4,217; IC 95% 1,459-12,193; $p = 0,008$) (Figura 17), MOTS-c alto (HR 9,070; IC95% 2,736-30,060; $p < 0,001$) (Figura 18) y niveles elevados de Romo1 (HR 3,965; IC 95% 1,210-12,992; $p = 0,023$) (Figura 19) fueron factores de riesgo independientes para ingreso hospitalario, no así el GDF-15 (Figura 16).

Tabla 20. Modelo multivariable de riesgo proporcional de Cox que muestra predictores de hospitalizaciones por la EPOC.

Variable	B	p	HR	95% IC HR	
				Bajo	Alto
Niveles altos de HN	1,237	0,009	3,445	1,357	8,740
Niveles altos de GDF-15	-0,202	0,663	0,817	0,329	2,029
Niveles altos de FGF-21	1,439	0,008	4,217	1,459	12,193
Niveles altos de MOTS-c	2,205	<0,001	9,070	2,7360	30,060
Niveles altos de Romo1	1,377	0,023	3,965	1,210	12,992

Niveles altos = niveles por encima de la mediana (HN >246 pg/mL, GDF-15 >1244 pg/mL, FGF-21 >321,9 pg/mL MOTS-c > 622ng/mL y Romo1 > 5,42 pg/mL). Ajustado por la edad, el sexo, el índice de Charlson, el grado de disnea disnea mMRC (escala modificada del Medical Research Council), el FEV1 (volumen espiratorio forzado en el primer segundo), el riesgo alto de agudizar y por hábito tabáquico. Las variables resaltadas en negrita mostraron significación estadística.

Figura 15. Niveles de Humanina (más altos que la mediana) como predictores de hospitalizaciones.

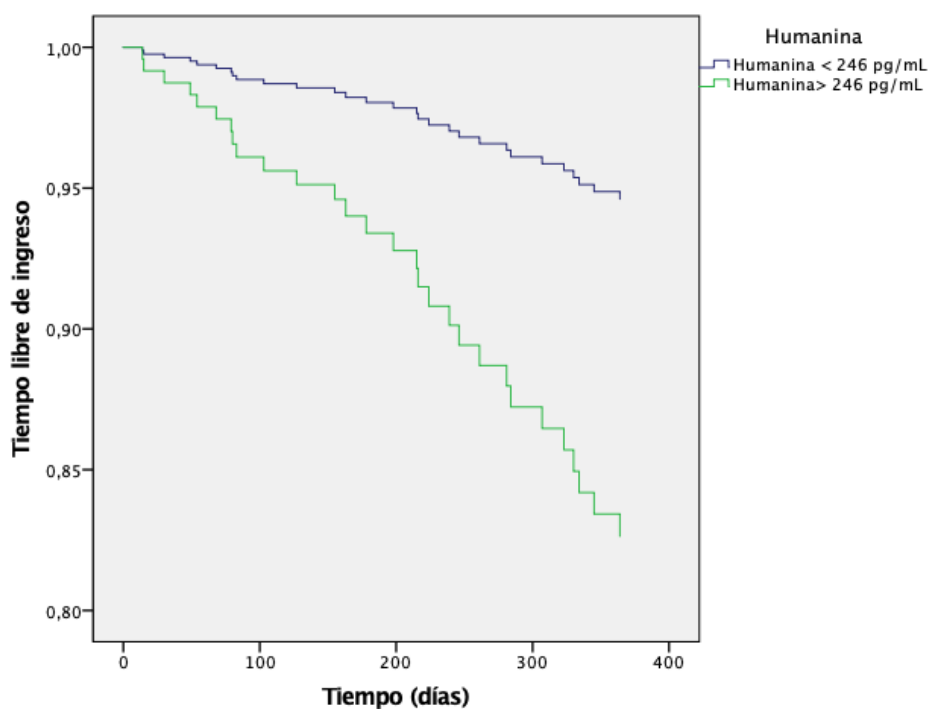


Figura 16. Niveles de GDF-15 (más altos que la mediana) como predictores de hospitalizaciones.

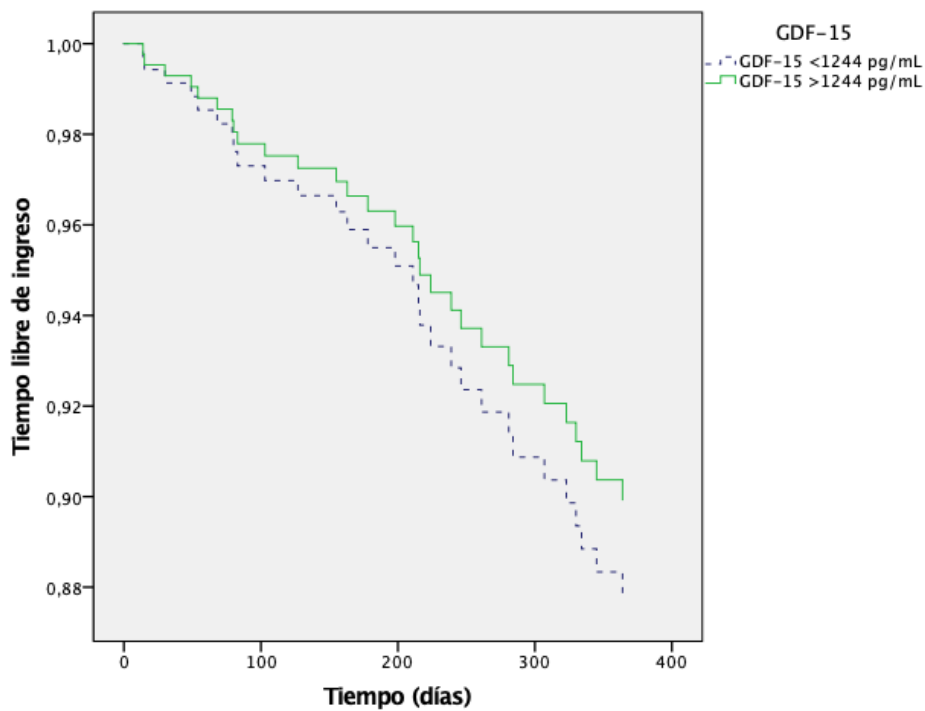


Figura 17. Niveles de FGF-21 (más altos que la mediana) como predictores de hospitalizaciones.

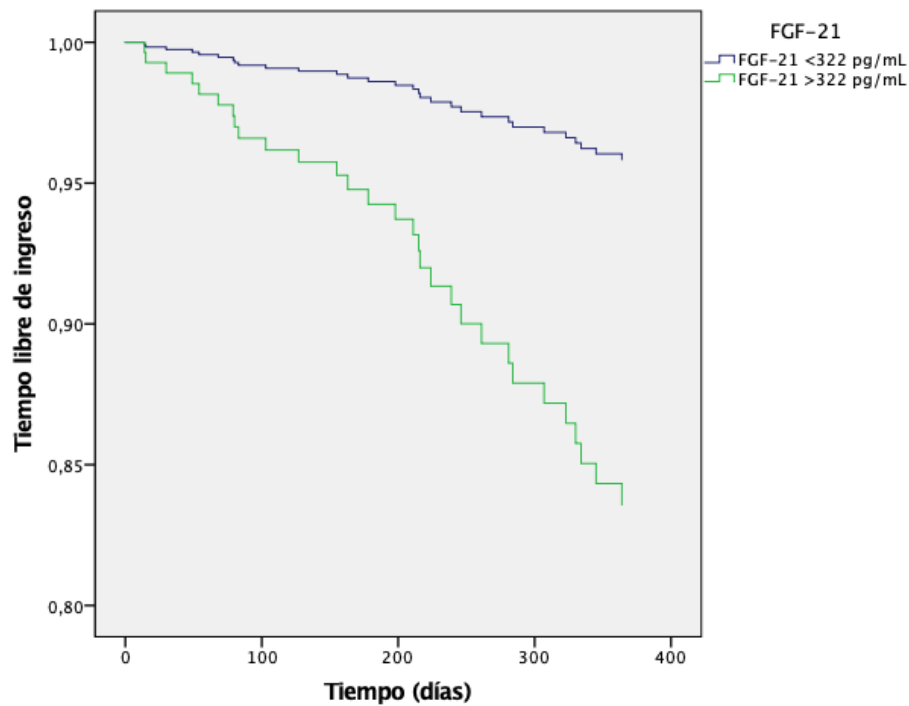


Figura 18. Niveles de MOTS-c (más altos que la mediana) como predictores de hospitalizaciones.

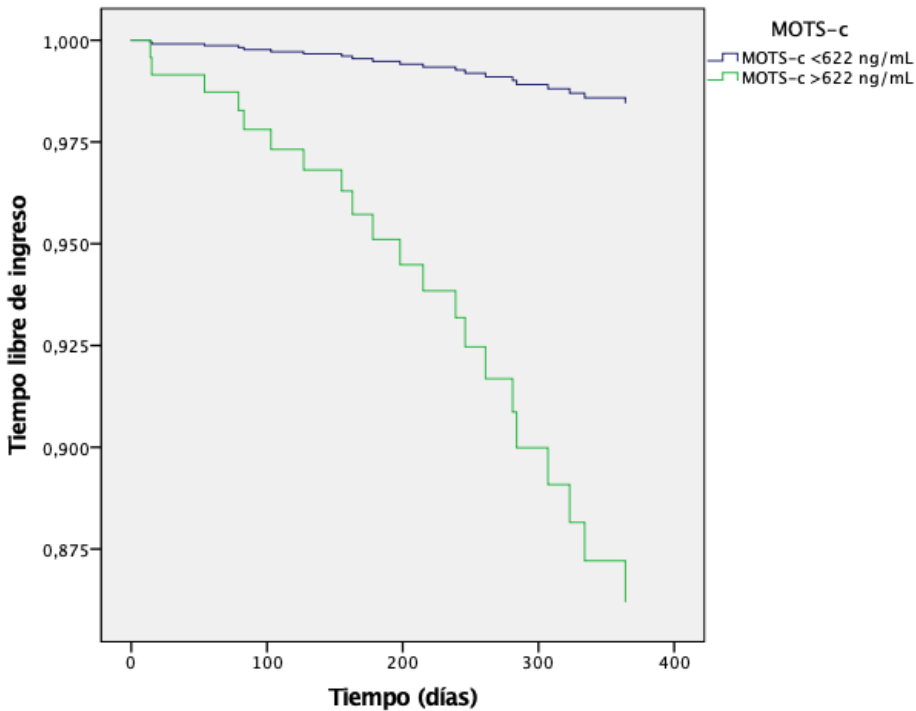
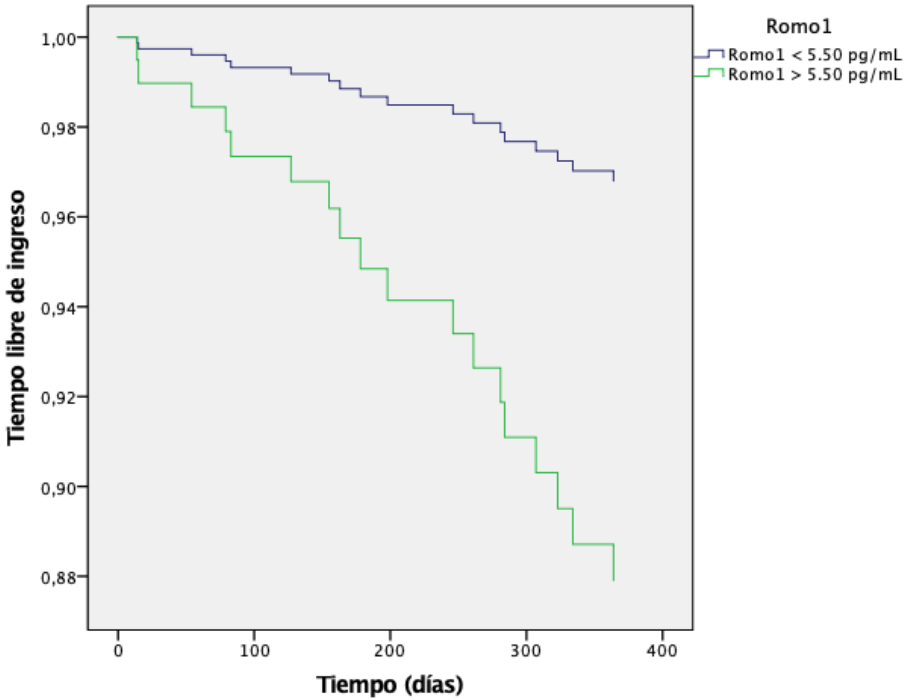


Figura 19. Niveles de Romo1 (más altos que la mediana) como predictores de hospitalizaciones.



DISCUSIÓN

6. DISCUSIÓN

Este trabajo es el primero que evalúa de manera conjunta cómo se comportan las distintas proteínas relacionadas con la mitocondria en el contexto de la EPOC. Según nuestros resultados, existen datos novedosos en el campo de las mitokinas y la EPOC.

Nuestros estudios muestran que los pacientes con EPOC presentan alteraciones en distintas moléculas mitocondriales, y estas moléculas se relacionan con características clínicas concretas de la EPOC. Estos datos son novedosos y abren una interesante línea de investigación.

6.1. NIVELES DE MOLÉCULAS RELACIONADAS CON LA MITOCONDRIA EN LOS PACIENTES CON EPOC

Los pacientes con EPOC en la fase estable de la enfermedad presentaron niveles séricos más altos de HN, GDF-15 y Romo1 que el grupo control de fumadores sin EPOC. Además, los pacientes con EPOC presentaron niveles séricos de MOTS-c más bajos que los controles. Sin embargo, no encontramos diferencias en los niveles de FGF-21 entre los dos grupos analizados.

6.1.1. HUMANINA

La Humanina, al igual que otras mitokinas, no había sido estudiada previamente en el contexto de la EPOC. Es una mitokina que está bajo el control directo del ADN mitocondrial y es indicativa de estrés mitocondrial cuando está elevada (Quirós PM *et al* 2016).

Estos efectos antiapoptóticos se descubrieron por primera vez en pacientes con Alzheimer, donde se observó que la HN protegía a las neuronas de la muerte celular (Hashimoto Y *et al* 2001) y poco después se descubrió que la HN se unía al IGFBP3 e

intensificaba los efectos protectores contra la toxicidad del β -amiloide- β (Ikonen M *et al* 2003).

Han sido múltiples los estudios que han sugerido que la HN aumenta la sensibilidad a la insulina, mejora la supervivencia de las células beta pancreáticas y retrasa la aparición de la diabetes. Concretamente, en un estudio de Mahboobi H *et al*, se sugirió que podía haber una asociación entre la enfermedad de Alzheimer y la diabetes tipo 2, ya que en pacientes con ambas patologías el deterioro y la progresión de los síntomas neurológicos eran mucho mayores que en aquellos que no tenían diabetes y que la HN podía ser el punto en común de ambos procesos patológicos (Mahboobi H *et al* 2014).

La HN ha sido también ampliamente relacionada con el riesgo cardiovascular, la aterosclerosis, la insuficiencia cardíaca y el infarto de miocardio entre otros (Cai H *et al* 2021) (Charununtakorn ST *et al* 2016). En el estudio de Bachar *et al*, demostraron que la HN se expresaba en la capa endotelial de las paredes vasculares de las arterias y las venas, a través de modelos de cultivo celular en células humanas endoteliales aórticas donde aquellas células que estaban pretratadas con HN, atenuaban la formación de ROS y reducían la apoptosis celular un 50%. Concretamente, concluyeron que la HN tenía un efecto citoprotector contra el estrés oxidativo inducido por las LDL oxidadas (Bachar AR *et al* 2010).

En nuestro estudio, se observaron niveles más elevados de HN en el grupo de pacientes con EPOC estable en comparación con el grupo control, por lo que apoyaría la hipótesis de que el aumento de los niveles de HN en estos pacientes, parece ser una reacción compensatoria para proteger a las mitocondrias y, por lo tanto, a las células, contra el estrés oxidativo generalizado que sufren los pacientes con EPOC (Bachar AR *et al* 2010) (Cai H *et al* 2021) (Charununtakorn ST *et al* 2016) (Gong Z *et al* 2018) (Lee C *et al* 2013) (Sreekumar PG *et al* 2016) (Yen K *et al* 2013).

Además, hay que tener en cuenta que la inflamación de bajo grado en estos pacientes con EPOC asociada a la disfunción mitocondrial podría ser otra de las explicaciones al aumento de los niveles basales de la Humanina.

6.1.2. GDF-15

El GDF-15 es la única mitokina que ha sido ampliamente estudiada tanto en la EPOC como en otras múltiples patologías (Freeman CM *et al* 2015) (Mutlu L *et al* 2015) (Mueller T *et al* 2015) (Patel MS *et al* 2016).

Es una mitokina que solamente está de manera parcial bajo el control de las mitocondrias a través de la señalización mitocondrial nuclear (ATF3/4, etc.), y no está bajo el control directo del ADN mitocondrial (Quirós PM *et al* 2016).

La relación entre el GDF-15 y la diabetes o el riesgo cardiovascular ha sido ampliamente estudiada, incluso la asociación entre ellos. En un estudio en el que participaron 107 participantes, divididos en dos grupos dependiendo de si tenían o no diabetes, se observó que los niveles elevados de GDF-15 se asociaba de forma independiente a mayor riesgo cardiovascular en aquellos pacientes recientemente diagnosticados de diabetes mellitus. Es por ello, por lo que propusieron esta mitokina como el biomarcador más útil para predecir el riesgo cardiovascular en estos pacientes (Shin MY *et al* 2016).

También ha sido campo de múltiples investigaciones la asociación de esta mitokina con el cáncer y la caquexia, ya que se ha demostrado que el GDF-15 se secreta por las células en la mayoría de los procesos cancerosos. Existen, sin embargo, teorías contradictorias sobre si juega un papel protector en determinados tumores como el cáncer colorectal o el cáncer de próstata, mientras que en otros se ha sugerido que niveles elevados de GDF-15 predicen un peor resultado y una mayor tasa de metástasis (Tsai VW *et al* 2018).

Lo que sí parece claro es que, en tumores avanzados el GDF-15 resulta dañino ya que causa además una pérdida de peso y por último un estado de caquexia asociando un peor pronóstico, independientemente del tumor (Lerner L *et al* 2015), aunque se necesitan nuevos estudios en estos campos para conocer con exactitud el mecanismo de acción del GDF-15.

Respecto a la asociación del GDF-15 con la EPOC, existe una amplia bibliografía en la que se demuestra que se asocia con el mal pronóstico, incluso proponiendo su uso

como posible biomarcador predictor de mortalidad (Verhamme FM *et al* 2019) (Mullican SE *et al* 2018), lo que parece consistente con nuestro estudio ya que en los pacientes con EPOC estable encontramos niveles aumentados de GDF-15 respecto al grupo control, independientemente de la edad o el sexo.

Se han propuesto varias explicaciones sobre los factores asociados con estos niveles elevados en pacientes con EPOC. Por un lado, varios estudios han demostrado que el humo del cigarrillo induce GDF-15 en células epiteliales traqueobronquiales humanas (Wu X *et al* 2021) (Verhamme FM *et al* 2017). Por otro lado, se ha sugerido que GDF-15 se puede asociar a la inflamación de bajo grado al igual que ocurre con la Humanina, ya que se ha demostrado que los niveles de GDF-15 se correlacionan con los niveles de PCR, un biomarcador inflamatorio sistémico bien conocido (Mutlu *et al* 2015).

En un estudio de 649 pacientes, se objetivó que, en pacientes con EPOC sin clínica por enfermedades cardiovasculares, la aterosclerosis subclínica era frecuente y que el GDF-15 contribuía de manera independiente al resto de factores de riesgo cardiovascular, así como a la severidad producida por la propia EPOC (Martínez CH *et al* 2017), por lo que estas comorbilidades asociadas podrían ser otra causa añadida de encontrar niveles elevados de GDF-15 en estos pacientes.

Por último, se han encontrado también que los niveles de GDF-15 son más bajos en pacientes estables que en pacientes con exacerbación en al menos dos estudios (Freeman CM *et al* 2015) (Mutlu *et al* 2015) por lo que sería interesante estudiar tanto GDF-15 como el resto de las mitokinas y Romo1 en un subgrupo de pacientes exacerbados.

6.1.3. FGF-21

El FGF-21 se ha considerado una mitokina de estrés nutricional ya que se ha asociado al envejecimiento y a cambios en la composición corporal con aumento del tejido adiposo o la pérdida de masa corporal, así como con el metabolismo energético (Hanks LJ *et al* 2015) (Oost LJ *et al* 2019) y ha sido propuesta como biomarcador sérico

de trastornos mitocondriales específicos del músculo, aunque su relación todavía no está clara (Suomalainen A *et al* 2011) (Scholle LM *et al* 2018) (Kim CS *et al* 2019).

Se ha estudiado el papel de esta mitokina en otras patologías, como en la enfermedad renal crónica donde se han encontrado niveles elevados de FGF-21 en comparación con sujetos sanos, que parecen aumentar además paralelamente al deterioro de la función renal (Suassuna PGA *et al* 2019).

En pacientes con obesidad, hay estudios que sugieren que el FGF-21 podría tener un efecto beneficioso sobre la lipotoxicidad al favorecer la eliminación de lípidos acumulados que de lo contrario podrían provocar estrés oxidativo y daño inflamatorio (Luo Y *et al* 2017).

Concretamente, en un estudio realizado por Kim CS *et al*, se sugirió que la deficiencia de FGF-21 podía agravar la inflamación inducida por la obesidad, por lo que esta mitokina podría proteger de la atrofia mediada por la inflamación a través de la vía AMPK (Kim CS *et al* 2019).

En contraposición, en un ensayo de Jung HW *et al*, los niveles séricos elevados de FGF-21 se asociaron de manera significativa a mayor probabilidad de sarcopenia, menor masa muscular y peor fuerza de agarre en personas de mayor edad, incluso después de controlar los posibles factores de confusión, respaldando la teoría de que existe un posible papel catabólico de FGF-21 en el músculo (Jung HW *et al* 2021).

El FGF-21 no se había estudiado previamente en la EPOC, y tal y como muestran nuestros resultados, no existen diferencias significativas entre pacientes con EPOC estable y el grupo control, probablemente debido a los muchos factores que regulan los niveles de FGF-21, algunos de los cuales no se conocen por completo (Smati S *et al* 2020) (Hill CM *et al* 2020) (Hethazi D *et al* 2020).

Se necesitan nuevos estudios en pacientes con EPOC, que además de ajustar por diabetes mellitus como hemos realizado, se tengan en cuenta estos otros parámetros que puedan regular FGF-21, como son los lípidos (tanto sistémicos como locales) u otras patologías que afecten al hígado que es otro de los tejidos secretores de FGF-21 (Luo Y *et al* 2017).

6.1.4. MOTS-c

La MOTS-c es otra de las mitokinas que están bajo el control directo del ADN mitocondrial, al igual que la HN (Quirós PM *et al* 2016).

Es una mitokina de reciente diagnóstico, de la que todavía se desconoce su implicación exacta en los diferentes procesos fisiológicos y patológicos, aunque parece que puede tener un papel en la regulación de la masa muscular y la atrofia (Lee C *et al* 2015) (Kumagai H *et al* 2021), así como en la resorción ósea y la edad avanzada (Ming W *et al* 2016) (Kumagai H *et al* 2021).

Según nuestro estudio, los niveles circulantes de MOTS-c se encuentran reducidos en pacientes con EPOC estable comparándolos con el grupo control. Se han observado respuestas similares en otras enfermedades crónicas asociadas con el estrés oxidativo, como la DM2 (Ramanjaneya M *et al* 2019), la obesidad con o sin síndrome de apnea obstructiva del sueño (Du C *et al* 2018) (Baylan FA *et al* 2021), la disfunción endotelial y las alteraciones en las arterias coronarias (Qin Q *et al* 2018), la insuficiencia renal (Liu C *et al* 2019) y la esclerosis múltiple (Tekin S *et al* 2022).

Curiosamente, la DM2 concomitante en nuestro estudio no produjo reducciones adicionales en los niveles de MOTS-c circulantes en comparación con los pacientes con EPOC. Estos resultados sugieren que los efectos de estas dos enfermedades en los niveles de MOTS-c no son aditivos.

Una de las causas de los niveles séricos bajos de MOTS-c en nuestro estudio, como sucede con el “síndrome del eutiroideo enfermo T3 bajo”, puede ser una respuesta inespecífica generalizada a muchas enfermedades concomitantes (Salas-Lucia F *et al* 2022).

Otra causa de estas reducciones en los niveles circulantes de MOTS-c pueden deberse al daño mitocondrial tan característico de los pacientes con EPOC. El estrés oxidativo puede inducir un secuestro profundo de MOTS-c en el núcleo, bloqueando así su transferencia a la circulación periférica (Kim KH *et al* 2018). Dado que se han informado niveles bajos de MOTS-c circulante en numerosas enfermedades asociadas con el estrés oxidativo, la segunda explicación puede ser la más probable de las dos.

6.1.5. ROMO1

Romo1 por su parte es una proteína sensible al estrés oxidativo, localizada en la membrana mitocondrial, de la que se ha demostrado su implicación en enfermedades asociadas a la exposición de radicales libres y la inflamación (Swarnabala S *et al* 2015), aunque todavía no existe mucha bibliografía publicada sobre esta molécula.

Se ha estudiado en las células epiteliales del pulmón, donde se encontró que la expresión de Romo1 mediaba la apoptosis inducida por el estrés oxidativo (Shin JA *et al* 2013) y en el suero de pacientes con un modelo diferente de enfermedad respiratoria, donde se informaron que Romo1 y ROS estaban aumentados en pacientes con síndrome de apnea obstructiva del sueño (Ye L *et al* 2018).

Se ha descrito que esta molécula puede ser un biomarcador diagnóstico en procesos cancerosos, debido a que un aumento en la producción de esta molécula se asocia con altos niveles de ROS en las células cancerígenas y de crecimiento de células tumorales, incluido el cáncer de pulmón (Chung JS *et al* 2014) (Lee SH *et al* 2017).

Es por todo ello por lo que parece lógica la relación de los niveles significativamente más altos de Romo1 en el grupo de pacientes con EPOC estable versus los controles fumadores de nuestro estudio, y es consistente con el único artículo publicado hasta el momento en el contexto de la EPOC, en el que se evidenció una correlación negativa entre los niveles de esta proteína y el FEV1 (Ye L *et al* 2019). Sin embargo, nuestros resultados son más consistentes que los evidenciados previamente en el estudio de Ye L *et al*, que incluyó una muestra muy limitada de pacientes con EPOC y no tuvo en cuenta variables metabólicas como la composición corporal de estos sujetos.

Es necesaria la realización de nuevas investigaciones que estudien Romo1 en los pacientes con EPOC, ya que parece que los niveles altos en estos pacientes se deben a algo propio de su patología y no exclusivamente al hábito tabáquico.

6.2. RELACIÓN DE LAS MOLÉCULAS RELACIONADAS CON LA MITOCONDRIA ENTRE SÍ EN EL CONTEXTO DE LA EPOC

Los niveles de estas moléculas relacionadas con la mitocondria, a excepción de MOTS-c y Romo1, no se correlacionaron entre sí en la EPOC, lo que sugiere que su regulación y/o metabolismo son diferentes.

La relación entre MOTS-c y Romo1 no ha sido descrita previamente, aunque se trata de una correlación baja. Además, contrasta con el hecho de que un MOTS-c bajo se asocia con peores resultados relacionados con la capacidad de ejercicio, pero un Romo1 alto se asocia con una saturación de oxígeno baja (como veremos más adelante), lo que sugiere que cada molécula se relaciona con diferentes características de EPOC, y es por ello, por lo que es necesario estudios específicos que tengan en cuenta características concretas de los pacientes con EPOC, como el enfisema, para evaluar la relación entre estas dos moléculas.

6.3. ASOCIACIÓN DE LAS MOLÉCULAS RELACIONADAS CON LA MITOCONDRIA CON CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LA EPOC

A continuación, se discuten las asociaciones de cada una de las mitokinas y de Romo1 con las características clínicas de la EPOC obtenidas mediante regresión logística multivariante.

Es importante destacar en primer lugar, que en nuestro estudio ningún paciente fue tratado de manera crónica o aguda con corticoides sistémicos.

Nuestro estudio no evidenció diferencias en los niveles de mitokinas y Romo1 entre los pacientes tratados con corticoides inhalados y sin corticoides inhalados.

Estos hallazgos, son interesantes ya que permitiría la medición de estas moléculas en los pacientes con EPOC sin importar si llevan este tratamiento y sin necesidad de realizar ajustes o incluso, de tener que suspender dicho tratamiento previo a la extracción analítica para evaluar los niveles séricos de estas mitokinas y Romo1.

6.3.1. HUMANINA

Según nuestros datos, los niveles séricos altos de HN se asociaron de forma independiente con las agudizaciones previas, resultados compatibles a que esto se deba a una reacción compensatoria al estrés oxidativo como hemos comentado anteriormente.

Por otra parte, la Humanina se asoció también a la composición corporal de los pacientes con EPOC, tanto a la obesidad como especialmente a la malnutrición, así como con caminar menos en el TM6M. Ambas características indican que el músculo esquelético, un tejido muy afectado por la EPOC (que representa la mitad del peso corporal y es rico en mitocondrias altamente activas), sería la fuente más importante del exceso de HN circulante encontrada en estos pacientes. Sin embargo, no podemos descartar que las células inmunitarias, de las vías respiratorias, del parénquima pulmonar y de la vasculatura pulmonar puedan también contribuir a los niveles séricos elevados de HN.

6.3.2. GDF-15

En nuestro estudio encontramos una correlación significativa entre los niveles altos de GDF-15 y el número de agudizaciones previas, lo que parece consistente con varias publicaciones en este ámbito (Mutlu LC *et al* 2015) (Husebø GR *et al* 2017).

Según nuestros datos los niveles altos de GDF-15 también se asociaron de forma independiente con caminar menos en el TM6M lo que parece ser concordante con el estudio de Patel MS *et al.* en el que demostraron que, en la EPOC, el GDF-15 circulante estaba inversamente correlacionado con la capacidad de ejercicio, promoviendo el desgaste muscular pero no se asoció con el IMC o con el FFMI (Patel MS *et al* 2016), aunque hay que tener en cuenta que el trabajo se realizó en un grupo pequeño de pacientes (n = 38).

Encontramos en nuestro estudio univariante una asociación positiva con la malnutrición que desapareció al hacer el modelo multivariante, probablemente debido

a que hay factores en la EPOC (inflamación, capacidad de ejercicio, comorbilidades...) que influyen más en el GDF-15 que la propia obesidad o desnutrición, a pesar de que el GDF-15 se ha asociado con esta característica clínica en diversas publicaciones (Adela R *et al* 2015) (Lerner L *et al* 2015).

Nuestros datos también mostraron que las comorbilidades (expresadas con el índice de Charlson) se asociaron con niveles altos de GDF-15. El papel de las comorbilidades en la EPOC es de gran relevancia para estos pacientes, ya que influye no solamente en el pronóstico, sino también en la calidad de vida (GOLD 2022).

Esta asociación entre el índice de Charlson y el GDF-15 parece consistente con el trabajo noruego de Husebø GR *et al*, en el que se estudiaron 413 pacientes con EPOC. Esta asociación es mayor en nuestro estudio, lo que puede ser explicado por la diferencia en las comorbilidades existentes en cada grupo de pacientes con EPOC de ambos estudios.

Por último, en nuestro grupo de pacientes con EPOC, los niveles de GDF-15 se encontraron más elevados en la población femenina, por lo que de utilizar esta mitokina en un futuro como biomarcador y de confirmarse estos hallazgos, sería necesario obtener valores de referencia poblacionales diferentes según el sexo del paciente como ocurre en otras determinaciones analíticas como pueden ser los niveles hormonales.

6.3.3. FGF-21

En nuestro estudio únicamente se observó que los niveles altos de FGF-21 se asociaron de forma independiente con las agudizaciones el año previo, algo novedoso ya que esta mitokina nunca había sido estudiada en la EPOC.

Como hemos visto anteriormente, es posible que sea debido a que esta mitokina está regulada por múltiples factores, por lo que sería necesario nuevos estudios que evalúen el papel de FGF-21 en esta y otras patologías (Smati S *et al* 2020) (Hill CM *et al* 2020) (Hethazi D *et al* 2020).

6.3.4. MOTS-C

Encontramos que los niveles altos de MOTS-c se asociaron positivamente con el número de exacerbaciones el año previo, probablemente por el daño mitocondrial y el estrés oxidativo tan presente en los pacientes con EPOC.

Es llamativo que, como comentábamos en el apartado anterior, los pacientes con EPOC estable tenían niveles más bajos de MOTS-c respecto al grupo control, pero que, dentro del grupo de pacientes con EPOC, los niveles altos de esta mitokina se asociaban de manera positiva con el número de agudizaciones previas. Una posible causa de ello es la gran complejidad y heterogenicidad de los pacientes con EPOC como explicaremos más adelante.

De forma opuesta a su relación con las agudizaciones, MOTS-c se asocia de forma directa con la saturación de oxígeno, es decir, los pacientes con MOTS-c más baja presentan mayor hipoxemia.

Recientemente se ha informado que MOTS-c promueve la diferenciación muscular de las células progenitoras musculares (Garcia-Benlloch S *et al* 2022). Por lo tanto, es razonable suponer que las personas que no pueden inducir la síntesis de MOTS-c y tendrán por tanto niveles más bajos de esta mitokina (como ocurría en nuestro estudio en los pacientes con EPOC), exhibirán una capacidad de ejercicio comparativamente más baja, y por tanto recorrerán menos distancia en el TM6M.

Curiosamente, los niveles de MOTS se asocian de forma distinta con la hipoxemia y la desaturación que, con las agudizaciones. Una posible explicación de esto reside en la gran heterogenicidad de los pacientes con EPOC como hemos comentado anteriormente. Probablemente aquellos pacientes con rasgos relacionados con la hipoxia se asocien con niveles más disminuidos de MOTS-c (enfisema), mientras que aquellos en los que predomina la inflamación sistémica tengan más que ver con los niveles elevados de MOTS-c.

Por tanto, los pacientes tendrán diferentes niveles séricos de MOTS-c en función de los distintos rasgos clínicos de los pacientes con EPOC, por lo que sería interesante,

realizar estudios básicos de investigación donde se comparen estos rasgos de la EPOC con los diferentes biomarcadores estudiados hasta la fecha.

Por último, nuestros datos revelaron una asociación positiva (aunque débil) entre los niveles altos circulantes de MOTS-c y Romo1. Esto puede ser debido a que ambas moléculas están relacionadas con el estrés oxidativo, aunque hacen falta más estudios para corroborar estos hallazgos.

6.3.5. ROMO1

Los resultados de nuestro estudio revelan por primera vez una importante asociación entre los niveles altos circulantes de Romo1 con el hábito tabáquico y con la reducción de la saturación de oxígeno (es decir, factores intrínsecamente asociados con el estrés oxidativo), aunque ninguna relación con la capacidad de ejercicio. Se necesitan más estudios para confirmar estos aspectos ya que únicamente se ha realizado un estudio comparando los niveles de Romo1 con la EPOC (Ye L *et al* 2018).

Como ya hemos comentado antes, observamos una asociación positiva entre los niveles altos de Romo1 y MOTS-c, aunque es necesario realizar más investigaciones para confirmar de manera concluyente esta asociación.

6.4. MOLÉCULAS RELACIONADAS CON LA MITOCONDRIA COMO PREDICTORES DEL TM6M Y DE LA DESATURACIÓN DE OXÍGENO

La capacidad de ejercicio en la EPOC tiene un papel central, ya que ha demostrado en múltiples estudios ser un factor pronóstico independiente de mala evolución de la enfermedad, así como una causa de disminución de la calidad de vida de estos pacientes (Swallow EB *et al* 2007). Está estrechamente relacionada con el TM6M y con la desaturación de oxígeno en el TM6M. En nuestros estudios, hemos encontrado varias asociaciones interesantes no descritas hasta la fecha.

Los niveles altos de HN se correlacionaron con caminar menos de 350 metros en el TM6M, así como con una mayor desaturación de oxígeno, lo que sugiere una relación con la capacidad de ejercicio y con un desajuste de ventilación/perfusión durante el ejercicio.

Los niveles altos de GDF-15 aunque fueron predictores de desaturación de oxígeno durante el TM6M, no lo fueron con caminar menos de 350 metros. Probablemente se deba a lo comentado en numerosas ocasiones sobre la implicación de otros factores en este proceso, y es por lo que se necesitarían nuevos estudios para dilucidar esta relación entre el TM6M y el GDF-15.

En cambio, los niveles bajos de MOTS-c si se asociaron con distancias más cortas recorridas en el TM6M, específicamente con caminar menos de 350 metros y con la desaturación de oxígeno, parámetros que se asocian con el riesgo de mortalidad en la EPOC (Celli BR, Cote cG *et al* 2004).

El ejercicio induce la síntesis de MOTS-c en individuos sanos (Merry TL *et al* 2020) (Hyatt JK 2022), y a su vez activa la síntesis de otras enzimas (como la proteína cinasa activada por AMP) que se sabe por otros estudios que son inducidas por el ejercicio, por lo que parece concordante con nuestros hallazgos (Reynolds JC *et al* 2021) (Dieli-Conwright CM *et al* 2021).

Estos resultados adquieren una importancia especial por varios motivos. En primer lugar, debido a lo complicado que resulta la prueba del TM6M necesitando espacio suficiente para poder realizarla, con al menos una distancia de 29 metros sobre la que delimitar el recorrido. En segundo lugar, requiere de bastante tiempo, tanto la realización de la prueba en si misma, como la preparación y traslado del paciente al área donde se realiza. Por último y más importante, existen circunstancias especiales en las que la realización de esta prueba no es posible ya que hay pacientes con discapacidades físicas que les impide caminar o pacientes que se encuentran encamados.

Por todo ello, y ante la ausencia de otras pruebas o biomarcadores que puedan realizarse en estos supuestos, nuestros estudios abren una corriente de investigación muy interesante en este campo, con la posibilidad de utilizar estos nuevos biomarcadores como factores pronósticos de manera similar al TM6M.

6.5. MOLÉCULAS RELACIONADAS CON LA MITOCONDRIA COMO PREDICTORES DE AGUDIZACIONES E INGRESOS HOSPITALARIOS

Como ya hemos comentado anteriormente, a lo largo de los años se han propuesto diferentes biomarcadores diagnósticos y predictores de las agudizaciones de la EPOC, pero sin ninguna utilidad real para la práctica clínica habitual, por lo que todavía este campo está en estudio.

Existen diferentes características metabólicas e inflamatorias que pueden verse alteradas en los pacientes con EPOC agudizadores como el cociente neutrófilo/linfocito (El-Gazzar AG *et al* 2020), los niveles de vitamina D y PTH (Amado *et al* 2021) o la alteración de la vía Wnt (Amado *et al* 2022). De hecho, los pacientes agudizadores presentan un pronóstico distinto que los pacientes no agudizadores (GOLD 2022).

Según nuestros estudios de regresión de Cox, los niveles altos de HN tienen un alto valor pronóstico para el riesgo de agudizaciones, tanto en exacerbaciones moderadas, como graves, lo que la convierte en un biomarcador predictor de agudizaciones interesante, tanto en exacerbaciones como para proporcionar información sobre la malnutrición, la disfunción del músculo esquelético y la inflamación crónica. De hecho, nuestros datos muestran que los niveles elevados de HN circulante son un factor pronóstico de exacerbación moderada y grave en el próximo año.

El modelo de riesgo proporcional de Cox en nuestros estudios sorpresivamente no asoció el GDF-15 como predictor de agudización moderada o con el riesgo de hospitalizar. Esta discordancia entre nuestros datos y el estudio longitudinal de Husebø, que encontró que niveles elevados de GDF-15 se asociaban con una mayor tasa de exacerbaciones, mortalidad y una disminución más rápida de la función pulmonar durante 3 años, puede ser debida a varios factores.

En primer lugar, nuestro número de pacientes incluidos en el estudio fue algo menor y el período de seguimiento más corto y en segundo lugar excluimos los pacientes con comorbilidades importantes (cardiopatías, insuficiencia renal, etc.). Por lo tanto, nuestros resultados negativos podrían deberse a un menor poder estadístico o a las distintas comorbilidades incluidas en el índice de Charlson de cada estudio.

Aunque en el trabajo de Husebø (Husebø GR *et al* 2017) no especifica qué comorbilidades existían entre el grupo EPOC, sí es cierto que, por ejemplo, en nuestro estudio se excluyeron pacientes con procesos tumorales activos, pero no se tuvieron en cuenta otras patologías incluidas en el índice de Charlson como pueden ser las patologías hepáticas.

Debido a estos resultados, los niveles altos de HN pueden ser factores pronósticos más específicos que los niveles altos de GDF-15. Claramente se necesitan más estudios para dilucidar estos aspectos.

Los niveles de FGF-21 fueron predictivos de hospitalización, pero la fuerza de la asociación fue débil, probablemente debido a los muchos factores que regulan los niveles de esta mitokina. No obstante, la relación entre los niveles de FGF-21 y la EPOC es menos clara que la observada con HN según nuestros datos.

Respecto a la MOTS-c, nuestros datos sugieren que los niveles séricos de esta mitokina son predictores de agudizaciones moderadas en la EPOC, así como de exacerbaciones graves u hospitalizaciones con una alta significación estadística. Parece coherente ya que como hemos expuesto en numerosas ocasiones, la EPOC también es una patología ampliamente relacionada con la edad, la disfunción muscular y el estrés oxidativo.

Por último, niveles elevados de Romo1 también fueron predictores de agudizaciones graves u hospitalizaciones, aunque de manera menos clara que la observada con el resto de mitokinas.

Como conclusión, creemos que hay diferencias entre las distintas mitokinas estudiadas, asociándose con variables clínicas relevantes en la EPOC, algo muy novedoso, por lo que se abre un interesante campo de investigación donde se necesitan más estudios para poder entender en su totalidad el comportamiento y los cambios fisiológicos y fisiopatológicos de cada una de ellas.

LIMITACIONES DEL ESTUDIO

Nuestra cohorte de pacientes incluyó un único centro, por lo que estos hallazgos deberán replicarse en grandes ensayos multicéntricos. Además, utilizamos criterios estrictos para excluir a los pacientes con función renal alterada y otras condiciones conocidas por aumentar los niveles de mitokinas (exacerbación activa, sepsis, inflamación severa, insuficiencia renal, enfermedad arterial coronaria clínica, etc.); por tanto, los resultados tampoco son generalizables a todos los pacientes con EPOC, pero aportan nueva información fisiopatológica. Es por ello, que serían necesarios nuevos estudios que evalúen otras características sociodemográficas y otras posibles enfermedades o comorbilidades, que alteren los niveles de las mitokinas en este grupo de pacientes tan complejos y diversos como son los pacientes con EPOC.

Hay que tener en cuenta, que no se excluyeron pacientes con estados de inflamación de bajo grado, aterosclerosis clínica asintomática u otras enfermedades asintomáticas, ni conocíamos los niveles de mitokinas en estos pacientes previamente a desarrollar EPOC, aunque no creemos que estas condiciones hayan influido fuertemente en nuestros resultados.

Por último, nuestro estudio revela solamente asociaciones, pero no causalidad.

FORTALEZAS

Vale la pena destacar varias de las fortalezas de este trabajo. En primer lugar, este estudio se diseñó específicamente para evaluar el impacto de la EPOC en los niveles circulantes de HN, GDF-15, FGF-21, MOTS-c y Romo1 en un grupo de pacientes cuidadosamente seleccionados y bien caracterizados sin comorbilidades (aparte de la DM2 y las enfermedades coronarias asintomáticas) que podrían influir en los resultados, y un grupo de control de fumadores sin EPOC emparejado por hábito tabáquico (para evitar el tabaquismo como posible factor de confusión), por lo que fueron unos grupos bien caracterizados.

Además, consideramos una gran variedad de factores y características clínicas de la EPOC que podrían tener un impacto en los niveles circulantes de cada una de estas mitokinas, así como un seguimiento estrecho de los pacientes para recoger agudizaciones y hospitalizaciones.

Por último y que nosotros sepamos hasta la fecha del inicio de esta tesis doctoral, nuestros estudios son los primeros que exploran la asociación entre los diferentes parámetros clínicos y las diferentes variables de la EPOC, con las distintas mitokinas (a excepción del GDF-15), por lo que abre un interesante campo para futuras investigaciones, tanto en la EPOC, como en otras muchas patologías asociadas con el estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial.

CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

1. Los niveles basales de Humanina, GDF-15 y Romo1 se encontraron elevados de forma estadísticamente significativa en la población con EPOC respecto al grupo de fumadores sin EPOC.
2. Los niveles de MOTS-c se encontraron disminuidos de forma estadísticamente significativa en el grupo de pacientes con EPOC en comparación con el grupo de fumadores sin EPOC.
3. Los niveles de FGF-21 no se modificaron entre ambas poblaciones.
4. Encontramos una correlación positiva entre los niveles de MOTS-c y Romo1. No se encontraron otras correlaciones entre el resto de las moléculas relacionadas con la mitocondria.
5. El tratamiento con corticoides inhalados no interfiere en la medición de ninguna molécula asociada a la mitocondria, lo que facilita su uso en la práctica clínica habitual.
6. Estas moléculas se asociaron a distintas características clínicas de los pacientes con EPOC, de las que destacan: Humanina con malnutrición y agudizaciones previas; GDF-15 con el sexo femenino, el test de la marcha de 6 minutos y el índice de Charlson; MOTS-c con agudizaciones previas y el test de la marcha de 6 minutos; y Romo1 con el hábito tabáquico activo.
7. Tanto la Humanina como MOTS-c fueron factores pronósticos de caminar menos de 350 metros en el test de la marcha de 6 minutos.
8. Humanina, GDF-15 y MOTS-c fueron factores pronósticos de desaturación de oxígeno en el test de la marcha de 6 minutos.
9. Humanina y MOTS-c fueron predictores de exacerbaciones moderadas de la EPOC, y junto con FGF-21 y Romo1 fueron además predictoras de hospitalizaciones.

BIBLIOGRAFÍA

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Aaron CP, Schwartz JE, Bielinski SJ, Hoffman EA, Austin JH, Oelsner EC, Donohue KM, Kalhan R, Berardi C, Kaufman JD, Jacobs DR Jr, Tracy RP, Barr RG. Intercellular adhesion molecule 1 and progression of percent emphysema: the MESA Lung Study. *Respir Med.* 2015;109:255-64.
2. Adela R, Banerjee SK. GDF-15 as a Target and Biomarker for Diabetes and Cardiovascular Diseases: A Translational Prospective. *J Diabetes Res.* 2015;2015:490842.
3. Amado CA, García-Unzueta M, Agüero J, Martín-Audera P, Fueyo P, Lavín BA, Guerra AR, Muñoz P, Tello S, Berja A, Casanova C. Associations of serum sclerostin levels with body composition, pulmonary function, and exacerbations in COPD patients. *Pulmonology.* 2022:S2531-0437(22)00131-3.
4. Amado CA, Muñoz P, García-Unzueta M, Agüero J, Tello S, Fueyo P, Vega C, Lavín BA, Guerra RA, Casanova C. High parathyroid hormone predicts exacerbations in COPD patients with hypovitaminosis D. *Respir Med.* 2021;182:106416.
5. Anthonisen NR, Manfreda J, Warren CP, Hershfield ES, Harding GK, Nelson NA. Antibiotic therapy in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Ann Intern Med.* 1987;106:196-204.
6. ATS Committee on Proficiency Standards for Clinical Pulmonary Function Laboratories. ATS statement: guidelines for the six-minute walk test. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002;166:111-7.
7. Bachar AR, Scheffer L, Schroeder AS, Nakamura HK, Cobb LJ, Oh YK, Lerman LO, Pagano RE, Cohen P, Lerman A. Humanin is expressed in human vascular walls and has a cytoprotective effect against oxidized LDL-induced oxidative stress. *Cardiovasc Res.* 2010;88:360-6.
8. Barnes PJ. Inflammatory mechanisms in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J Allergy Clin Immunol.* 2016;138:16-27.

9. Barnes PJ. Senescence in COPD and Its Comorbidities. *Annu Rev Physiol.* 2017;79:517-539.
10. Barnes PJ, Chowdhury B, Kharitonov SA, Magnussen H, Page CP, Postma D, Saetta M. Pulmonary biomarkers in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006;174:6-14.
11. Barreiro E. The role of MicroRNAs in COPD muscle dysfunction and mass loss: implications on the clinic. *Expert Rev Respir Med.* 2016;10:1011-22.
12. Barreiro E, Gea J. Molecular and biological pathways of skeletal muscle dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease. *Chron Respir Dis.* 2016;13:297-311.
13. Baylan FA, Yasar E. Relationship between the mitochondria-derived peptide MOTS-c and insulin resistance in obstructive sleep apnea. *Sleep Breath.* 2021;25:861-866.
14. Bestall JC, Paul EA, Garrod R, Garnham R, Jones PW, Wedzicha JA. Usefulness of the Medical Research Council (MRC) dyspnoea scale as a measure of disability in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax.* 1999;54:581-6.
15. Bewley MA, Preston JA, Mohasin M, Marriott HM, Budd RC, Swales J, Collini P, Greaves DR, Craig RW, Brightling CE, Donnelly LE, Barnes PJ, Singh D, Shapiro SD, Whyte MKB, Dockrell DH. Impaired Mitochondrial Microbicidal Responses in Chronic Obstructive Pulmonary Disease Macrophages. *Am J Respir Crit Care Med.* 2017;196:845-855.
16. Birch J, Barnes PJ, Passos JF. Mitochondria, telomeres and cell senescence: Implications for lung ageing and disease. *Pharmacol Ther.* 2018;183:34-49.
17. Blanco I, Diego I, Bueno P, Pérez-Holanda S, Casas-Maldonado F, Miravittles M. Prevalence of α 1-antitrypsin PiZZ genotypes in patients with COPD in Europe: a systematic review. *Eur Respir Rev.* 2020;29:200014.
18. Boyer L, Bastuji-Garin S, Chouaid C, Housset B, Le Corvoisier P, Derumeaux G, Boczkowski J, Maitre B, Adnot S, Audureau E. Are Systemic Manifestations

Ascribable to COPD in Smokers? A Structural Equation Modeling Approach. *Sci Rep*. 2018;8:8569.

19. Cabrera López C, Casanova Macario C, Marín Trigo JM, de-Torres JP, Torres RS, González JM, Polverino F, Divo M, Pinto Plata V, Zulueta J, Callejas FJ, Celli B. Prognostic Validation Using GesEPOC 2017 Severity Criteria. *Arch Bronconeumol*. 2019;55:409-413.
20. Cai H, Liu Y, Men H, Zheng Y. Protective Mechanism of Humanin Against Oxidative Stress in Aging-Related Cardiovascular Diseases. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2021;12:683151.
21. Campisi J. Cellular Senescence and Lung Function during Aging. Yin and Yang. *Ann Am Thorac Soc*. 2016;13:S402-S406.
22. Casanova Macario C, García-Talavera Martín I, Torres Tajés JP. La disnea en la EPOC. *Arch Bronconeumol*. 2005;41:24-32.
23. Casanova C, Cote C, Marin JM, Pinto-Plata V, de Torres JP, Aguirre-Jaíme A, Vassaux C, Celli BR. Distance and oxygen desaturation during the 6-min walk test as predictors of long-term mortality in patients with COPD. *Chest*. 2008;134:746-752.
24. Cederholm T, Bosaeus I, Barazzoni R, Bauer J, Van Gossum A, Klek S, Muscaritoli M, Nyulasi I, Ockenga J, Schneider SM, de van der Schueren MA, Singer P. Diagnostic criteria for malnutrition An ESPEN Consensus Statement. *Clin Nutr*. 2015;34:335-40.
25. 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;350:1005-12.
26. Celli BR, Barnes PJ. Exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J*. 2007;29:1224-38.

27. Celli BR, MacNee W; ATS/ERS Task Force. Standards for the diagnosis and treatment of patients with COPD: a summary of the ATS/ERS position paper. *Eur Respir J*. 2004;23:932-46.
28. Celli BR, Fabbri LM, Aaron SD, Agusti A, Brook R, Criner GJ, Franssen FME, Humbert M, Hurst JR, O'Donnell D, Pantoni L, Papi A, Rodriguez-Roisin R, Sethi S, Torres A, Vogelmeier CF, Wedzicha JA. An Updated Definition and Severity Classification of Chronic Obstructive Pulmonary Disease Exacerbations: The Rome Proposal. *Am J Respir Crit Care Med*. 2021;204:1251-1258.
29. Cha YS, Chang JS, Kim H, Park KS. Application of Mitochondrial and Oxidative Stress Biomarkers in the Evaluation of Neurocognitive Prognosis Following Acute Carbon Monoxide Poisoning. *Metabolites*. 2022;12:201.
30. Charlson ME, Pompei P, Ales KL, MacKenzie CR. A new method of classifying prognostic comorbidity in longitudinal studies: development and validation. *J Chronic Dis*. 1987;40:373-83.
31. Charununtakorn ST, Shinlapawittayatorn K, Chattipakorn SC, Chattipakorn N. Potential Roles of Humanin on Apoptosis in the Heart. *Cardiovasc Ther*. 2016;34:107-14.
32. Chen YW, Leung JM, Sin DD. A Systematic Review of Diagnostic Biomarkers of COPD Exacerbation. *PLoS One*. 2016;11:e0158843.
33. Choudhury G, MacNee W. Role of Inflammation and Oxidative Stress in the Pathology of Ageing in COPD: Potential Therapeutic Interventions. *COPD*. 2017;14:122-135.
34. Chung HK, Ryu D, Kim KS, Chang JY, Kim YK, Yi HS, Kang SG, Choi MJ, Lee SE, Jung SB, Ryu MJ, Kim SJ, Kweon GR, Kim H, Hwang JH, Lee CH, Lee SJ, Wall CE, Downes M, Evans RM, Auwerx J, Shong M. Growth differentiation factor 15 is a myomitokine governing systemic energy homeostasis. *J Cell Biol*. 2017;216:149-165.

35. Chung JS, Lee S, Yoo YD. Constitutive NF- κ B activation and tumor-growth promotion by Romo1-mediated reactive oxygen species production. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014;450:1656-61.
36. Churg A, Zhou S, Wright JL. Series "matrix metalloproteinases in lung health and disease": Matrix metalloproteinases in COPD. *Eur Respir J*. 2012;39:197-209.
37. Citgez E, Zuur-Telgen M, van der Palen J, van der Valk P, Stolz D, Brusse-Keizer M. Stable-State Midrange Proadrenomedullin Is Associated With Severe Exacerbations in COPD. *Chest*. 2018;154:51-57.
38. Çolak Y, Nordestgaard BG, Vestbo J, Lange P, Afzal S. Prognostic significance of chronic respiratory symptoms in individuals with normal spirometry. *Eur Respir J*. 2019;54:1900734.
39. Conte M, Ostan R, Fabbri C, Santoro A, Guidarelli G, Vitale G, Mari D, Sevini F, Capri M, Sandri M, Monti D, Franceschi C, Salvioli S. Human Aging and Longevity Are Characterized by High Levels of Mitokines. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2019;74:600-607.
40. Conte M, Martucci M, Chiariello A, Franceschi C, Salvioli S. Mitochondria, immunosenescence and inflammaging: a role for mitokines? *Semin Immunopathol*. 2020;42:607-617.
41. Cosío BG, Hernández C, Chiner E, Gimeno-Santos E, Pleguezuelos E, Seijas N, Rigau D, López-Campos JL, Soler-Cataluña JJ, Calle M, Miravittles M, Casanova C; en nombre del equipo de trabajo de GesEPOC 2021. Spanish COPD Guidelines (GesEPOC 2021): Non-pharmacological Treatment Update. *Arch Bronconeumol*. 2022;58:345-351.
42. Coxson HO, Dirksen A, Edwards LD, Yates JC, Agusti A, Bakke P, Calverley PM, Celli B, Crim C, Duvoix A, Fauerbach PN, Lomas DA, Macnee W, Mayer RJ, Miller BE, Müller NL, Rennard SI, Silverman EK, Tal-Singer R, Wouters EF, Vestbo J; Evaluation of COPD Longitudinally to Identify Predictive Surrogate Endpoints (ECLIPSE) Investigators. The presence and progression of emphysema in COPD as

- determined by CT scanning and biomarker expression: a prospective analysis from the ECLIPSE study. *Lancet Respir Med*. 2013;1:129-36.
43. Definition and classification of chronic bronchitis for clinical and epidemiological purposes. A report to the Medical Research Council by their Committee on the Aetiology of Chronic Bronchitis. *Lancet*. 1965;1:775-9.
44. Devosse T, Guillabert A, D'Haene N, Berton A, De Nadai P, Noel S, Brait M, Franssen JD, Sozzani S, Salmon I, Parmentier M. Formyl peptide receptor-like 2 is expressed and functional in plasmacytoid dendritic cells, tissue-specific macrophage subpopulations, and eosinophils. *J Immunol*. 2009;182:4974-84.
45. Diab N, Gershon AS, Sin DD, Tan WC, Bourbeau J, Boulet LP, Aaron SD. Underdiagnosis and Overdiagnosis of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2018;198:1130-1139.
46. Dieli-Conwright CM, Sami N, Norris MK, Wan J, Kumagai H, Kim SJ, *et al*. Effect of aerobic and resistance exercise on the mitochondrial peptide MOTS-c in hispanic and non-hispanic white breast cancer survivors. *Sci Rep*. 2021;11:16916.
47. Domej W, Oettl K, Renner W. Oxidative stress and free radicals in COPD--implications and relevance for treatment. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2014;9:1207-24.
48. Donaldson GC, Law M, Kowlessar B, *et al*. Impact of Prolonged Exacerbation Recovery in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2015;192:943-50.
49. Donaldson GC, Seemungal TA, Bhowmik A, Wedzicha JA. Relationship between exacerbation frequency and lung function decline in chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax*. 2002;57:847-52.
50. Doumas BT, Biggs HG. Determination of serum albumin. In: Cooper CA, ed. *Standard Methods of Clinical Chemistry*. New York, NY: Academic Press, Inc. 1972;7:175-188.

51. Du C, Zhang C, Wu W, Liang Y, Wang A, Wu S, *et al.* Circulating MOTS-c levels are decreased in obese male children and adolescents and associated with insulin resistance. *Pediatr Diabetes*. 2018;19:1058-64.
52. Durieux J, Wolff S, Dillin A. The cell-non-autonomous nature of electron transport chain-mediated longevity. *Cell*. 2011;144:79-91.
53. El-Gazzar AG, Kamel MH, Elbahnasy OKM, El-Naggar ME. Prognostic value of platelet and neutrophil to lymphocyte ratio in COPD patients. *Expert Rev Respir Med*. 2020;14:111-116.
54. Falk JA, Kadiev S, Criner GJ, Scharf SM, Minai OA, Diaz P. Cardiac disease in chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc*. 2008;5:543-8.
55. Fisher FM, Maratos-Flier E. Understanding the Physiology of FGF21. *Annu Rev Physiol*. 2016;78:223-41.
56. Fletcher CM, Elmes PC, Fairbairn AS, Wood CH. The significance of respiratory symptoms and the diagnosis of chronic bronchitis in a working population. *Br Med J*. 1959;2:257-66.
57. Fletcher C, Peto R. The natural history of chronic airflow obstruction. *Br Med J*. 1977;1:1645-8.
58. Fossati P, Prencipe L, Berti G. Enzymic creatinine assay: a new colorimetric method based on hydrogen peroxide measurement. *Clin Chem*. 1983;29:1494-6.
59. Fossati P, Prencipe L, Berti G. Use of 3,5-dichloro-2-hydroxybenzenesulfonic acid/4 aminophenazone chromogenic system in direct enzymic assay of uric acid in serum and urine. *Clin Chem*. 1980;26:227-231.
60. Freeman CM, Martinez CH, Todt JC, Martinez FJ, Han MK, Thompson DL, McCloskey L, Curtis JL. Acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease are associated with decreased CD4+ & CD8+ T cells and increased growth & differentiation factor-15 (GDF-15) in peripheral blood. *Respir Res*. 2015;16:94.

61. Fuku N, Pareja-Galeano H, Zempo H, Alis R, Arai Y, Lucia A, Hirose N. The mitochondrial-derived peptide MOTS-c: a player in exceptional longevity? *Aging Cell*. 2015;14:921-3.
62. Garcia-Benlloch S, Revert-Ros F, Blesa JR, Alis R. MOTS-c promotes muscle differentiation in vitro. *Peptides*. 2022;155:170840.
63. García-Río F, Calle M, Burgos F, Casan P, del Campo F, Galdiz JB, Giner J, González-Mangado N, Ortega F, Puente Maestu L. Espirometría. *Arch Bronconeumol*. 2013;49:388-401.
64. Gharib SA, Manicone AM, Parks WC. Matrix metalloproteinases in emphysema. *Matrix Biol*. 2018;73:34-51.
65. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease (2022 Report). Global initiative for chronic obstructive lung disease; 2022. Available from: <https://goldcopd.org/https://goldcopd.org/2022-gold-reports-2>.
66. Gong C, Yang Y, Chen M, Xie Z. Effect of procalcitonin on the prognosis of patients with COPD. *Biomed Rep*. 2020;12:313-318.
67. Gong Z, Tas E, Muzumdar R. Humanin and age-related diseases: a new link? *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2014;5:210.
68. Gong Z, Tasset I. Humanin enhances the cellular response to stress by activation of chaperone-mediated autophagy. *Oncotarget*. 2018;9:10832-3.
69. Gosker HR, Zeegers MP, Wouters EF, Schols AM. Muscle fibre type shifting in the vastus lateralis of patients with COPD is associated with disease severity: a systematic review and meta-analysis. *Thorax*. 2007;62:944-9.
70. Guerra S, Sherrill DL, Venker C, Ceccato CM, Halonen M, Martinez FD. Chronic bronchitis before age 50 years predicts incident airflow limitation and mortality risk. *Thorax*. 2009;64:894-900.
71. Habiballa L, Salmonowicz H, Passos JF. Mitochondria and cellular senescence: Implications for musculoskeletal ageing. *Free Radic Biol Med*. 2019;132:3-10.

72. Hallmann R, Horn N, Selg M, Wendler O, Pausch F, Sorokin LM. Expression and function of laminins in the embryonic and mature vasculature. *Physiol Rev.* 2005;85:979-1000.
73. Halpin DMG, Birk R, Brealey N, Criner GJ, Dransfield MT, Hilton E, Lomas DA, Zhu CQ, Lipson DA. Single-inhaler triple therapy in symptomatic COPD patients: FULFIL subgroup analyses. *ERJ Open Res.* 2018;4:00119-2017.
74. Halpin DMG, Celli BR, Criner GJ, Frith P, López Varela MV, Salvi S, Vogelmeier CF, Chen R, Mortimer K, Montes de Oca M, Aisanov Z, Obaseki D, Decker R, Agusti A. The GOLD Summit on chronic obstructive pulmonary disease in low- and middle-income countries. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2019;23:1131-1141.
75. Hanks LJ, Gutiérrez OM, Bamman MM, Ashraf A, McCormick KL, Casazza K. Circulating levels of fibroblast growth factor-21 increase with age independently of body composition indices among healthy individuals. *J Clin Transl Endocrinol.* 2015;2:77-82.
76. Hara H, Kuwano K, Araya J. Mitochondrial Quality Control in COPD and IPF. *Cells.* 2018;7:86.
77. Hashimoto Y, Niikura T, Tajima H, Yasukawa T, Sudo H, Ito Y, Kita Y, Kawasumi M, Kouyama K, Doyu M, Sobue G, Koide T, Tsuji S, Lang J, Kurokawa K, Nishimoto I. A rescue factor abolishing neuronal cell death by a wide spectrum of familial Alzheimer's disease genes and Abeta. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 22;98:6336-41.
78. Hathazi D, Griffin H, Jennings MJ, Giunta M, Powell C, Pearce SF, Munro B, Wei W, Boczonadi V, Poulton J, Pyle A, Calabrese C, Gomez-Duran A, Schara U, Pitceathly RDS, Hanna MG, Joost K, Cotta A, Paim JF, Navarro MM, Duff J, Mattman A, Chapman K, Servidei S, Della Marina A, Uusimaa J, Roos A, Mootha V, Hirano M, Tulinius M, Giri M, Hoffmann EP, Lochmüller H, DiMauro S, Minczuk M, Chinnery PF, Müller JS, Horvath R. Metabolic shift underlies recovery in reversible infantile respiratory chain deficiency. *EMBO J.* 2020;39:e105364.

79. Hekimi S, Lapointe J, Wen Y. Taking a "good" look at free radicals in the aging process. *Trends Cell Biol.* 2011;21:569-76.
80. Hill CM, Qualls-Creekmore E, Berthoud HR, Soto P, Yu S, McDougal DH, Münzberg H, Morrison CD. FGF21 and the Physiological Regulation of Macronutrient Preference. *Endocrinology.* 2020;161:bqaa019.
81. Hogeia SP, Tudorache E, Fildan AP, Fira-Mladinescu O, Marc M, Oancea C. Risk factors of chronic obstructive pulmonary disease exacerbations. *Clin Respir J.* 2020;14:183-197.
82. Hopkinson NS, Nickol AH, Payne J, Hawe E, Man WD-C, Moxham J, *et al.* Angiotensin converting enzyme genotype and strength in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2004;170:395-9.
83. Hoult G, Gillespie D, Wilkinson TMA, Thomas M, Francis NA. Biomarkers to guide the use of antibiotics for acute exacerbations of COPD (AECOPD): a systematic review and meta-analysis. *BMC Pulm Med.* 2022;22:194.
84. Howard C, Ferrucci L, Sun K, Fried LP, Walston J, Varadhan R, Guralnik JM, Semba RD. Oxidative protein damage is associated with poor grip strength among older women living in the community. *J Appl Physiol.* 2007;103:17-20.
85. Hurst JR, Wedzicha JA. What is (and what is not) a COPD exacerbation: thoughts from the new GOLD guidelines. *Thorax.* 2007;62:198-9.
86. Husebø GR, Grønseth R, Lerner L, Gyuris J, Hardie JA, Bakke PS, Eagan TM. Growth differentiation factor-15 is a predictor of important disease outcomes in patients with COPD. *Eur Respir J.* 2017;49:1601298.
87. Hyatt JK. MOTS-c increases in skeletal muscle following long term physical activity and improves acute exercise performance after a single dose. *Physiol Rep.* 2022;10:e15377.
88. Ikonen M, Liu B, Hashimoto Y, Ma L, Lee KW, Niikura T, Nishimoto I, Cohen P. Interaction between the Alzheimer's survival peptide humanin and insulin-like

growth factor-binding protein 3 regulates cell survival and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:13042-7.

89. Jackson H, Hubbard R. Detecting chronic obstructive pulmonary disease using peak flow rate: cross sectional survey. *BMJ*. 2003;327:653-4.
90. Jaitovich A, Barreiro E. Skeletal Muscle Dysfunction in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. What We Know and Can Do for Our Patients. *Am J Respir Crit Care Med*. 2018;198:175-186.
91. Jaitovich A, Angulo M, Lecuona E, Dada LA, Welch LC, Cheng Y, Gusarova G, Ceco E, Liu C, Shigemura M, Barreiro E, Patterson C, Nader GA, Sznajder JI. High CO₂ levels cause skeletal muscle atrophy via AMP-activated kinase (AMPK), FoxO3a protein, and muscle-specific Ring finger protein 1 (MuRF1). *J Biol Chem*. 2015;290:9183-94.
92. Jiang Y, Wang X, Hu D. Mitochondrial alterations during oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2017;12:1153-1162.
93. Jo D, Yoon G, Kim OY, Song J. A new paradigm in sarcopenia: Cognitive impairment caused by imbalanced myokine secretion and vascular dysfunction. *Biomed Pharmacother*. 2022;147:112636.
94. Jones PW, Harding G, Berry P, Wiklund I, Chen WH, Kline Leidy N. Development and first validation of the COPD Assessment Test. *Eur Respir J*. 2009;34:648-54.
95. Jones PW, Tabberer M, Chen WH. Creating scenarios of the impact of COPD and their relationship to COPD Assessment Test (CAT™) scores. *BMC Pulm Med*. 2011;11:42.
96. Kang M-J, Shadel GS. A Mitochondrial Perspective of Chronic Obstructive Pulmonary Disease Pathogenesis. *Tuberc Respir Dis*. 2016;79:207-13.
97. Keevil BG, Nicholls SP, Kilpatrick ES. Evaluation of a latex-enhanced immunoturbidimetric assay for measuring low concentrations of C-reactive protein. *Ann Clin Biochem*. 1998;35:671-3.

98. Kempf T, von Haehling S, Peter T, Allhoff T, Cicoira M, Doehner W, Ponikowski P, Filippatos GS, Rozentritt P, Drexler H, Anker SD, Wollert KC. Prognostic utility of growth differentiation factor-15 in patients with chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 2007;50:1054-60.
99. Kim CS, Joe Y, Choi HS, Back SH, Park JW, Chung HT, Roh E, Kim MS, Ha TY, Yu R. Deficiency of fibroblast growth factor 21 aggravates obesity-induced atrophic responses in skeletal muscle. *J Inflamm (Lond)*. 2019;16:17.
100. Kim KH, Son JM, Benayoun BA, Lee C. The Mitochondrial-Encoded Peptide MOTS-c Translocates to the Nucleus to Regulate Nuclear Gene Expression in Response to Metabolic Stress. *Cell Metab*. 2018;28:516-524.
101. Kim SJ, Xiao J, Wan J, Cohen P, Yen K. Mitochondrially derived peptides as novel regulators of metabolism. *J Physiol*. 2017;595:6613-6621.
102. Kirkwood TB. Understanding the odd science of aging. *Cell*. 2005;120:437-47.
103. Kuilman T, Michaloglou C, Mooi WJ, Peeper DS. The essence of senescence. *Genes Dev*. 2010;24:2463-79.
104. Kumagai H, Coelho AR, Wan J, Mehta HH, Yen K, Huang A, Zempo H, Fuku N, Maeda S, Oliveira PJ, Cohen P, Kim SJ. MOTS-c reduces myostatin and muscle atrophy signaling. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2021;320:E680-E690.
105. Lange P, Celli B, Agustí A. Lung-Function Trajectories and Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *N Engl J Med*. 2015;373:1575.
106. Lee C, Zeng J, Drew BG, Sallam T, Martin-Montalvo A, Wan J, Kim SJ, Mehta H, Hevener AL, de Cabo R, Cohen P. The mitochondrial-derived peptide MOTS-c promotes metabolic homeostasis and reduces obesity and insulin resistance. *Cell Metab*. 2015;21:443-54.
107. Lee C, Yen K, Cohen P. Humanin: a harbinger of mitochondrial-derived peptides? *Trends Endocrinol Metab*. 2013;24:222-8.

108. Lee SH, Park MJ, Choi SI, Lee EJ, Lee SY, In KH. Reactive oxygen species modulator 1 (Romo1) as a novel diagnostic marker for lung cancer-related malignant effusion. *Medicine (Baltimore)*. 2017;96:e5975.
109. Lerner CA, Sundar IK, Rahman I. Mitochondrial redox system, dynamics, and dysfunction in lung inflammaging and COPD. *Int J Biochem Cell Biol*. 2016;81:294-306.
110. Lerner L, Hayes TG, Tao N, Krieger B, Feng B, Wu Z, Nicoletti R, Chiu MI, Gyuris J, Garcia JM. Plasma growth differentiation factor 15 is associated with weight loss and mortality in cancer patients. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2015;6:317-24.
111. Liu C, Gidlund EK, Witasz A, Qureshi AR, Söderberg M, Thorell A, *et al*. Reduced skeletal muscle expression of mitochondrial-derived peptides human and MOTS-c and Nrf2 in chronic kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2019;317:F1123-31.
112. Liu X, Chen Z. The pathophysiological role of mitochondrial oxidative stress in lung diseases. *J Transl Med*. 2017;15:207.
113. Lu Y, Bradley JS, McCoski SR, Gonzalez JM, Ealy AD, Johnson SE. Reduced skeletal muscle fiber size following caloric restriction is associated with calpain-mediated proteolysis and attenuation of IGF-1 signaling. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2017;312:R806-R815.
114. Luo Y, Ye S, Chen X, Gong F, Lu W, Li X. Rush to the fire: FGF21 extinguishes metabolic stress, metaflammation and tissue damage. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2017;38:59-65.
115. MacNee W. Is Chronic Obstructive Pulmonary Disease an Accelerated Aging Disease? *Ann Am Thorac Soc*. 2016;13:S429-S437.
116. Mahboobi H, Golmirzaei J, Gan SH, Jalalian M, Kamal MA. Humanin: a possible linkage between Alzheimer's disease and type 2 diabetes. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2014;13:543-52.

117. Maltais F, Decramer M, Casaburi R, Barreiro E, Burelle Y, Debigaré R, Dekhuijzen PN, Franssen F, Gayan-Ramirez G, Gea J, Gosker HR, Gosselink R, Hayot M, Hussain SN, Janssens W, Polkey MI, Roca J, Saey D, Schols AM, Spruit MA, Steiner M, Taivassalo T, Troosters T, Vogiatzis I, Wagner PD; ATS/ERS Ad Hoc Committee on Limb Muscle Dysfunction in COPD. An official American Thoracic Society/European Respiratory Society statement: update on limb muscle dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2014;189:e15-62.
118. Mangalhara KC, Shadel GS. A Mitochondrial-Derived Peptide Exercises the Nuclear Option. *Cell Metab*. 2018;28:330-331.
119. Mannino DM, Buist AS. Global burden of COPD: risk factors, prevalence, and future trends. *Lancet*. 2007;370:765-73.
120. Martinez CH, Freeman CM, Nelson JD, Murray S, Wang X, Budoff MJ, Dransfield MT, Hokanson JE, Kazerooni EA, Kinney GL, Regan EA, Wells JM, Martinez FJ, Han MK, Curtis JL; COPDGene Investigators. GDF-15 plasma levels in chronic obstructive pulmonary disease are associated with subclinical coronary artery disease. *Respir Res*. 2017;18:42.
121. Mathers CD, Loncar D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Med*. 2006;3:e442.
122. Meng SJ, Yu LJ. Oxidative stress, molecular inflammation and sarcopenia. *Int J Mol Sci*. 2010;11:1509-26.
123. Merry TL, Chan A, Woodhead JST, Reynolds JC, Kumagai H, Kim SJ, Lee C. Mitochondrial derived peptides in energy metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2020;319:E659-E666.
124. Michaeloudes C, Bhavsar PK, Mumby S, Chung KF, Adcock IM. Dealing with Stress: Defective Metabolic Adaptation in Chronic Obstructive Pulmonary Disease Pathogenesis. *Ann Am Thorac Soc*. 2017;14:S374-S382.

125. Ming W, Lu G, Xin S, Huanyu L, Yinghao J, Xiaoying L, Chengming X, Banjun R, Li W, Zifan L. Mitochondria related peptide MOTS-c suppresses ovariectomy-induced bone loss via AMPK activation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016;476:412-419.
126. Miravittles M, Calle M, Molina J, Almagro P, Gómez JT, Trigueros JA, Cosío BG, Casanova C, López-Campos JL, Riesco JA, Simonet P, Rigau D, Soriano JB, Ancochea J, Soler-Cataluña JJ. Spanish COPD Guidelines (GesEPOC) 2021: Updated Pharmacological treatment of stable COPD. *Arch Bronconeumol*. 2022;58:69-81.
127. Miravittles M, Worth H, Soler Cataluña JJ, Price D, De Benedetto F, Roche N, Godtfredsen NS, van der Molen T, Löfdahl CG, Padullés L, Ribera A. Observational study to characterise 24-hour COPD symptoms and their relationship with patient-reported outcomes: results from the ASSESS study. *Respir Res*. 2014;15:122.
128. Montes de Oca M, Perez-Padilla R, Tálamo C, Halbert RJ, Moreno D, Lopez MV, Muiño A, José Roberto BJ, Valdivia G, Pertuzé J, Ana Maria BM; PLATINO Team. Acute bronchodilator responsiveness in subjects with and without airflow obstruction in five Latin American cities: the PLATINO study. *Pulm Pharmacol Ther*. 2010;23:29-35.
129. Mueller T, Leitner I, Egger M, Haltmayer M, Dieplinger B. Association of the biomarkers soluble ST2, galectin-3 and growth-differentiation factor-15 with heart failure and other non-cardiac diseases. *Clin Chim Acta*. 2015;445:155-60.
130. Mullican SE, Rangwala SM. Uniting GDF15 and GFRAL: Therapeutic Opportunities in Obesity and Beyond. *Trends Endocrinol Metab*. 2018;29:560-570.
131. Mumby S, Adcock IM. Recent evidence from omic analysis for redox signalling and mitochondrial oxidative stress in COPD. *J Inflamm (Lond)*. 2022;19:10.
132. Mutlu LC, Altintas N, Aydin M, Tulubas F, Oran M, Kucukyalin V, Kaplan G, Gurel A. Growth Differentiation Factor-15 Is a Novel Biomarker Predicting Acute Exacerbation of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Inflammation*. 2015;38:1805-13.

133. Navratilova Z, Kolek V, Petrek M. Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2016;64:177-93.
134. Oost LJ, Kustermann M, Armani A, Blaauw B, Romanello V. Fibroblast growth factor 21 controls mitophagy and muscle mass. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2019;10:630-642.
135. Patel MS, Lee J, Baz M, Wells CE, Bloch S, Lewis A, Donaldson AV, Garfield BE, Hopkinson NS, Natanek A, Man WD, Wells DJ, Baker EH, Polkey MI, Kemp PR. Growth differentiation factor-15 is associated with muscle mass in chronic obstructive pulmonary disease and promotes muscle wasting in vivo. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2016;7:436-48.
136. Prakash YS, Pabelick CM, Sieck GC. Mitochondrial Dysfunction in Airway Disease. *Chest*. 2017;152:618-626.
137. Qin Q, Delrio S, Wan J, Widmer RJ, Cohen P, Lerman LO, *et al*. Downregulation of circulating MOTS-c levels in patients with coronary endothelial dysfunction. *Int J Cardiol*. 2018;254:23-7.
138. Quirós PM, Mottis A, Auwerx J. Mitonuclear communication in homeostasis and stress. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2016;17:213-26.
139. Quirós PM, Prado MA, Zamboni N, D'Amico D, Williams RW, Finley D, Gygi SP, Auwerx J. Multi-omics analysis identifies ATF4 as a key regulator of the mitochondrial stress response in mammals. *J Cell Biol*. 2017;216:2027-2045.
140. Rabe KF, Hurd S, Anzueto A, Barnes PJ, Buist SA, Calverley P, Fukuchi Y, Jenkins C, Rodriguez-Roisin R, van Weel C, Zielinski J; Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007;176:532-55.

141. Ramanjaneya M, Bettahi I, Jerobin J, Chandra P, Abi Khalil C, Skarulis M, *et al.* Mitochondrial-derived peptides are down regulated in diabetes subjects. *Front Endocrinol.* 2019;10:331.
142. Recommendations of the German Society for Clinical Chemistry Standard Method for the Determination of Creatine Kinase Activity Revised Draft of 1976. *J Clin Chem Clin Biochem.* 1977;15:255-260.
143. Restelli LM, Oettinghaus B, Halliday M, Agca C, Licci M, Sironi L, Savoia C, Hench J, Tolnay M, Neutzner A, Schmidt A, Eckert A, Mallucci G, Scorrano L, Frank S. Neuronal Mitochondrial Dysfunction Activates the Integrated Stress Response to Induce Fibroblast Growth Factor 21. *Cell Rep.* 2018;24:1407-1414.
144. Reynolds JC, Lai RW, Woodhead JST, Joly JH, Mitchell CJ, Cameron-Smith D, Lu R, Cohen P, Graham NA, Benayoun BA, Merry TL, Lee C. MOTS-c is an exercise-induced mitochondrial-encoded regulator of age-dependent physical decline and muscle homeostasis. *Nat Commun.* 2021;12:470.
145. Rodriguez-Roisin R. Toward a consensus definition for COPD exacerbations. *Chest.* 2000;117:398S-401S.
146. Rovina N, Koutsoukou A, Koulouris NG. Inflammation and immune response in COPD: where do we stand? *Mediators Inflamm.* 2013;2013:413735.
147. Salama R, Sadaie M, Hoare M, Narita M. Cellular senescence and its effector programs. *Genes Dev.* 2014;28:99-114.
148. Salas-Lucia F, Bianco AC. T3 levels and thyroid hormone signaling. *Front Endocrinol.* 2022;13:1044691.
149. Salvioli S, Monti D, Lanzarini C, Conte M, Pirazzini C, Bacalini MG, Garagnani P, Giuliani C, Fontanesi E, Ostan R, Bucci L, Sevini F, Yan L, Barbieri A, Lomartire L, Borelli V, Vianello D, Bellavista E, Martucci M, Cevenini E, Pini E, Scurti M, Biondi F, Santoro A, Capri M, Franceschi C. Immune system, cell senescence, aging and longevity--inflamm-aging reappraised. *Curr Pharm Des.* 2013;19:1675-9.

150. Schinzel R, Dillin A. Endocrine aspects of organelle stress—cell non-autonomous signaling of mitochondria and the ER. *Curr Opin Cell Biol.* 2015;33:102-10.
151. Scholle LM, Lehmann D, Deschauer M, Kraya T, Zierz S. FGF-21 as a Potential Biomarker for Mitochondrial Diseases. *Curr Med Chem.* 2018;25:2070-2081.
152. Schols AM, Broekhuizen R, Weling-Scheepers CA, Wouters EF. Body composition and mortality in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Clin Nutr.* 2005;82:53-9.
153. Schols AM, Ferreira IM, Franssen FM, Gosker HR, Janssens W, Muscaritoli M, Pison C, Rutten-van Mölken M, Slinde F, Steiner MC, Tkacova R, Singh SJ. Nutritional assessment and therapy in COPD: a European Respiratory Society statement. *Eur Respir J.* 2014;44:1504-20.
154. Seemungal TA, Donaldson GC, Bhowmik A, Jeffries DJ, Wedzicha JA. Time course and recovery of exacerbations in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;161:1608-13.
155. Shafiee G, Keshtkar A, Soltani A, Ahadi Z, Larijani B, Heshmat R. Prevalence of sarcopenia in the world: a systematic review and meta- analysis of general population studies. *J Diabetes Metab Disord.* 2017;16:21.
156. Shin JA, Chung JS, Cho SH, Kim HJ, Yoo YD. Romo1 expression contributes to oxidative stress-induced death of lung epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013;439:315-20.
157. Shin MY, Kim JM, Kang YE, Kim MK, Joung KH, Lee JH, Kim KS, Kim HJ, Ku BJ, Shong M. Association between Growth Differentiation Factor 15 (GDF15) and Cardiovascular Risk in Patients with Newly Diagnosed Type 2 Diabetes Mellitus. *J Korean Med Sci.* 2016;31:1413-8.
158. Siu PM, Pistilli EE, Alway SE. Age-dependent increase in oxidative stress in gastrocnemius muscle with unloading. *J Appl Physiol.* 2008;105:1695-705
159. Smati S, Régnier M, Fougeray T, Polizzi A, Fougerat A, Lasserre F, Lukowicz C, Tramunt B, Guillaume M, Burnol AF, Postic C, Wahli W, Montagner A, Gourdy P,

Guillou H. Regulation of hepatokine gene expression in response to fasting and feeding: Influence of PPAR- α and insulin-dependent signalling in hepatocytes. *Diabetes Metab.* 2020;46:129-136.

160. 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;60:925-31.
161. Soler-Cataluña JJ, Martínez-García MA, Sánchez LS, Tordera MP, Sánchez PR. Severe exacerbations and BODE index: two independent risk factors for death in male COPD patients. *Respir Med.* 2009;103:692-9.
162. Soriano JB, Miravittles M. Datos epidemiológicos de EPOC en España. *Arch Bronconeumol.* 2007;43:2-9.
163. Soriano JB, Alfageme I, Miravittles M, de Lucas P, Soler-Cataluña JJ, García-Río F, Casanova C, Rodríguez González-Moro JM, Cosío BG, Sánchez G, Ancochea J. Prevalence and Determinants of COPD in Spain: EPISCAN II. *Arch Bronconeumol.* 2021;57:61-69.
164. Springer J, Scholz FR, Peiser C, Groneberg DA, Fischer A. SMAD-signaling in chronic obstructive pulmonary disease: transcriptional down-regulation of inhibitory SMAD 6 and 7 by cigarette smoke. *Biol Chem.* 2004;385:649-53.
165. Sreekumar PG, Hinton DR, Kannan R. Endoplasmic reticulum-mitochondrial crosstalk: a novel role for the mitochondrial peptide humanin. *Neural Regen Res.* 2017;12:35-38.
166. Sreekumar PG, Ishikawa K, Spee C, Mehta HH, Wan J, Yen K, Cohen P, Kannan R, Hinton DR. The Mitochondrial-Derived Peptide Humanin Protects RPE Cells From Oxidative Stress, Senescence, and Mitochondrial Dysfunction. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2016;57:1238-53.
167. Steffl M, Bohannon RW, Petr M, Kohlikova E, Holmerova I. Relation between cigarette smoking and sarcopenia: meta-analysis. *Physiol Res.* 2015;64:419-26.

168. Stockley RA, Mannino D, Barnes PJ. Burden and pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc.* 2009;6:524-6.
169. Suassuna PGA, de Paula RB, Sanders-Pinheiro H, Moe OW, Hu MC. Fibroblast growth factor 21 in chronic kidney disease. *J Nephrol.* 2019;32:365-377.
170. Sundh J, Janson C, Lisspers K, Ställberg B, Montgomery S. The Dyspnoea, Obstruction, Smoking, Exacerbation (DOSE) index is predictive of mortality in COPD. *Prim Care Respir J.* 2012;21:295-301.
171. Suomalainen A, Battersby BJ. Mitochondrial diseases: the contribution of organelle stress responses to pathology. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2018;19:77-92.
172. Swallow EB, Reyes D, Hopkinson NS, Man WD, Porcher R, Cetti EJ, Moore AJ, Moxham J, Polkey MI. Quadriceps strength predicts mortality in patients with moderate to severe chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax.* 2007;62:115-120.
173. Swarnabala S, Gattu M, Perry B, Cho Y, Lockey RF, Kolliputi N. Romo1 links oxidative stress to mitochondrial integrity. *J Cell Commun Signal.* 2015;9:73-75.
174. Szasz G, Gruber W, Bernt E. Creatine kinase in serum: Determination of optimum reaction conditions. *Clin Chem.* 1976;22:650-656.
175. Szucs B, Szucs C, Petrekanits M, Varga JT. Molecular Characteristics and Treatment of Endothelial Dysfunction in Patients with COPD: A Review Article. *Int J Mol Sci.* 2019;20:4329.
176. Tekin S, Bir LS, Avci E, Senol H, Tekin I, Cinkir U. Comparison of serum mitochondrial open reading frame of the 12S rRNA-c (MOTS-c) levels in patients with multiple sclerosis and healthy controls. *Cureus.* 2022;14:e26981.
177. Trinder P. Determination of blood glucose using an oxidase-peroxidase system with a noncarcinogenic chromogen. *J Clin Pathol.* 1969;22:158-161.
178. Troosters T, Sciurba F, Battaglia S, Langer D, Valluri SR, Martino L, *et al.* Physical inactivity in patients with COPD, a controlled multi-center pilot-study. *Respir Med.* 2010;104:1005-11.

179. Tsai VWW, Husaini Y, Sainsbury A, Brown DA, Breit SN. The MIC-1/GDF15-GFRAL Pathway in Energy Homeostasis: Implications for Obesity, Cachexia, and Other Associated Diseases. *Cell Metab.* 2018;28:353-368.
180. Verhamme FM, Freeman CM, Brusselle GG, Bracke KR, Curtis JL. GDF-15 in Pulmonary and Critical Care Medicine. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2019;60:621-628.
181. Verhamme FM, Seys LJM, De Smet EG, Provoost S, Janssens W, Elewaut D, Joos GF, Brusselle GG, Bracke KR. Elevated GDF-15 contributes to pulmonary inflammation upon cigarette smoke exposure. *Mucosal Immunol.* 2017;10:1400-1411.
182. Vogelmeier CF, Criner GJ, Martinez FJ, Anzueto A, Barnes PJ, Bourbeau J, Celli BR, Chen R, Decramer M, Fabbri LM, Frith P, Halpin DM, López Varela MV, Nishimura M, Roche N, Rodriguez-Roisin R, Sin DD, Singh D, Stockley R, Vestbo J, Wedzicha JA, Agustí A. Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Lung Disease 2017 Report. GOLD Executive Summary. *Am J Respir Crit Care Med.* 2017;195:557-582.
183. Vollmer WM, Gíslason T, Burney P, Enright PL, Gulsvik A, Kocabas A, Buist AS. Comparison of spirometry criteria for the diagnosis of COPD: results from the BOLD study. *Eur Respir J.* 2009;34:588-97.
184. Whelan SP, Zuckerbraun BS. Mitochondrial signaling: forwards, backwards, and in between. *Oxid Med Cell Longev.* 2013;2013:351613.
185. Wu X, Xuan W, You L, Lian H, Li F, Zhang X, Chen Q, Sun K, Chen C, Xu M, Li Y, Yan L, Zhang X, Ren M. Associations of GDF-15 and GDF-15/adiponectin ratio with odds of type 2 diabetes in the Chinese population. *Endocrine.* 2021;72:423-436.
186. Ye L, Mao S, Fang S, Zhang J, Tan Y, Gu W. Increased Serum Romo1 Was Correlated with Lung Function, Inflammation, and Oxidative Stress in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Inflammation.* 2019;42:1555-1560.

187. Ye L, Quian Y, Li Q, Fang S, Yang Z, Tan Y, *et al.* Serum Romo1 is significantly associated with disease severity in patients with obstructive sleep apnea syndrome. *Sleep Breath.* 2018;22:743-8.
188. Yen K, Lee C, Mehta H, Cohen P. The emerging role of the mitochondrial-derived peptide humanin in stress resistance. *J Mol Endocrinol.* 2013;50:R11-9.
189. Yi HS, Chang JY, Shong M. The mitochondrial unfolded protein response and mitohormesis: a perspective on metabolic diseases. *J Mol Endocrinol.* 2018;61:R91-R105.
190. Yue L, Yao H. Mitochondrial dysfunction in inflammatory responses and cellular senescence: pathogenesis and pharmacological targets for chronic lung diseases. *Br J Pharmacol.* 2016;173:2305-18.
191. Zuur-Telgen MC, Citgez E, Zuur AT, VanderValk P, van der Palen J, Kerstjens HAM, Brusse-Keizer M. Predicting Mortality in COPD with Validated and Sensitive Biomarkers; Fibrinogen and Mid-Range-Proadrenomedullin (MR-proADM). *COPD.* 2021;18:643-649.

ANEXOS Y PUBLICACIONES

9. ANEXOS Y PUBLICACIONES

9.1. APROBACIÓN DEL CEIm



T. CONCEPCION SOLANAS GUERRERO, Secretario/a del **COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN CON MEDICAMENTOS DE CANTABRIA**

CERTIFICA

Que este Comité ha evaluado la propuesta del Investigador Principal del estudio:

TÍTULO: Caracterización de la disfunción secretoria extracelular dependiente de las mitocondrias (mitoquinas) en los pacientes con EPOC.

TIPO DE ESTUDIO: Proyecto de Investigación (Código interno: 2018.276)

y considera que:

- Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto, teniendo en cuenta los beneficios esperados.
- Es adecuado el procedimiento para obtener el consentimiento informado.
- La capacidad del investigador y sus colaboradores, y las instalaciones y medios disponibles, tal y como ha sido informado, son apropiados para llevar a cabo el estudio.

Este CEIC, emite un informe **FAVORABLE** para que dicho Estudio sea realizado en el **HOSPITAL UNIVERSITARIO MARQUÉS DE VALDECILLA**, actuando como investigador principal el Dr. **CARLOS ANTONIO AMADO DIAGO**

Como queda reflejado en el Acta: **03/2019**.

Lo que firmo en Santander, a **15 de febrero de 2019**


T. CONCEPCION SOLANAS GUERRERO
Secretario/a del CEIm

9.2. CONSENTIMIENTO INFORMADO

	Código del estudio 1º APELLIDO 2º APELLIDO NOMBRE
BIOBANCO VALDECILLA Nodo de ADN y Fluidos	
CONSENTIMIENTO INFORMADO <i>ESTUDIO DE EPOC</i>	
Nuestra intención es proporcionarle información adecuada y suficiente para que pueda evaluar y juzgar si quiere o no participar en el estudio. Para ello, es conveniente leer con atención esta hoja informativa y preguntar cualquier duda que le surja relativa al estudio. Además puede consultar con cualquier persona que considere oportuno. Para un adecuado avance en la investigación de las diferentes enfermedades, es necesario estudiar factores y utilizar todas las fuentes de información disponibles para alcanzar el máximo grado de conocimiento sobre los factores que determinan la evolución y el pronóstico de la enfermedad. Así se justifica la utilización de datos provenientes de muestras biológicas (sangre) y de pruebas de función respiratoria (espirometría, Test de marcha de 6 minutos, impedanciometría, medida de fuerza de manos y cuestionario CAT) de los participantes, con el fin de obtener conocimientos que permitan desarrollar nuevas estrategias diagnósticas, herramientas de pronóstico, así como obtener nuevos y mejores tratamientos. Por ello solicitamos su consentimiento para participar en el proyecto <i>Caracterización de la disfunción secretoria extracelular dependiente de las mitocondrias (mitoquinas) en los pacientes con EPOC</i> del investigador principal Carlos Antonio Amado Diago que se describe más abajo, que ha sido aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica de Cantabria y respeta la normativa vigente La participación en esta investigación implica la realización de pruebas de función respiratoria (espirometría, Test de marcha de 6 minutos, impedanciometría, medida de fuerza de manos y Cuestionario CAT) y la donación de una muestra de sangre que se utilizará en el estudio y que posteriormente formará parte de una colección del Biobanco Valdecilla (Nodo de ADN y fluidos) localizado en el Edificio IDIVAL, Avda. Cardenal Herrera Oria s/n, Planta 0 en Santander. Las muestras conservadas en el Biobanco podrán ser utilizadas tanto en el desarrollo del estudio mencionado como en futuras investigaciones relacionadas con esta patología u otras asociadas. Participación voluntaria: La participación en este estudio, así como la donación de muestras es totalmente voluntaria y la decisión de no participar no afectará su relación con el equipo de médicos que la atienden ni implicará perjuicio alguno en su tratamiento. ¿Qué supone participar en este estudio? La participación en el estudio supone que se compromete con el investigador al cumplimiento de las instrucciones del protocolo del estudio. ¿Qué inconvenientes tiene participar en el estudio? Participar en el estudio le supondrá tener que acudir al Hospital de Liencres para la realización de las pruebas requeridas. ¿Qué beneficios puedo obtener participando en este estudio? Es posible que no obtenga ningún beneficio directo por su participación en este estudio. En lo referente a la donación de sus muestras y datos, su donación tiene un carácter altruista y el único beneficio esperado es el avance en el conocimiento científico relativo a esta enfermedad, aunque podría suponer beneficios futuros para Ud. y los pacientes. DESCRIPCIÓN GENERAL DEL ESTUDIO • Objetivo principal: Determinar si los niveles de mitoquinas en sangre (proteínas producidas por algunos tipos de células) se encuentran alterados en los pacientes con EPOC respecto a los controles sin EPOC, y si estos niveles se asocian a peores variables clínicas y se pueden utilizar como factores pronósticos de la EPOC. • Metodología: Se trata de un estudio observacional prospectivo. Se incluirán pacientes que acuden a la consulta externa de EPOC del Servicio de Neumología del Hospital de Sierrallana, pacientes que acuden a Urgencias para ser tratados por una agudización de la EPOC, y sujetos control fumadores pero sin patología respiratoria. • Estudios: Pruebas de función respiratoria (espirometría, Test de marcha de 6 minutos, impedanciometría, medida de fuerza de manos y Cuestionario CAT) y se realizará una extracción de sangre. • Datos: Se recogerá información clínica y de hábitos de vida.	

V-3-27082018-ESTUDIO EPOC

	Código del estudio
	1º APELLIDO
	2º APELLIDO
	NOMBRE
BIOBANCO VALDECILLA Nodo de ADN y Fluidos	HISTORIA CLÍNICA / CIP
CONSENTIMIENTO INFORMADO <i>ESTUDIO DE EPOC</i>	
PROCEDIMIENTO DE INFORMACIÓN Y DONACIÓN DE MUESTRAS Con la firma de este Consentimiento Informado el participante autoriza la obtención de información y procesamiento de su muestra, así como la gestión de los datos referidos a su salud que sean relevantes para la investigación científica, y que implicará el siguiente proceso: ESPIROMETRÍA: Esta prueba consiste en soltar el aire lo más fuerte que se pueda en una máquina que analiza si tiene limitada la capacidad para vaciar sus pulmones. No tiene efectos secundarios y es bien tolerada salvo en casos en los que puede producir mareo o aumento de expulsión de flemas. OTRAS PRUEBAS: Test de marcha de 6 minutos: Consiste en caminar 6 minutos en un circuito de 30 metros de longitud, la prueba se puede parar en cualquier momento si el paciente tiene necesidad de parar por sensación de ahogo, dolor en el pecho o piernas o cualquier otra circunstancia. La prueba no tiene otros efectos secundarios que los derivados de realizar ejercicio físico. Impedanciometría: Es una prueba similar a un peso que mide la cantidad de grasa que tiene su organismo, no tiene efectos secundarios. Medida de fuerza de manos: Consiste en presionar un aparato similar al freno de una bicicleta para medir la fuerza de las manos, no tiene efectos secundarios. Cuestionario CAT: Consiste en contestar las preguntas de un cuestionario sobre su Enfermedad. EXTRACCIÓN DE SANGRE que implicará el siguiente proceso: - En el Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Hospital de Liencres o en su Centro de Salud se obtendrá una muestra de sangre para la obtención de ADN, plasma y suero, para lo cual se extraerán en total unos 20 ml en 2 tubos malva y 2 tubos teja, respectivamente, mediante venopunción. La donación de sangre apenas tiene efectos secundarios; lo más frecuente es la aparición de pequeños hematomas en la zona de punción que desaparecen transcurridos 1 o 2 días. Una vez obtenidas, la muestra se enviarán al Nodo de ADN y Fluidos del Biobanco Valdecilla donde se registrará, codificará, procesará y almacenará. - La sangre se enviará Nodo de ADN y Fluidos del Biobanco Valdecilla donde se codificará, registrará y procesará para la obtención de suero, plasma, ADN, ARN y otros derivados de la sangre. - Una parte del suero se utilizará en este estudio para la determinación de mitoquinas en sangre. - Las muestras estarán almacenadas en congeladores a -80°C en el Biobanco Valdecilla, ubicado en la planta 0 del Edificio de la Fundación Instituto de Investigación Marqués de Valdecilla. - Una vez finalizado el estudio que da origen a la colección, si Ud. lo autoriza, las muestras quedarán custodiadas por el Biobanco Valdecilla hasta la finalización de la muestra, siempre que no se proceda a la revocación del consentimiento. Finalidad de las muestras depositadas en el Biobanco Valdecilla. El Biobanco Valdecilla es una entidad sin ánimo de lucro cuyo objetivo es gestionar colecciones de muestras biológicas humanas (sangre, ADN, células, plasma, orina, tejido, etc.) y ponerlas, junto a sus datos asociados, a disposición de los investigadores a fin de ser utilizadas en investigación biomédica. De esta manera, los científicos pueden disponer de una gran cantidad de muestras de una misma patología de donde obtener conocimientos para desarrollar nuevas estrategias terapéuticas y tratamientos aplicables a los pacientes. ¿Qué implica depositar las muestras en el Biobanco Valdecilla? Autorizar que las muestras queden custodiadas por el Biobanco Valdecilla implica que los productos obtenidos de las mismas (ADN, ARN, suero, plasma, células, etc.) podrán ser utilizados posteriormente en otros estudios de investigación biomédica realizados por investigadores de este u otros centros, nacionales o extranjeros, siempre que cuenten con la aprobación del Comité Científico Externo y el Comité de Ética del Biobanco Valdecilla. En el caso de que su muestra sea solicitada para otros proyectos, el Biobanco enviará al investigador solicitante una fracción de la misma con los datos clínicos más relevantes. Antes del envío, el Biobanco desvinculará su identidad de la muestra cedida mediante un proceso de re-codificación, de manera que los investigadores no podrán relacionar la muestra con su identidad. El Biobanco Valdecilla se compromete a no comercializar, en ningún caso, las muestras ni los datos personales obtenidos a partir de las muestras. No obstante, la información generada de los estudios realizados sobre su muestra podría ser fuente de beneficios comerciales. En tal caso están previstos mecanismos para que estos beneficios reviertan en la salud de la población, aunque no de forma individual en el donante.	

V-3-27082018-ESTUDIO EPOC

	Código del estudio 1º APELLIDO 2º APELLIDO NOMBRE	
BIOBANCO VALDECILLA Nodo de ADN y Fluidos		
HISTORIA CLINICA / CIP		
CONSENTIMIENTO INFORMADO <i>ESTUDIO DE EPOC</i>		
GARANTÍAS DE CONFIDENCIALIDAD E INFORMACIÓN SOBRE PROTECCIÓN DE DATOS: Los datos que se obtengan serán totalmente confidenciales y serán utilizados exclusivamente con fines investigadores y docentes con el objetivo de mejorar el conocimiento de trastornos psiquiátricos específicos. Su intimidad quedará salvaguardada en todo momento, y ni el nombre, ni cualquier otro dato que pueda llevar a la identificación de los participantes serán utilizados en ninguno de los trabajos que se deriven de esta investigación. Los datos derivados de las pruebas de imagen utilizados en estudios multicéntricos internacionales, se enviarán de forma que se preserve de modo ineludible el anonimato de los datos extraídos y en su caso de los datos clínicos asociados. Conforme a lo establecido en el Reglamento (UE) 2016/679 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 27 de abril de 2016, relativo a la protección de las personas físicas en lo que respecta al tratamiento de datos personales y a la libre circulación de estos datos, se le informa de lo siguiente: El Responsable del Tratamiento es la FUNDACION INSTITUTO DE INVESTIGACION MARQUES DE VALDECILLA-IDIVAL, cita en AVDA. CARDENAL HERRERA ORIA, S/N – 39007 – SANTANDER (Cantabria) - biobanco2@idival.org - 942 202563. La Finalidad del tratamiento es la gestión de datos de muestras biológicas destinadas a investigación epidemiológica y actividades análogas, fines estadísticos, históricos o científicos, siendo el presente consentimiento informado la base jurídica-legal para el tratamiento de sus datos personales. Se le informa, además que para ejercitar sus derechos de acceso, rectificación, supresión así como otros derechos, puede consultar en la información adicional sobre Protección de Datos en www.idival.org/es/Soporte/Biobanco-valdecilla RETIRAR EL CONSENTIMIENTO: El participante tiene derecho a revocar su consentimiento y a retirarse del estudio en cualquier momento y sin dar explicaciones. El cese de su participación en el estudio no afectará a la relación con su médico ni a sus futuros cuidados médicos. Igualmente el participante tiene derecho a solicitar al Investigador Principal Dr. Carlos Antonio Amado Diago o al Responsable en el Biobanco Valdecilla (biobanco2dival.org), en cualquier momento, y sin necesidad de especificar el motivo, la destrucción o anonimización de sus muestras y la eliminación de la información relacionada con las mismas. No obstante, los efectos de la revocación del consentimiento no se extenderán a los datos resultantes de las investigaciones que se hayan llevado a cabo previamente a la misma. Asimismo, puede incluir alguna restricción sobre el uso de sus muestras, especificándolo en el formulario adjunto. En caso de cierre del biobanco, Ud. puede consultar el destino de sus muestras en el Registro Nacional de Biobancos para Investigación Biomédica, pudiendo manifestar su conformidad o disconformidad con el destino previsto para las muestras. Si Ud. es menor de edad, sepa que cuando alcance la mayoría de edad, se le garantiza el acceso a la información indicada en el artículo 32 del RD 1716/2011 sobre su muestra. ACCESO A MUESTRAS Y/O INFORMACIÓN. El Biobanco Valdecilla tendrá a su disposición toda la información sobre los proyectos de investigación en los que se ha utilizado su muestra, pero no será posible comunicarle ningún resultado personal obtenido del estudio de las mismas. En caso de que las investigaciones en las que se utilicen sus muestras proporcionen datos que pudieran ser clínicos o genéticamente relevantes para su salud o la de sus familiares, le serán comunicados si así lo requiere (si las muestras no han sido anonimizadas). Es decisión personal suya informar a dichos familiares sobre estos resultados. El Comité Ético externo del biobanco decidirá en qué casos será imprescindible que se le envíe la información de manera individualizada.		

V-3-27082018-ESTUDIO EPOC

 Valdecilla Instituto de Investigación Sanitaria IDIVAL	Código del estudio 1º APELLIDO 2º APELLIDO NOMBRE
	BIOBANCO VALDECILLA Nodo de ADN y Fluidos
CONSENTIMIENTO INFORMADO <i>ESTUDIO DE EPOC</i>	

CONSENTIMIENTO PARA DONACIÓN DE MUESTRAS AL BIOBANCO VALDECILLA PARA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA Declaro que he recibido información adecuada por el profesional de salud sobre: • He leído y comprendido la hoja de información que se me ha entregado sobre el estudio arriba indicado. • He recibido suficiente información sobre el estudio. • La finalidad para el que se utilizarán tanto mis muestras como mis datos personales en este proceso, y las garantías de cumplimiento de la legalidad vigente, así como de la posibilidad de ceder a terceros las muestras para futuros proyectos de investigación que cumplan con las exigencias éticas y legales aplicables • He hablado con el Dr/a. con quien he clarificado las posibles dudas y realizado todas las preguntas que he precisado sobre el estudio. • Comprendo que mi participación es voluntaria. • Comprendo que puedo retirarme del estudio, cuando quiera, sin dar explicaciones y sin que repercuta en mis cuidados médicos y que tengo derecho de ejercitar el acceso, rectificación, supresión, oposición, limitación, en ciertos supuestos también la portabilidad y olvido a mis datos personales archivados en el Biobanco Valdecilla (Nodo de ADN y fluidos). • Comprendo que la información personal y familiar que aporte será confidencial y no se mostrará a nadie sin mi consentimiento y que mis muestras y datos personales serán proporcionados de forma anonimizada a los investigadores que trabajen con ellas. • Comprendo que mi participación en el estudio implica autorizar la extracción de una muestra de sangre y su utilización, y en caso de ser necesario, el uso de remanentes de las muestras obtenidas en la actividad asistencial.
--

Y AUTORIZO *(por favor, márquese una opción):*

AUTORIZO MI PARTICIPACIÓN en el estudio	SÍ ☐ NO ☐
AUTORIZO LA CESIÓN DE DATOS de forma agrupada y anónima en colaboración con proyectos internacionales.	SÍ ☐ NO ☐
AUTORIZO LA REALIZACIÓN espirometría, test de marcha de 6 minutos, impedanciometría, medida de fuerza de manos y Cuestionario CAT.	SÍ ☐ NO ☐
LA EXTRACCIÓN de una muestras de sangre y su DONACIÓN junto con datos clínicos relevantes al Biobanco Valdecilla.	SÍ ☐ NO ☐
SE ME INFORME sobre los resultados referidos a mi salud derivados de análisis genéticos que pudieran ser realizados sobre mi muestra biológica (siempre que la muestra no se haya anonimizado).	SÍ ☐ NO ☐
A SER CONTACTADO en un futuro en caso de que se estime oportuno añadir nuevos datos a los recogidos en la actualidad.	SÍ ☐ NO ☐
RESTRICCIONES DEL USO DE LA MUESTRA <i>Especifique a continuación si no desea que se utilice su muestra y datos asociados en algún uso concreto o proyecto en particular:</i>	

V-3-27082018-ESTUDIO EPOC

	Código del estudio 1º APELLIDO 2º APELLIDO NOMBRE	
	HISTORIA CLÍNICA / CIP	
BIOBANCO VALDECILLA Nodo de ADN y Fluidos		
CONSENTIMIENTO INFORMADO <i>ESTUDIO DE EPOC</i>		
DATOS DEL DONANTE – cumplimentar siempre –		
D/Dña (apellidos, nombre): DNI / NIE: Firma:		
DATOS DEL REPRESENTANTE LEGAL – cumplimentar si procede –		
REPRESENTANTE D/Dña (apellidos, nombre): PARENTESCO/RELACIÓN con el donante (esposa/a, padre, madre, hijo/a, etc, o tutor)..... DNI / NIE: Firma:		
El Responsable Clínico firmante constata que ha explicado las características de las condiciones de conservación y seguridad que se aplicarán a la muestra y a los datos clínicos conservados. También constata que se han consultado los documentos de instrucciones previas.		
DATOS DEL MÉDICO SOLICITANTE – cumplimentar siempre		
Dr/Dra (apellidos, nombre): Centro en el que trabaja: Firma:		
LUGAR Y FECHA – cumplimentar siempre –		
En, a de de 20		

V-3-27082018-ESTUDIO EPOC

9.3. APROBACIÓN COLECCIÓN BIOBANCO



T. CONCEPCION SOLANAS GUERRERO, Secretario/a del **COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA DE CANTABRIA**

CERTIFICA

Que este Comité ha evaluado la propuesta del Biobanco Valdecilla:

TÍTULO: Creación de la colección EPOC (Enfermedad Pulmonar obstructiva Crónica). Biobanco Valdecilla, Nodo de ADN y Fluidos.

TIPO DE ESTUDIO: Proyecto de Investigación (Código interno: 2018.189) TRF019

y considera que:

- Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto, teniendo en cuenta los beneficios esperados.
- Es adecuado el procedimiento para obtener el consentimiento informado.

Este CEIC, emite un informe **FAVORABLE** para que dicha colección sea transferida/creada en el **Biobanco Valdecilla – Nodo de ADN y Fluidos**, actuando como Promotor el Dr. **CARLOS ANTONIO AMADO DIAGO**.

Como queda reflejado en el Acta: **14/2018**.

Lo que firmo en Santander, a **07 de septiembre de 2018**


T. CONCEPCION SOLANAS GUERRERO
Secretario/a del CEIC

9.4. CONTROLES DE CALIDAD HUMV



9.5. PUBLICACIONES



OPEN

Associations between serum mitokine levels and outcomes in stable COPD: an observational prospective study

Carlos A. Amado^{1,2,5✉}, Paula Martín-Audera³, Juan Agüero¹, Bernardo A. Lavín³, Armando R. Guerra³, Pedro Muñoz⁴, Ana Berja³, Ciro Casanova⁶ & Mayte García-Unzueta^{2,3}

Mitokines (Humanin (HN), GDF15 and FGF21) are produced as a result of mitochondrial dysfunction and may have major roles in chronic inflammation, malnutrition and exercise capacity in people with COPD. Except for GDF15, studies on this subject are lacking. A total of 165 patients with stable COPD and 49 smokers without COPD were enrolled. We assessed their serum mitokine levels and clinical characteristics at baseline. We recorded moderate and severe exacerbation for the next 12 months. Baseline serum HN ($p = 0.037$) and GDF-15 ($p = 0.013$) levels were higher in the COPD group. High HN levels were independently associated with a high risk of exacerbation (HRE) (OR 2.798, 95% CI 1.266–6.187, $p = 0.011$), malnutrition (OR 6.645, 95% CI 1.859–23.749, $p = 0.004$), and 6MWD (OR 0.995, 95% CI 0.991–0.999, $p = 0.008$), and future moderate (HR 1.826, 95% CI 1.181–2.822, $p = 0.007$) and severe exacerbations (HR 3.445, 95% CI 1.357–8.740, $p = 0.009$). High GDF15 levels were associated with HRE (OR 3.028, 95% CI 1.134–8.083, $p = 0.027$), 6MWD (OR 0.995, 95% CI 0.990–0.999, $p = 0.017$) and predicted desaturation in 6MWT (OR 3.999, 95% CI 1.487–10.757, $p = 0.006$). High FGF21 levels were associated with HRE (OR 2.144, 95% CI 1.000–4.600, $p = 0.05$), and predicted future severe exacerbation (HR 4.217, 95% CI 1.459–12.193, $p = 0.008$). The mitokine levels were higher in patients with COPD than smokers without COPD, and were associated with important clinical outcomes such as exercise capacity and COPD exacerbation. Among the mitokines, HN showed the strongest association with COPD and may serve as a future risk biomarker in this disease.

Trial registration NCT04449419.

Abbreviations

COPD	Chronic obstructive pulmonary disease
HN	Humanin
GDF15	Growth and differentiation factor 15
FGF21	Fibroblast growth factor 21
6MWD	6 Minute walk distance
6MWT	6 Minute walk test
OD	Oxygen desaturation
SEPAR	Spanish Society of Pulmonology and Thoracic Surgery
BMI	Body mass index
FFMI	Fat free mass index
HRE	High risk of exacerbation

¹Department of Pulmonology, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Av Valdecilla SN, 39005 Santander, Spain. ²University of Cantabria, Santander, Spain. ³Department of Clinical Biochemistry, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander, Spain. ⁴Servicio Cántabro de Salud, Santander, Spain. ⁵IDIVAL (Instituto de Investigación Biomédica de Cantabria), Santander, Spain. ⁶Servicio de Neumología-Unidad de Investigación, Hospital Universitario La Candelaria, Universidad de La Laguna, Tenerife, Spain. ✉email: carlosantonio.amado@sccsalud.es

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is a leading cause of morbidity and mortality worldwide¹. COPD is a heterogeneous disease in which distinctive characteristics, such as low exercise capacity², low muscle mass³ or severe COPD exacerbation⁴, are associated with poorer prognosis. However, clear evidence indicates the presence of impaired mitochondrial structure and function in the lungs, immune cells and skeletal muscles in COPD, possibly because of the chronic effects of excessive reactive oxygen species^{5–10}.

Mitochondrial stress elicits the production of various circulating cellular stress response molecules called mitokines, which function as autocrine, paracrine and endocrine signals. Humanin (HN), a peptide encoded in mitochondrial DNA, sends a systemic signal of mitochondrial stress. Circulating HN induces a global cytoprotective effect, because it regulates oxidative phosphorylation, and activates the synthesis of antioxidants and chaperones for unfolded proteins in many tissues^{11–17}. Monocytes, alveolar cells and eosinophils express the HN receptors, but the highest expression of these receptors is found in lung macrophages¹⁸. Human primary mitochondrial diseases (mitochondrial DNA mutations and nuclear DNA mutations in mitochondrial-targeted proteins) and diseases associated with mitochondrial dysfunction are characterized by high circulating HN levels^{19–23}. However, no studies to date have examined serum HN levels in COPD.

Stressed mitochondria send signals to the nucleus that activate nuclear genes encoding peptides, such as Growth and Differentiation Factor 15 (GDF15) or Fibroblast growth factor 21 (FGF21), which are also considered mitokines²⁴. GDF15 is an inflammation- and metabolism-associated pleiotropic hormone. This mitokine is a well-known marker of morbidity and mortality in COPD and other diseases^{25,26}, whereas FGF21 is considered a metabolic hormone and a marker of nutritional stress²⁷. As with HN, no studies have described FGF21 in COPD.

We hypothesized that, because of generalized mitochondrial dysfunction, serum HN, GDF15 and FGF21 would be elevated in COPD, and would be associated with outcomes related to muscle mass and function and hence increased risk of exacerbation.

Methods

This was an observational prospective study performed in a COPD outpatient clinic in a third level hospital in Spain from November 2018 to December 2020. The study protocol is registered at ClinicalTrials.gov (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04449419>). The Ethics Committee of our Institution (2018.276) approved the study. All patients provided informed written consent to participate in this study.

Participants. We recruited patients with COPD during routine visits to the dedicated COPD outpatient clinic. Control individuals were smokers without COPD who were recruited from the smoking cessation clinics from our institution.

The inclusion criteria were as follows: (1) patients with COPD according to the GOLD Guidelines²⁸ with age above 40 years, with or without continuous oxygen therapy or (2) age and sex matched smokers without COPD.

The exclusion criteria were as follows: (1) patients with COPD exacerbation 8 weeks prior to inclusion in the study, (2) patients receiving treatment with pulmonary rehabilitation during the study or 6 months before the inclusion period, (3) patients with a previous diagnosis of coronary artery disease, heart failure, patients with respiratory diseases different from COPD, rheumatological diseases or cancer, (4) patients with C-reactive protein levels higher than 2.5 mg/dL or elevated creatine kinase levels and (5) patients with a glomerular filtration rate < 50 mL/min/1.73 m².

Measurements. We performed spirometry and 6 min walk test (6MWT) according to the Spanish Society of Pulmonology and Thoracic Surgery (SEPAR) protocol^{29,30}: patients were asked to walk as far as they can in 6 min in a 30-m straight corridor without any interruption. At the end of the test, the distance walked by the patients and dyspnea were recorded. We estimated body composition with a bioelectrical impedance device (OMROM BF511, Omrom, Japan). We measured maximum hand grip strength with a GRIP-A hand dynamometer (Takei, Niigata, Japan). The diagnosis of disease-associated malnutrition was determined according to the ESPEN consensus (BMI < 18.5 kg/m² or 18.5–22 kg/m², combined with low fat-free mass index (FFMI) (< 17 kg/m² for men and < 15 kg/m² for women)³¹. At the time of entry into the study, patients were categorized as having high risk of exacerbation (HRE) if they had two or more moderate COPD exacerbation events or one severe COPD exacerbation event, according to GOLD²⁸, during the previous year. Oxygen desaturation (OD) was defined as a fall in SpO₂ ≥ 4% or SpO₂ < 90%³². We measured serum creatinine, albumin, uric acid and creatine kinase with Siemens traceable enzymatic method assays (Atellica Analyzer, Siemens, Germany).

Serum HN, GDF15 and FGF21 levels were measured with specific sandwich immunoassays (Human Putative Humanin Peptide MT-RNR2 ELISA, CSB-EL015084HU, Cusabio Biotech, TX, USA; Thermo Fisher Scientific Human GDF-15 ELISA, EHGF15, CA; and RayBioR Human FGF-21 ELISA, ELH-FGF21, RayBiotech, GA) according to the standard protocols of the mentioned commercial kits.

We obtained early morning blood samples from all participants after they had signed the consent form to participate. Samples and data from patients included in this study were preserved by the Biobank Valdecilla (PT17/0015/0019), integrated in the Spanish Biobank Network, and were processed according to standard operating procedures with the appropriate approval of the ethical and scientific committees.

After entry into the study, patients were followed up for 12 months. We recorded moderate COPD exacerbation (exacerbation in patients treated with antibiotics and/or systemic corticosteroids) and hospitalization due to severe COPD exacerbation prospectively, on the basis of reports by the patients during follow-up visits (6 and 12 months after study entry), and the medical records from the hospital and primary care. Physicians unaffiliated with this study made the diagnosis of exacerbation and the decisions to hospitalize the patients.

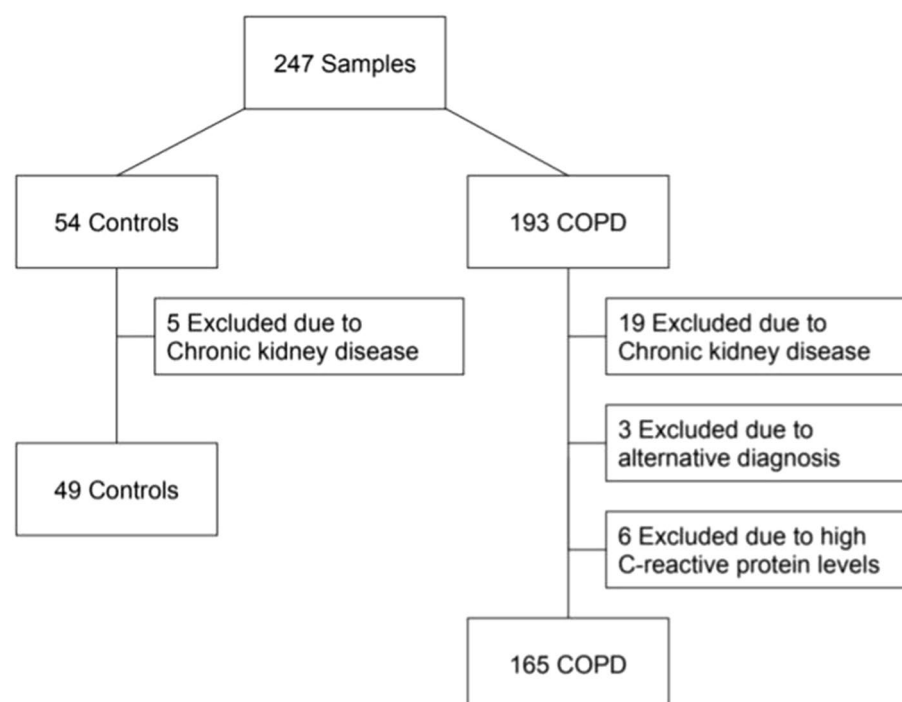


Figure 1. Flowchart for patient selection.

Statistical analysis. Data are presented as mean $\pm$ SD for normally distributed data or median (interquartile range) for nonparametric data. We calculated sample size in *Stata Statistical Software: Release 15*. College Station, TX: StataCorp LLC), with an α risk of 0.05 and a β risk of 0.2. Differences between groups were analyzed with unpaired t tests for parametric data or Mann–Whitney tests for nonparametric data. We evaluated for normal distribution with the Kolmogorov–Smirnov test. Evaluation of HN, GDF15 and FGF-21 as a dichotomized variable, with a cut-off at the median, resulted in the best discriminative power for our outcomes, returning the lowest Akaike information criterion value, in concordance with other similar studies^{33,34}. We set the cut-off point for 6MWD at 350 m, according to the BODE index². We evaluated cross-sectional associations with univariate and multivariate logistic regression, with high versus low circulating mitokines and 6MWD as the outcome variables. We used Kaplan–Meier survival analysis estimates to calculate the proportion of participants experiencing an event over time. We performed univariate and multivariate analysis with the Cox proportional risk analysis in SPSS Software version 25.00 for PC to identify risk factors associated with moderate COPD exacerbation and severe COPD exacerbation. We considered differences to be significant if the p values were less than 0.05. All reported p values are two-sided.

Statement of ethics. This study complies with internationally accepted standards for research practice and reporting. The Ethics Committee of our Institution approved the study (2018.276). All patients gave informed written consent to take part in this study.

Results

Characteristics of patients and controls. We included 165 patients and 49 sex and age matched controls in the study (Fig. 1). Table 1 shows demographic, clinical and biochemical data. The mean age of the patients was 68 ± 7.4 years, and 65.5% were men. There was a high prevalence of current smokers (29.7%), and most had moderate or severe airway obstruction. The control group had normal lung function, lower CAT and Charlson index values and higher 6 min walk distance (6MWD) than patients with COPD. No patients were treated regularly with systemic steroids. HN and GDF15 levels were higher in the COPD group (256 (60–507) pg/mL and 1244 (913–1716)), respectively, vs. controls (186 (39–338) pg/mL and 1050 (736.5–1487.5) pg/mL). FGF21 levels did not differ between patients and controls. No significant correlations between HN and GDF15, HN and FGF21, or GF15 and FGF21 concentrations were observed in the patients. Notably, we found a positive correlation between GDF-15 and HN ($p=0.015$, $r=0.355$), and between GDF-15 and FGF-21 ($p=0.049$, $r=0.289$) in the control group (data not shown).

Baseline associations of mitokines with COPD disease characteristics. Table 2 shows the associations of mitokines with COPD characteristics at baseline. Univariate logistic regression indicated that high levels of HN were associated with baseline HRE, 6MWD, malnutrition, FFMI and diabetes mellitus. In addition, multivariate logistic regression indicated that high levels of HN were independently associated with baseline High risk of exacerbation (HRE) (2 or more exacerbations during previous year or 1 previous admission) (OR 2.798,

Variable	COPD n = 165	Control group n = 49	p
Age (years)	68 ± 7.6	66.2 ± 6.34	0.116
Sex Male n (%)	108 (65.5%)	29 (59.18%)	0.498
FVC (mL)	2664 ± 810	3435 ± 971	<0.001
FVC (%)	83.3 ± 69	100 ± 19	<0.001
FEV1 (mL)	1250 (870–1725)	2610 (2030–2930)	<0.001
FEV1 (%)	52 (36.5–68)	95 (84–109)	<0.001
FEV1/FVC	50 (38.6–60.3)	75 (72–78)	<0.001
Weight (kg)	74.5 ± 16.3	75.92 ± 14	0.579
BMI (kg/m ²)	27 (24.1–31.6)	27.5 (25.2–29.76)	0.82
6MWD (m)	427 (330–490)	525 (447–572)	<0.001
Maximum hand grip strength (kg)	30 (23–38)	31 (25–41)	0.409
FFMI (kg/m ²)	18.8 ± 2.9	18.6 ± 1.5	0.802
CAT score	13 (7–19.3)	3 (1–5.25)	<0.001
Charlson	1 (1–2)	1 (0–2)	0.018
mMRC score 0/I/II/III/IV	42 (25.5)/49 (29.7)/45 (27.3)/29 (17.6)	39 (79.6)/9 (18.4)/1 (2)/0 (0)/0 (0)	<0.001
Current smokers n (%)	49 (29.7)	21 (42.9)	0.085
Patients with malnutrition n (%)	34 (20.6)	4 (8.1)	0.017
GOLD 1/2/3/4 n (%)	22 (13.3)/69 (41.8)/51 (30.9)/23 (13.9)	–	–
GOLD A/B/C/D n (%)	52 (31.5)/51 (30.9)/13 (7.9)/49 (29.7)	–	–
High risk of exacerbation n (%)	61 (37)	–	–
1 or more admissions in the previous year n (%)	31 (18.8)	–	–
ICS treatment n (%)	86 (52.1)	–	–
ACO n (%)	60 (36.3)	–	–
Diabetes mellitus n (%)	26 (15.7)	8 (16.3)	0.870
Humanin (pg/mL)	246 (69–507)	186 (39–338)	0.037
GDF-15 (pg/mL)	1244 (913–1716)	1050 (736.5–1487.5)	0.013
FGF-21 (pg/mL)	321.9 (176.85–514.05)	242.1 (136.5–396.9)	0.088
Albumin (g/dL)	4.8 ± 0.3	4.78 ± 0.27	0.695
Creatinine (mg/dL)	0.83 (0.69–0.96)	0.82(0.7–0.94)	0.975
Uric acid (mg/dL)	6.2 ± 1.88	5.8 ± 1.49	0.149
CK (UI/L)	66 (44–95)	68 (41–93)	0.910

Table 1. Demographic, clinical and biochemical characteristics of controls and COPD patients. *FVC* forced vital capacity, *FEV1* forced expiratory volume in the first second, *mMRC* modified Medical Research Council Dyspnea score, *CAT* COPD Assessment Test, *ICS* inhaled corticosteroids, *ACO* asthma COPD overlap, *GOLD* Global initiative for Chronic Obstructive Lung Disease, *BMI* Body Mass Index, *FFMI* Fat Free Mass Index, *6MWD* 6 Minute Walk Test Distance, *CRP* C-reactive protein, Bold font indicates statistical significance.

95% CI 1.266–6.187, $p = 0.011$), malnutrition (OR 6.645, 95% CI 1.859–23.749, $p = 0.004$) and 6MWD (m) (OR 0.995, 95% CI 0.991–0.999, $p = 0.008$), whereas FFMI was not.

At baseline, high levels of GDF15 were associated with age, female sex, malnutrition, 6MWD, greater prevalence of comorbidities and diabetes mellitus. In addition, multivariate logistic regression revealed that high levels of GDF15 were independently associated with female sex (OR 0.235, 95% CI 0.072–0.770, $p = 0.017$), HRE (OR 3.028, 95% CI 1.134–8.083, $p = 0.027$), 6MWD (OR 0.995, 95% CI 0.990–0.999, $p = 0.017$) and greater prevalence of comorbidities (OR 14.92, 95% CI 4.694–47.619, $p < 0.001$).

At baseline, FGF21 was not associated with any disease characteristics. However, multivariate regression indicated that high levels of FGF21 were associated with HRE (OR 2.144, 95% CI 1.000–4.600, $p = 0.05$).

Baseline mitokines as predictors of 6MWT. Forty-eight patients walked less than 350 m in the 6MWD (36 patients with high HN, 33 patients with high GDF15 and 31 patients with high FGF21). Univariate logistic regression indicated that age ($p = 0.012$), sex ($p = 0.006$), mMRC dyspnea score ($p < 0.001$), percentage of FEV1 ($p < 0.001$), HRE ($p = 0.011$), high serum HN ($p = 0.01$) and high serum GDF15 ($p = 0.003$) were predictors of low 6MWD. Otherwise, smoking status, the Charlson index value and high FGF21 levels were not predictors of low 6MWD. Multivariate logistic regression analysis indicated that age (OR 1.102, 95% CI 1.027–1.184, $p = 0.007$), female sex (OR 5.374, 95% CI 1.875–15.401, $p = 0.002$), the mMRC dyspnea score (OR 3.254, 95% CI 1.748–6.057, $p < 0.001$) and high levels of HN (OR 3.231, 95% CI 1.212–8.613, $p = 0.019$) (Table 3) were predictors of low 6MWD. With the same model, neither high GDF15 nor high FGF21 were independent predictors of low 6MWD.

A total of 62 patients presented OD (39 patients with high HN, 42 patients with high GDF15 and 38 patients with high FGF21). Univariate logistic regression indicated that the mMRC dyspnea score ($p < 0.001$) FEV1

Variable	High levels of humanin				High levels of GDF-15				High levels of FGF-21			
	Unadjusted		Adjusted		Unadjusted		Adjusted		Unadjusted		Adjusted	
	OR (95% CI)	p	OR (95% CI)	p	OR (95% CI)	p	OR (95% CI)	p	OR (95% CI)	p	OR (95% CI)	p
Age (years)	1.007 (0.967–1.048)	0.745	0.971 (0.917–1.028)	0.313	1.063 (1.019–1.11)	0.005	1.012 (0.946–1.082)	0.736	1.013 (0.971–1.056)	0.552	0.983 (0.930–1.038)	0.538
Sex												
Male	1		1		1		1		1		1	
Female	0.851 (0.447–1.619)	0.623	1.619 (0.568–4.615)	0.368	0.433 (0.224–0.837)	0.013	0.231 (0.070–0.755)	0.015	1.472 (0.756–2.869)	0.256	0.591 (0.216–1.621)	0.307
Smoking status												
Former-smoker	1		1		1		1		1		1	
Current-smoker	1.06 (0.543–2.069)	0.865	0.754 (0.326–1.746)	0.510	0.580 (0.295–1.142)	0.115	1.441 (0.531–3.912)	0.473	1.473 (0.738–2.938)	0.272	1.627 (0.728–3.635)	0.236
Exacerbation												
0–1	1		1		1		1		1		1	
>1	3.255 (1.675–6.326)	<0.001	2.945 (1.324–6.553)	0.008	1.032 (0.551–1.935)	0.921	3.028 (1.134–8.083)	0.027	1.8 (0.934–3.469)	0.079	2.197 (1.021–4.728)	0.044
Body composition												
Normal	1		1		1		1		1		1	
Obese	0.587 (0.287–1.200)	0.114	0.475 (0.178–1.269)	0.138	1.195 (0.618–2.312)	0.597	0.49 (0.151–1.586)	0.234	0.784 (0.528–2.334)	0.784	0.799 (0.296–2.152)	0.657
Malnutrition	4.015 (1.558–10.349)	0.004	6.652 (1.845–23.987)	0.004	2.319 (1.006–5.343)	0.048	3.624 (0.859–15.286)	0.080	0.728 (0.317–1.671)	0.454	0.445 (0.143–1.386)	0.163
6MWD (m)	0.996 (0.993–0.998)	0.002	0.995 (0.991–0.999)	0.009	0.995 (0.992–0.998)	<0.001	0.995 (0.990–0.999)	0.015	0.999 (0.996–1.002)	0.492	0.997 (0.994–1.001)	0.129
Charlson												
1	1				1				1		1	
2	1.171 (0.547–2.504)	0.684	1.016 (0.353–2.925)	0.977	10.495 (4.236–26.00)	<0.001	1.243 (0.347–4.456)	0.738	1.622 (0.677–3.883)	0.278	1.486 (0.550–4.013)	0.434
>2	1.756 (0.794–3.886)	0.165	0.610 (0.193–1.932)	0.401	10.833 (4.184–28.05)	<0.001	12.98 (3.69–45.454)	<0.001	1.003 (0.457–2.197)	0.995	1.814 (0.621–5.304)	0.276
FEV1 (%)	0.987 (0.972–1.001)	0.072	1.003 (0.974–1.033)	0.844	0.991 (0.977–1.006)	0.225	0.982 (0.950–1.016)	0.296	1.002 (0.987–1.017)	0.836	0.999 (0.971–1.029)	0.960
FVC (%)	0.996 (0.982–1.011)	0.604	1.015 (0.986–1.045)	0.322	0.992 (0.978–1.007)	0.3	1.015 (0.983–1.047)	0.372	1 (0.985–1.016)	0.972	1.002 (0.975–1.029)	0.877
FFMI (kg/m ²)	0.886 (0.793–0.990)	0.032	1.12 (0.897–1.397)	0.318	1.024 (0.913–1.149)	0.683	0.956 (0.742–1.232)	0.729	1.038 (0.927–1.162)	0.522	0.926 (0.733–1.157)	0.479
Diabetes mellitus	0.409 (0.173–0.968)	0.042	2.397 (0.815–7.049)	0.112	2.937 (1.211–7.123)	0.017	0.702 (0.208–2.372)	0.569	0.580 (0.230–1.46)	0.248	0.515 (0.177–1.499)	0.224

Table 2. Associations between chronic obstructive pulmonary disease characteristics and levels of humanin, GDF-15 and FGF-21 (dependent variables) using uni and multivariate logistic regression. High levels of humanin = humanin higher than median (> 246 pg/mL). High levels of GDF-15 = GDF-15 higher than the median (> 1244 pg/mL). High levels of FGF-21 = FGF-21 higher than the median (> 321.9 pg/mL). Exacerbations = Need for antibiotic or systemic corticosteroids, Malnutrition = BMI < 18.5 kg/m² or between 18.5 and 22 kg/m², combined with low FFMI (< 17 kg/m² for men and < 15 kg/m² for females, high risk of exacerbation = 2 or more exacerbations during previous year or 1 previous admission. 6MWD 6 Minute Walk Test Distance, FEV1 forced expiratory volume in the first second, FVC forced vital capacity, FFMI Fat Free Mass Index, Bold font indicates statistical significance.

(%) ($p < 0.001$), HRE ($p < 0.001$), high serum HN ($p = 0.006$) and high serum GDF15 ($p = 0.001$) were predictors of OD. Otherwise, High FGF21 levels were not predictors of OD. Multivariate logistic regression analysis indicated that the mMRC dyspnea score (OR 1.764, 95% CI 1.08–2.88, $p = 0.023$), FEV1 (%) (OR 0.957, 95% CI 0.933–0.982, $p = 0.001$), high levels of HN (OR 2.551, 95% CI 1.077–6.040, $p = 0.033$) and high levels of GDF15 (OR 3.999, 95% CI 1.487–10.757, $p = 0.006$) (Table 4) were independent predictors of low OD.

Baseline mitokines as predictors of moderate exacerbation. During the 12-month follow-up period, 93 of the 169 patients presented moderate COPD exacerbation. (57 in the high HN group, 44 in the high GDF-15 group and 35 in the high FGF21 group).

Univariate Cox proportional risk analysis indicated that high HN ($p = 0.001$), the mMRC dyspnea score ($p = 0.037$) and HRE ($p = 0.001$) were risk factors for COPD exacerbation, whereas high GDF15 or FGF21 levels were not. Multivariate Cox proportional risk analysis revealed that HRE (HR 1.842, 95% CI 1.158–2.928, $p = 0.01$) and high HN (HR 1.826, 95% CI 1.181–2.822, $p = 0.007$) were independent risk factors for moderate COPD exacerbation (Fig. 2; Table 5). With the same model, high GDF15 (HR 1.386, 95% CI 0.869–2.209, $p = 0.171$)

Variable	B	p	OR	95% CI OR	
				Lower	Upper
Age (years)	0.098	0.007	1.102	1.027	1.184
Sex (female)	−1.682	0.002	5.374	1.875	15.401
Charlson index	0.284	0.145	1.329	0.906	1.949
mMRC dyspnea score	1.180	<0.001	3.254	1.748	6.057
FEV1 (%)	−0.024	0.093	0.976	0.949	1.004
High risk of exacerbation	0.377	0.479	1.458	0.513	4.142
Current smoker	−0.537	0.327	0.585	0.200	1.709
High humanin levels	1.173	0.019	3.231	1.212	8.613
K	−8.339	0.001	<0.001		

Table 3. Logistic regression analysis showing factor associated with walking less than 350 m in 6-min walk test (dependent variable). High humanin levels = humanin higher than median. High risk of exacerbation = 2 or more exacerbations during previous year or 1 previous admission. FEV1 = forced expiratory volume in the first second.

Variable	B	Wald	p	OR	95% CI OR	
					Lower	Upper
Age (years)	0.010	0.095	0.758	1.010	0.950	1.073
Sex (female)	0.106	0.051	0.821	1.112	0.444	2.783
Charlson index	−0.141	0.636	0.425	0.868	0.614	1.229
mMRC dyspnea score	0.567	5.148	0.023	1.764	1.080	2.880
FEV1 (%)	−0.044	10.912	0.001	0.957	0.933	0.982
High risk of exacerbation	−0.567	1.546	0.214	0.567	0.232	1.386
Current smoker	−0.401	0.645	0.422	0.670	0.252	1.781
High GDF-15 levels	1.386	7.539	0.006	3.999	1.487	10.757
High humanin levels	0.936	4.533	0.033	2.551	1.077	6.040
High FGF-21 levels	−0.551	1.479	0.224	0.577	0.237	1.401
K	0.175	0.007	0.932	1.192		

Table 4. Logistic regression analysis showing predictors of oxygen desaturation in 6-min walk test (dependent variable). High GDF-15 levels = GDF-15 higher than the median (> 1244 pg/mL). High humanin levels = humanin higher than median (> 246 pg/mL). High FGF-21 levels = FGF-21 higher than the median (> 321.9 pg/mL). High risk of exacerbation = 2 or more exacerbations during previous year or 1 previous admission. FEV1 = forced expiratory volume in the first second. Oxygen desaturation (OD) was defined as $\geq 4\%$ reduction between pretest and posttest arterial oxygen saturation ($\Delta \text{SpO}_2 \geq 4\%$) and posttest $\text{SpO}_2 < 90\%$ measured by pulse oximetry.

and FGF21 (HR 0.986, 95% CI 0.640–1.518, $p = 0.948$) were not independent risk factors for moderate COPD exacerbation (data not shown).

Baseline mitokines as predictors of severe exacerbation. Twenty-nine patients were hospitalized (23 in the high HN group, 20 in the high GDF15 group and 23 in the high FGF21 group).

Univariate Cox proportional risk analysis indicated that high HN ($p = 0.001$), the mMRC dyspnea score ($p < 0.001$), the Charlson index ($p < 0.001$), FEV1 ($p = 0.001$) and previous admission for COPD exacerbation ($p < 0.001$) were risk factors for hospitalization, whereas high GDF15 levels were not. High FGF21 was not associated with the risk of COPD hospitalization ($p = 0.079$). Multivariate Cox proportional risk analysis indicated that age (HR 1.065, 95% CI 1.007–1.127, $p = 0.027$), previous admission (HR 2.759, 95% CI 1.198–6.354, $p = 0.017$), the Charlson index (HR 1.213, 95% CI 1.010–1.465, $p = 0.039$) and high HN (HR 3.445, 95% CI 1.357–8.740, $p = 0.009$) were independent risk factors for hospital admission (Fig. 3; Table 6). With the same model, high FGF21 (HR 4.217, 95% CI 1.459–12.193, $p = 0.008$) was also an independent risk factor for hospital admission (Supplemental file), whereas high GDF15 (HR 1.224, 95% CI 0.493–3.041, $p = 0.663$) was not (data not shown).

Discussion

Our study revealed several novel and important findings: First, patients with stable COPD, compared with smokers without COPD, had significantly higher serum levels of HN and GDF-15, and showed a trend toward elevated FGF21 levels. Second, the levels of these mitokines did not correlate with each other in COPD, thus suggesting that their regulation and/or metabolism are different. Finally, the mitokines were associated with outcomes in patients with COPD, although a different relationship was observed for each mitokine.

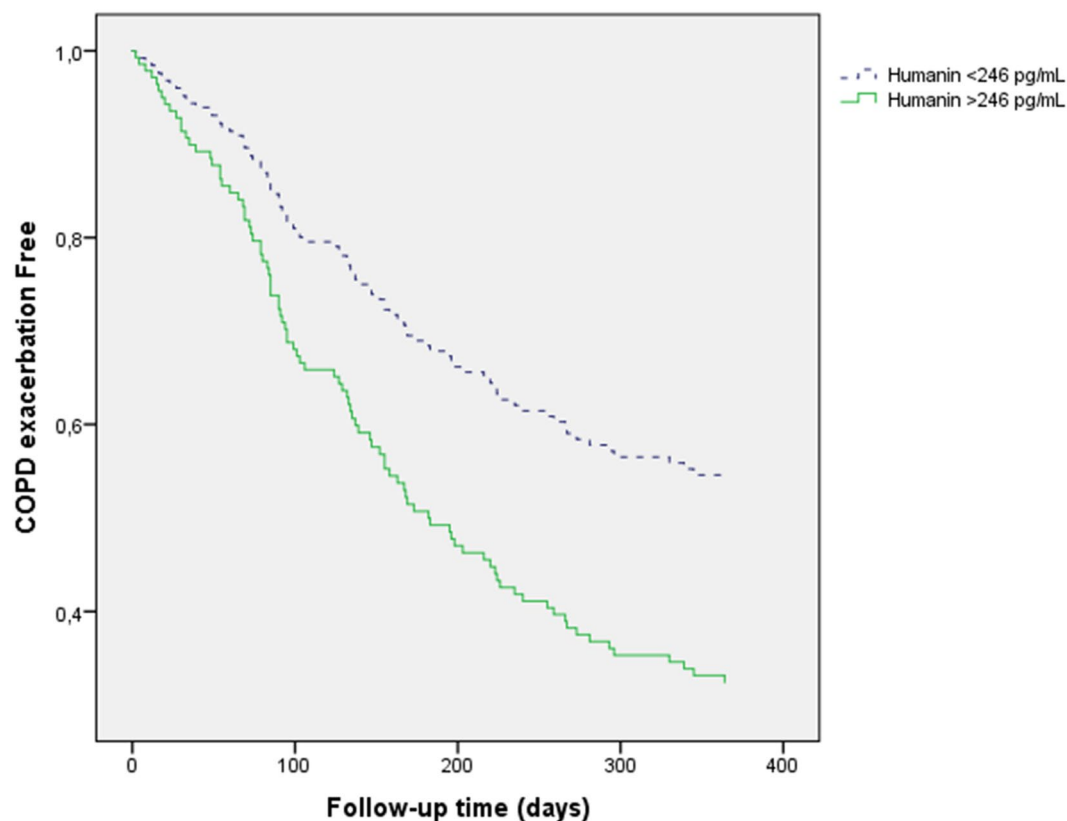


Figure 2. Serum HN levels as predictors of moderate COPD exacerbations.

Variable	B	p	HR	95% CI HR	
				Lower	Upper
Age (years)	0.029	0.054	1.029	1.000	1.059
Sex (female)	−0.260	0.257	0.771	0.492	1.209
Current smoker	−0.258	0.294	0.772	0.477	1.251
mMRC dyspnea score	0.088	0.494	1.092	0.849	1.403
Charlson index	−0.060	0.475	0.942	0.799	1.110
FEV1 (%)	<0.001	0.979	1.000	0.988	1.013
High risk of exacerbation	0.611	0.010	1.842	1.158	2.928
High HN levels	0.602	0.007	1.826	1.181	2.822

Table 5. Multivariate Cox proportional risk analysis showing predictors of moderate COPD exacerbations (dependent variable). High humanin levels = humanin higher than the median (> 246 pg/mL). High risk of exacerbation = 2 or more exacerbations during previous year or 1 previous admission. FEV1 = forced expiratory volume in the first second.

The differences among mitokines were consistent with the known metabolic characteristics of each molecule. Whereas the HN gene is under the direct control of mitochondrial DNA (and is indicative of mitochondrial stress when elevated), nuclear DNA encodes the GDF15 and FGF21 genes, and they are only partially under the control of mitochondria through mitochondrial-to-nuclear signaling (ATF3/4, etc.)³⁵. In fact, many other stimuli—such as inflammatory cytokines, hypoxia, PPAR- α ligands, carcinogens, diet, exercise, lipids and amino acids—modulate GDF15 and FGF21 through specific transcription factors^{36–38}.

HN had not previously been studied in the context of COPD. According to our data, HN is associated with malnutrition and 6MWD. Both characteristics indicate that skeletal muscle—a tissue affected by COPD that accounts for half the body weight and is rich in highly active mitochondria—is the most important source of excessive circulating HN, although immune, airway, parenchymal lung cells and pulmonary vasculature cells may also contribute. The increased levels of HN in COPD appear to be a compensatory reaction to protect mitochondria, and hence cells, against generalized oxidative stress. High HN levels indicate not only lower 6MWD but

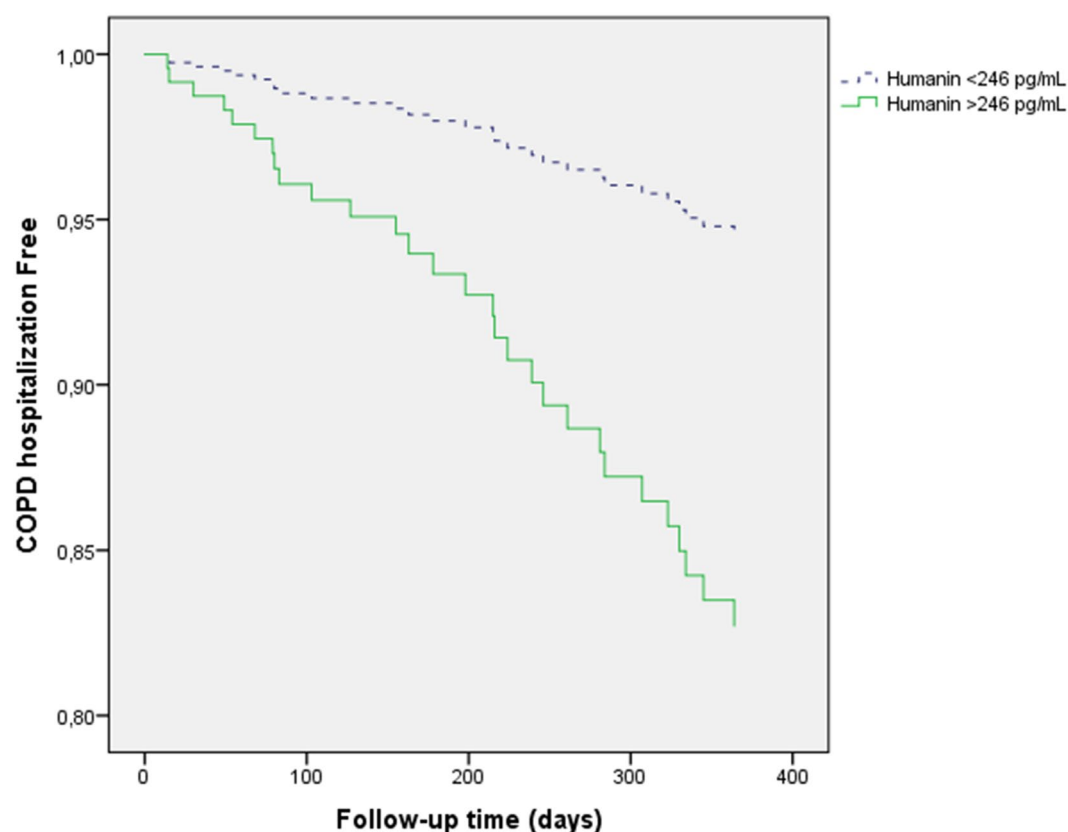


Figure 3. High serum humanin levels (higher than the median) as predictors of severe COPD exacerbations.

Variable	B	p	HR	95% CI HR	
				Lower	Upper
Age (years)	0.063	0.027	1.065	1.007	1.127
Sex (female)	−0.040	0.925	0.961	0.416	2.216
Current smoker	−0.716	0.103	0.489	0.207	1.155
mMRC dyspnea score	0.475	0.059	1.608	0.983	2.630
Charlson index	0.193	0.039	1.213	1.010	1.456
FEV1 (%)	−0.016	0.249	0.984	0.958	1.011
Previous admission	1.015	0.017	2.759	1.198	6.354
High HN levels	1.237	0.009	3.445	1.357	8.740

Table 6. Multivariate Cox proportional risk analysis showing predictors of COPD hospitalizations (dependent variable). High humanin levels = humanin higher than the median (> 246 pg/mL). Previous admission = 1 or more admission during previous year. FEV1 = forced expiratory volume in the first second.

also oxygen desaturation, thus suggesting a relationship with exercise capacity as well as ventilation/perfusion mismatch during exercise. Furthermore, mitochondrial dysfunction associated with COPD-induced low-grade inflammation may also be responsible for the increased HN levels, thus making HN an interesting prognostic biomarker that provides information on malnutrition, skeletal muscle dysfunction and chronic inflammation. In fact, our data show that high circulating HN levels are a prognostic factor for moderate and severe exacerbation in the next year.

Previous studies have shown that GDF15 is a promising, albeit unspecific, biomarker in COPD³³. GDF15 levels were initially described to be highly elevated in septic patients in critical care and have also been described to be elevated in patients with COPD^{39–42}. Our data confirmed these findings. Various explanations have been suggested regarding the factors associated with high GDF15 levels in COPD. Wu et al. and Verhamme et al.^{43,44} have demonstrated that cigarette smoke induces GDF15 in human tracheobronchial epithelial cells. Mutlu et al.⁴⁰ have suggested that generalized inflammation is a factor, because GDF15 levels correlate with levels of CRP, a well-known systemic inflammatory marker. Moreover, GDF15 levels have been found to be lower in stable patients than in patients with exacerbation in at least two studies^{39,40}. In another study, higher GDF15 levels have

been associated with higher coronary artery scores in patients with COPD, whereas no correlation has been found with common markers of COPD severity⁴⁵. The authors have proposed that high GDF15 may be mediated by asymptomatic atherosclerosis, another cause of chronic low-grade inflammation. Our data also showed that comorbidities were associated with high levels of GDF15, thus suggesting that GDF15 may be elevated in many diseases. In contrast, Patel et al. have shown that in COPD, circulating GDF15 is inversely correlated with exercise capacity⁴², but not with BMI or FFMI. Regarding the prognostic value of GDF15, the longitudinal Bergen COPD study³³ has importantly found that high concentrations of GDF15 at the time of entry into the study were associated with a higher annual exacerbation rate, mortality, and a faster decline in lung function over 3 years of follow up. In our study, the number of patients was smaller, the follow-up period was shorter, and patients with important comorbidities (heart disease, kidney failure, etc.) were excluded; therefore, our negative results might have been due to less statistical power. Nonetheless, our data suggested that high HN levels may be more specific prognostic factors than high GDF15 levels. Clearly, more studies are needed to clarify these aspects.

FGF21 had not previously been studied in COPD. FGF21 levels were higher in patients with HRE, and were predictive of hospitalization, but the strength of the association was weak, probably because of the many factors that regulate FGF21 levels, some of which are not fully known. Nonetheless, the relationship between FGF21 levels and COPD outcomes is less clear than that observed with HN herein.

Our study has several limitations. Because this was a single center study, these results should be replicated in larger multicenter studies, which should examine other sociodemographic characteristics and diseases known to alter mitokine levels. Further studies are required to demonstrate or exclude a potential role of HN, FGF21 and other “new” mitokines not studied herein⁴⁶, and to evaluate how the serum mitokine measurements change during time. We used stringent criteria to exclude patients with altered pulmonary function and other conditions known to increase mitokine levels (active exacerbation, sepsis, severe inflammation, renal insufficiency, clinical coronary artery disease, etc.); therefore, the results are not generalizable to all patients with COPD, but they add new pathophysiological information. States of low-grade inflammation and clinical asymptomatic atherosclerosis or other asymptomatic diseases were not excluded, although we do not believe that these conditions could have strongly influenced our results. However, our study reveals only associations but not causality.

The main strength of our study is that it was prospective and was specifically designed to evaluate the possible utility of measuring mitokines in a group of well characterized COPD patients differing in obstruction severity and clinical characteristics.

Conclusion

In conclusion, with a blood mitokine panel, we evaluated GDF-15 and, for the first time, HN and FGF-21 in patients with COPD. The mitokine levels were higher in COPD than in smokers without COPD, and were associated with important clinical outcomes such as exercise capacity and exacerbation. Among the mitokines, HN showed the strongest prognostic value and may serve as a future risk biomarker in this disease. Further studies are needed to confirm our findings.

Data availability

The datasets used and/or analysed during the current study available from the corresponding author on reasonable request.

Received: 14 May 2022; Accepted: 30 September 2022

Published online: 15 October 2022

References

- Lozano, R. et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* **380**(9859), 2095–2128 (2012).
- Celli, B. R. et al. The body-mass index, airflow obstruction, dyspnea, and exercise capacity index in chronic obstructive pulmonary disease. *N. Engl. J. Med.* **350**(10), 1005–1012 (2004).
- Schols, A. M. W. J., Broekhuizen, R., Weling-Scheepers, C. A. & Wouters, E. F. Body composition and mortality in chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Clin. Nutr.* **82**, 53–59 (2005).
- Soler-Cataluña, J. J., Martínez-García, M. A., Sánchez, L. S., Tordera, M. P. & Sánchez, P. R. Severe exacerbations and BODE index: Two independent risk factors for death in male COPD patients. *Respir. Med.* **103**(5), 692–699 (2009).
- Michaeloudes, C., Bhavsar, P. K., Mumby, S., Chung, K. F. & Adcock, I. M. Dealing with stress: Defective metabolic adaptation in chronic obstructive pulmonary disease pathogenesis. *Ann. Am. Thorac. Soc.* **14**, S374–S382 (2017).
- Caldeira, D. A. F., Weiss, D. J., Rocco, P. R. M., Silva, P. L. & Cruz, F. F. Mitochondria in focus: From function to therapeutic strategies in chronic lung diseases. *Front. Immunol.* **12**, 782074 (2021).
- Sharma, A., Ahmad, S., Ahmad, T., Ali, S. & Syed, M. A. Mitochondrial dynamics and mitophagy in lung disorders. *Life Sci.* **284**, 119876 (2021).
- Haji, G. et al. Mitochondrial dysfunction in airways and quadriceps muscle of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Respir. Res.* **21**, 262 (2020).
- Manevski, M. et al. Cellular stress responses and dysfunctional mitochondrial-cellular senescence, and therapeutics in chronic respiratory diseases. *Redox Biol.* **33**, 101443 (2020).
- Aghapour, M. et al. Mitochondria: At the crossroads of regulating lung epithelial cell function in chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **318**, L149–L164 (2020).
- Bachar, A. R. et al. Humanin is expressed in human vascular walls and has a cytoprotective effect against oxidized LDL-induced oxidative stress. *Cardiovasc. Res.* **88**, 360–366 (2010).
- Charununtakorn, S. T., Shinlapawittayatorn, K., Chattipakorn, S. C. & Chattipakorn, N. Potential roles of humanin on apoptosis in the heart. *Cardiovasc. Ther.* **34**, 107–114 (2016).
- Gong, Z. & Tasset, I. Humanin enhances the cellular response to stress by activation of chaperone-mediated autophagy. *Oncotarget* **9**, 10832–10833 (2018).

14. Lee, C. *et al.* The mitochondrial-derived peptide MOTS-c promotes metabolic homeostasis and reduces obesity and insulin resistance. *Cell Metab.* **21**, 443–454 (2015).
15. Yen, K., Yen, K. & Cohen, P. Humanin: A harbinger of mitochondrial-derived peptides?. *Trends Endocrinol. Metab.* **24**, 222–228 (2013).
16. Sreekumar, P. G. *et al.* The mitochondrial-derived peptide humanin protects RPE cells from oxidative stress, senescence, and mitochondrial dysfunction. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **57**, 1238–1253 (2016).
17. Yen, K., Lee, C., Mehta, H. & Cohen, P. The emerging role of the mitochondrial-derived peptide humanin in stress resistance. *J. Mol. Endocrinol.* **50**, R11–19 (2013).
18. Devosse, T. *et al.* Formyl peptide receptor-like 2 is expressed and functional in plasmacytoid dendritic cells, tissue-specific macrophage subpopulations, and eosinophils. *J. Immunol.* **182**, 4974–4984 (2009).
19. Conte, M. *et al.* Human aging and longevity are characterized by high levels of mitokines. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* **74**, 600–607 (2019).
20. Salvioli, S. *et al.* Immune system, cell senescence, aging and longevity—Inflammaging reappraised. *Curr. Pharm. Des.* **19**, 1675–1679 (2013).
21. Merdzo, I., Rutkai, I., Sure, V. N. L. R., Katakam, P. V. G. & Busija, D. W. Effects of prolonged type 2 diabetes on mitochondrial function in cerebral blood vessels. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **317**, H1086–H1092 (2019).
22. Cai, H., Liu, Y., Men, H. & Zheng, Y. Protective mechanism of humanin against oxidative stress in aging-related cardiovascular diseases. *Front. Endocrinol. (Lausanne)* **12**, 683151 (2021).
23. Bilbao-Malavé, V. *et al.* Mitochondrial dysfunction and endoplasmic reticulum stress in age related macular degeneration, role in pathophysiology, and possible new therapeutic strategies. *Antioxidants (Basel)* **10**, 1170 (2021).
24. Conte, M., Martucci, M., Chiariello, A., Franceschi, C. & Salvioli, S. Mitochondria, immunosenescence and inflammaging: A role for mitokines?. *Semin. Immunopathol.* **42**, 607–617 (2020).
25. Adela, R. & Banerjee, S. K. GDF-15 as a target and biomarker for diabetes and cardiovascular diseases: A translational prospective. *J. Diabetes Res.* **2015**, 490842 (2015).
26. Verhamme, F. M., Freeman, C. M., Brusselle, G. G., Bracke, K. R. & Curtis, J. L. GDF-15 in pulmonary and critical care medicine. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* **60**, 621–628 (2019).
27. Scholle, L. M., Lehmann, D., Deschauer, M., Kraya, T. & Zierz, S. FGF-21 as a potential biomarker for mitochondrial diseases. *Curr. Med. Chem.* **25**, 2070–2081 (2018).
28. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease (2022 Report). Global initiative for chronic obstructive lung disease (2022). <https://goldcopd.org/https://goldcopd.org/2022-gold-reports-2>. Accessed March 24, 2022.
29. Garcia-Río, F. *et al.* Spanish Society of Pulmonology and Thoracic Surgery (SEPAR). *Spirometry Arch Bronconeumol.* **49**, 388–401 (2013).
30. Barreiro, E. *et al.* Guidelines for the evaluation and treatment of muscle dysfunction in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Arch. Bronconeumol.* **51**, 384–395 (2015).
31. Cederholm, T. *et al.* Diagnostic criteria for malnutrition—An ESPEN consensus statement. *Clin. Nutr.* **34**, 335–340 (2015).
32. Casanova, C. *et al.* Distance and oxygen desaturation during the 6-min walk test as predictors of long-term mortality in patients with COPD. *Chest* **134**, 746–752 (2008).
33. Husebø, G. R. *et al.* Growth differentiation factor-15 is a predictor of important disease outcomes in patients with COPD. *Eur. Respir. J.* **49**, 1601298 (2017).
34. Kempf, T. *et al.* Prognostic utility of growth differentiation factor-15 in patients with chronic heart failure. *J. Am. Coll. Cardiol.* **50**, 1054–1060 (2007).
35. Quirós, P. M., Mottis, A. & Auwerx, J. Mitonuclear communication in homeostasis and stress. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **17**, 213–226 (2016).
36. Smati, S. *et al.* Regulation of hepatokine gene expression in response to fasting and feeding: Influence of PPAR- α and insulin-dependent signalling in hepatocytes. *Diabetes Metab.* **46**, 129–136 (2020).
37. Hill, C. M. *et al.* FGF21 and the physiological regulation of macronutrient preference. *Endocrinology* **161**, bqaa19 (2020).
38. Hathazi, D. *et al.* Metabolic shift underlies recovery in reversible infantile respiratory chain deficiency. *EMBO J.* **39**, e105364 (2020).
39. Freeman, C. M. *et al.* Acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease are associated with decreased CD4+ & CD8+ T cells and increased growth & differentiation factor-15 (GDF-15) in peripheral blood. *Respir. Res.* **16**, 94 (2015).
40. Mutlu, L. C. *et al.* Growth differentiation factor-15 is a novel biomarker predicting acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *Inflammation* **38**, 1805–1813 (2015).
41. Mueller, T., Leitner, I., Egger, M., Haltmayer, M. & Dieplinger, B. Association of the biomarkers soluble ST2, galectin-3 and growth-differentiation factor-15 with heart failure and other non-cardiac diseases. *Clin. Chim. Acta* **445**, 155–160 (2015).
42. Patel, M. S. *et al.* Growth differentiation factor-15 is associated with muscle mass in chronic obstructive pulmonary disease and promotes muscle wasting in vivo. *J. Cachexia Sarcopenia Muscle* **7**, 436–448 (2016).
43. Wu, X. *et al.* Associations of GDF-15 and GDF-15/adiponectin ratio with odds of type 2 diabetes in the Chinese population. *Endocrine* **72**, 423–436 (2021).
44. Verhamme, F. M. *et al.* Elevated GDF-15 contributes to pulmonary inflammation upon cigarette smoke exposure. *Mucosal Immunol.* **10**, 1400–1411 (2017).
45. Martinez, C. H. *et al.* GDF-15 plasma levels in chronic obstructive pulmonary disease are associated with subclinical coronary artery disease. *Respir. Res.* **18**, 42 (2017).
46. Cha, Y. S., Chang, J. S., Kim, H. & Park, K. S. Application of mitochondrial and oxidative stress biomarkers in the evaluation of neurocognitive prognosis following acute carbon monoxide poisoning. *Metabolites* **12**, 201 (2022).

Acknowledgements

We want to particularly acknowledge the patients and the Biobank Valdecilla (PT17/0015/0019) integrated in the Spanish Biobank Network for its collaboration.

Author contributions

Guarantor of the paper: C.A.A. Conceptualization: C.A.A., M.G.U. Data curation: P.M., C.A.A., P.M.A. Formal analysis: P.M., C.A.A. Project administration: C.A.A., P.M. Methodology: C.A.A., M.G.U., P.M.A., A.B. Resources: J.A., C.A.A., M.G.U., A.B. Visualization: J.A., C.A.A. Supervision: M.G.U., P.M.A. Software: P.M. Writing—original draft: C.A.A., C.C. Writing—review and editing: C.A.A., P.M.A., A.B., B.A.L., A.R.G., P.M., C.C.

Funding

This study was funded by Instituto de investigación sanitaria of Cantabria (IDIVAL): NextVAL grant: NVAL19/01 and GSK (NCT04449419). GSK was provided the opportunity to review a preliminary version of this manuscript for factual accuracy, but the authors are solely responsible for final content and interpretation.

Competing interests

Partially funded by GlaxoSmithKline. Carlos Amado has received speaker or consulting fees from Boehringer Ingelheim, Pfizer, AstraZeneca, Novartis, Chiesi, Faes Farma, Esteve and GlaxoSmithKline. Ciro Casanova has received speaker or consulting fees from AstraZeneca, Bial, Boehringer Ingelheim, Chiesi, GlaxoSmithKline, Menarini, Novartis, and research grants from GlaxoSmithKline, Menarini and AstraZeneca. The rest of the authors do not have any conflict of interest.

Additional information

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41598-022-21757-5>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to C.A.A.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2022



OPEN ACCESS

EDITED BY
Amany F. Elbehairy,
Alexandria University, Egypt

REVIEWED BY
Rasha Saleh,
University of East Anglia, United Kingdom
Erica Bazzan,
University Hospital of Padua, Italy

*CORRESPONDENCE
Carlos A. Amado
✉ carlosantonio.amado@scsalud.es

SPECIALTY SECTION
This article was submitted to
Pulmonary Medicine,
a section of the journal
Frontiers in Medicine

RECEIVED 16 November 2022
ACCEPTED 23 January 2023
PUBLISHED 08 February 2023

CITATION
Amado CA, Martín-Audera P, Agüero J,
Lavín BA, Guerra AR, Boucle D,
Ferrer-Pargada D, Berja A, Martín F, Casanova C
and García-Unzueta M (2023) Circulating levels
of mitochondrial oxidative stress-related
peptides MOTS-c and Romo1 in stable COPD:
A cross-sectional study.
Front. Med. 10:1100211.
doi: 10.3389/fmed.2023.1100211

COPYRIGHT
© 2023 Amado, Martín-Audera, Agüero, Lavín,
Guerra, Boucle, Ferrer-Pargada, Berja, Martín,
Casanova and García-Unzueta. This is an
open-access article distributed under the terms
of the [Creative Commons Attribution License \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use, distribution or reproduction
in other forums is permitted, provided the
original author(s) and the copyright owner(s)
are credited and that the original publication in
this journal is cited, in accordance with
accepted academic practice. No use,
distribution or reproduction is permitted which
does not comply with these terms.

Circulating levels of mitochondrial oxidative stress-related peptides MOTS-c and Romo1 in stable COPD: A cross-sectional study

Carlos A. Amado^{1,2,3*}, Paula Martín-Audera⁴, Juan Agüero¹,
Bernardo A. Lavín⁴, Armando R. Guerra⁴, Daymara Boucle²,
Diego Ferrer-Pargada¹, Ana Berja⁴, Fernando Martín⁵,
Ciro Casanova⁶ and Mayte García-Unzueta^{2,4}

¹Department of Pulmonology, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander, Spain, ²University of Cantabria, Santander, Spain, ³IDIVAL (Instituto de Investigación Biomédica de Cantabria), Santander, Spain, ⁴Department of Clinical Biochemistry, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander, Spain, ⁵Unidad de Deshabitación Tabáquica (UDESTA), Servicio Cántabro de Salud, Santander, Spain, ⁶Servicio de Neumología-Unidad de Investigación, Hospital Universitario La Candelaria, Universidad de La Laguna, San Cristóbal de La Laguna, Spain

Background: MOTS-c and Romo1 are mitochondrial peptides that are modulated by oxidative stress. No previous studies have explored circulating levels of MOTS-c in patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD).

Methods: We enrolled 142 patients with stable COPD and 47 smokers with normal lung function in an observational cross-sectional study. We assessed serum levels of both MOTS-c and Romo1 and associated these findings with clinical characteristics of COPD.

Results: Compared with smokers with normal lung function, patients with COPD had lower levels of MOTS-c ($p = 0.02$) and higher levels of Romo1 ($p = 0.01$). A multivariate logistic regression analysis revealed that above-median MOTS-c levels were positively associated with Romo1 levels (OR 1.075, 95% CI 1.005–1.150, $p = 0.036$), but no association was found with other COPD characteristics. Below-median levels of circulating MOTS-c were associated with oxygen desaturation (OR 3.25 95% CI 1.456–8.522, $p = 0.005$) and walking <350 meters (OR 3.246 95% CI 1.229–8.577, $p = 0.018$) in six-minute walk test. Above-median levels of Romo1 were positively associated with current smoking (OR 2.756, 95% CI 1.133–6.704, $p = 0.025$) and negatively associated with baseline oxygen saturation (OR 0.776 95% CI 0.641–0.939, $p = 0.009$).

Conclusions: Reduced levels of circulating MOTS-c and increased levels of Romo1 were detected in patients diagnosed with COPD. Low levels of MOTS-c were associated with oxygen desaturation and poorer exercise capacity using 6 min walk test. Romo1 was associated with current smoking and baseline oxygen saturation.

Trial registration: www.clinicaltrials.gov; No.: NCT04449419; URL: www.clinicaltrials.gov. Date of registration: June 26, 2020.

KEYWORDS

COPD, MOTS-c, Romo1, exercise capacity, oxidative stress

Introduction

Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) is one of the leading causes of mortality worldwide (1). Oxidative stress (OS) is one of the most important factors contributing to the pathogenesis and severity of COPD (2, 3). COPD is a heterogeneous disease with several potentially treatable traits that have been associated with disease prognosis (4) including muscle weakness (5), reduced exercise capacity (6), and increased oxygen desaturation (OD) during exercise (7). While several biomarkers of OS have been evaluated in COPD (8, 9), none are evaluated on a routine basis.

Mitochondrial open reading frame of the 12S ribosomal RNA type-c (MOTS-c) is a recently discovered micropeptide encoded by the mitochondrial genome. MOTS-c is produced primarily in mitochondria-rich tissues, including skeletal muscle (10). MOTS-c has also been detected in peripheral blood and has thus been tentatively identified as a circulating myomitokine (11). While circulating MOTS-c penetrates target cells rapidly, its mechanism of entry remains unknown (11). Receptors for the hormonal mitokine, humanin, have already been described; by contrast, no receptors have been identified that interact specifically with MOTS-c. *In vitro*, MOTS-c is detected primarily in the mitochondria; production is induced in response to glucose restriction (10) or OS (12). MOTS-c activates sarcoplasmic adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) and is then translocated to the nucleus, where it binds to antioxidant response element sequences in the promoter regions of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (NRF2) and other transcription factors, thereby modulating target gene activity (12). Results of recent research reveal that circulating levels of MOTS-c increase with acute intense exercise but decline in association with increasing age as well as obesity, coronary disease, diabetes mellitus, and kidney failure (13).

Reactive oxygen species modulator 1 (Romo1) is a redox-sensitive protein located in the inner mitochondrial membrane that regulates the integrity of mitochondrial cristae and mitochondrial shape under conditions of OS (14). Of note, defective cristae, abnormal branches, and swollen and fragmented organelles are frequently observed in respiratory epithelial cells isolated from COPD patients (3).

To the best of our knowledge, there are no previously published studies that document serum MOTS-c levels in patients diagnosed with COPD or smokers without COPD. On the other hand, the results of one small study documented higher serum Romo1 levels in COPD patients ($n = 49$) compared to healthy volunteers not matched by smoking status ($n = 39$) and a negative correlation between Romo1 levels and forced expiratory volume in the first second (FEV1) (%), but exercise capacity was not evaluated (15). Although MOTS-c and Romo1 are mitochondrial peptides, and are associated with chronic diseases, they have not been measured together before.

We hypothesized that, because of low exercise capacity and high OS characteristic of COPD, serum levels of both MOTS-c and Romo1 would be altered. We also hypothesized that circulating levels might be associated with specific outcomes of this disease, for example, exercise capacity.

Methods

An observational cross-sectional study of patients receiving care at a COPD outpatient clinic in Spain was performed from November 2018 to December 2020. The study was reviewed and approved by the ethics committee of our institution (CEIm of Cantabria; 2018.276). Written informed consent was provided by all patients before entering the study. The study protocol was registered at www.clinicaltrials.gov (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04449419>).

Participants

Participants were recruited at a dedicated COPD outpatient clinic during routine visits. Smokers without COPD (control group) were recruited from the smoking cessation clinics held at our institution.

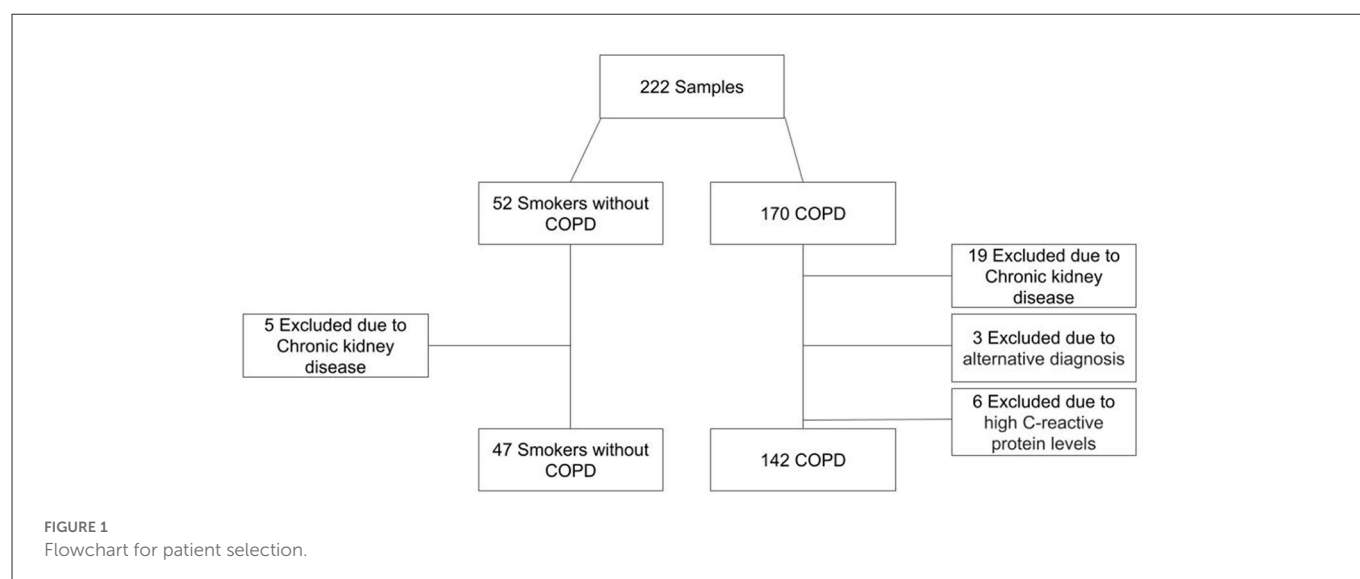
The inclusion criteria were as follows: (i) patients diagnosed with COPD based on the Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) guidelines (16) who were >40 years of age and (ii) sex, age, and smoking status- matched control patients who had not been diagnosed with COPD.

The exclusion criteria were as follows: (i) patients who experienced a COPD exacerbation within 8 weeks of inclusion in the study; (ii) patients undergoing pulmonary rehabilitation during or up to 6 months before inclusion in the study; (iii) patients previously diagnosed with coronary or peripheral artery disease or cancer; (iv) patients with respiratory diseases different from COPD; (v) patients with serum C-reactive protein levels > 2.5 mg/dL; and (vi) patients with a glomerular filtration rate < 50 ml/min/1.73 m²; (vii) patients using systemic corticosteroids within 8 weeks of inclusion in the study.

Measurements

Body composition estimates were obtained using a bioelectrical impedance device (OMRON BF511, Omron, Japan). Spirometry and a six-minute walk test (6MWT) were performed according to the Spanish Society of Pneumology and Thoracic Surgery (SEPAR) protocol (17, 18). Maximum hand grip strength was measured with a GRIP-A hand dynamometer (Takei, Niigata, Japan). Disease-associated malnutrition was determined based on the European Society for Clinical Nutrition and Metabolism (ESPEN) consensus guidelines, including body mass index (BMI) <18.5 kg/m² or 18.5–22 kg/m², combined with a low fat-free mass index (FFMI) at <17 kg/m² for men and <15 kg/m² for women (19). Participants were categorized as having a high risk of exacerbation (HRE) at the time of entry into the study if they had two or more moderate or one severe

Abbreviations: COPD, chronic obstructive pulmonary disease; MOTS-c, mitochondrial open reading frame of the 12S ribosomal RNA type-c; Romo1, reactive oxygen species modulator 1; 6MWD, six-minute walk distance; 6MWT, six-minute walk test; OD, oxygen desaturation; OS, oxidative stress; SEPAR, Spanish Society of Pneumology and Thoracic Surgery; BMI, body mass index; FFMI, fat-free mass index; HRE, high risk of exacerbation.



COPD exacerbation during the previous year as per GOLD guidelines (17). Oxygen desaturation (OD) was defined as a fall in oxygen saturation (SpO_2) $\geq 4\%$ or an overall $\text{SpO}_2 < 90\%$ (20). Serum creatinine, albumin, uric acid, and creatine kinase levels were measured with IDMS-traceable enzymatic assays (Atellica[®] Analyzer, Siemens, Germany).

Serum levels of MOTS-c were determined using sandwich immunoassay (Mitochondrial Open Reading Frame of the 12S rRNA-c: MOTS-c kit, CEX132Hu, Katy, Cloud-Clone Corp., TX, USA Lot number L210213153). Serum levels of Romo1 were determined using sandwich immunoassay (Reactive oxygen species modulator 1 (Human ROMO1) ELISA Kit, Elabscience[®], TX, USA Lot number ET4ZB9UKKQ) as per the manufacturers' protocols.

Blood from each participant was collected early in the morning to avoid any confusion that might result from circadian changes in MOTS-c and ROMO-1 levels. Samples and patient data were preserved by Biobanco Valdecilla (PT17/0015/0019), integrated into the Spanish Biobank Network, and processed according to standard operating procedures with approval from both ethical and scientific committees.

Statistical analysis

Normally distributed data are presented as means $\pm$ standard deviations (SDs). Non-parametric data are presented as medians with interquartile ranges. We calculated the sample size in *Stata Statistical Software: Release 15*. College Station, TX: StataCorp LLC) based on an α risk of 0.05 and a β risk of 0.2. Differences between groups were evaluated with unpaired *t*-tests (for parametric data) or Mann-Whitney tests (for non-parametric data). Normal distribution was determined using the Kolmogorov-Smirnov test. The creation of a dichotomized variable from MOTS-c and Romo1

levels with a cut-off at the median value resulted in the highest discriminative power for the outcomes under study as it resulted in the lowest Akaike information criterion value, similar to that observed in other studies (21, 22). We determined cross-sectional associations by univariate and multivariate logistic regression based on high (i.e., above the median) vs. low (i.e., below the median) values of baseline circulating MOTS-c and Romo1 with baseline characteristics of the patients. Using a similar model, we evaluated the primary outcomes of the study: baseline oxygen saturation, and two outcomes of the 6MWT [6 min walking distance (6MWD) and oxygen desaturation (OD)] using SPSS Software version 25.00 for PC. All *p*-values resulted from two-tailed tests with *p* < 0.05 as statistically significant.

Results

Characteristics of patients and controls

One hundred and forty-two COPD patients and forty-seven sex and age-matched controls (i.e., smokers who were not diagnosed with COPD) were enrolled in our study (Figure 1). Table 1 includes demographic, clinical, and biochemical data. The patient population was 66.2% men with a mean age of 67.5 ± 7.7 years. The COPD patient cohort included a substantial percentage of current smokers (30.6%); most had moderate to severe airway obstruction. The participants included in the control group had normal lung function, lower scores on COPD assessment tests (CATs), and were capable of longer six-minute walk distances (6MWD) than the COPD patients. As shown in Table 1 the percentage of current smokers was similar in COPD and control groups. The prevalence of type 2 diabetes mellitus (T2DM) which is a well-established cause of reductions in serum MOTS-c levels was similar in both groups (*p* = 0.842). Among our findings, MOTS-c levels were lower in the COPD group [median 622 ng/mL; interquartile range (IQR) 482–848 ng/mL] compared to controls (median 764 ng/mL; IQR

TABLE 1 Demographic, clinical, and biochemical characteristics of control (smokers without COPD) and COPD patients.

Variable	COPD <i>n</i> = 142	Smokers without COPD <i>n</i> = 47	<i>p</i>
Age (years)	67.5 ± 7.7	65.6 ± 6.8	0.113
Sex Male <i>n</i> (%)	94 (66.2%)	31 (62.0%)	0.592
FVC (mL)	2,723 ± 814	3,429 ± 861	<0.001
FVC (%)	83 ± 20	102 ± 18	<0.001
FEV ₁ (mL)	1,285 (900–1820)	2,635 (2072–3002)	<0.001
FEV ₁ (%)	52 (37–68)	98 (86–111)	<0.001
FEV ₁ /FVC	49 (39–60)	75 (72–79)	<0.001
Weight (Kg)	74.7 ± 16.2	74.3 ± 14.8	0.830
BMI (Kg/m ²)	27 (24.1–31.6)	27.3 (25.1–29.8)	0.810
6MWD (m)	445 (355–495)	525 (448–578)	<0.001
Maximum hand grip strength (Kg)	31 (24–40)	33 (23–40)	0.667
FFMI (Kg/m ²)	18.9 ± 2.7	19.2 ± 2.4	0.166
CAT score	12 (7–18)	3 (1–5)	<0.001
Charlson	1 (1–2)	1 (0–2)	0.092
mMRC score 0/I/II/III/IV	39 (27.5)/43 (30.3)/38 (26.8)/22 (15.5)	38 (80.8)/8 (17.0)/1 (2.1)/0 (0) /0 (0)	<0.001
Current smokers <i>n</i> (%)	43 (30.6)	22 (46.8)	0.059
Pack-years	41 (21–56)	40 (20–45)	0.098
Patients with malnutri-tion <i>n</i> (%)	36 (25.4)	4 (8.5)	0.018
GOLD 1/2/3/4 <i>n</i> (%)	19 (13.4)/59 (41.5)/47 (33.1)/17 (12.0)	–	–
GOLD A/B/C/D <i>n</i> (%)	49 (34.5)/39 (27.5)/13 (9.2)/41 (28.9)	–	–
High risk of exacerba-tion <i>n</i> (%)	56 (39.4)	–	–
ICS treatment <i>n</i> (%)	71 (50.0)	–	–
Diabetes Mellitus <i>n</i> (%)	26 (18.3%)	8 (17.0%)	0.842
MOTS-c (ng/mL)	622 (482–848)	764 (604–906)	0.022
Romo-1 (ng/mL)	5.42 (2.84–8.72)	3.72 (1.64–7.59)	0.038
Albumin (g/dL)	4.80 ± 0.31	4.83 ± 0.28	0.681
Creatinine (mg/dL)	0.82 (0.70–0.96)	0.87 (0.71–0.98)	0.528
Uric acid (mg/dL)	6.19 ± 1.73	5.98 ± 1.38	0.464
CK (UI/L)	65 (45–95)	64 (41–113)	0.785

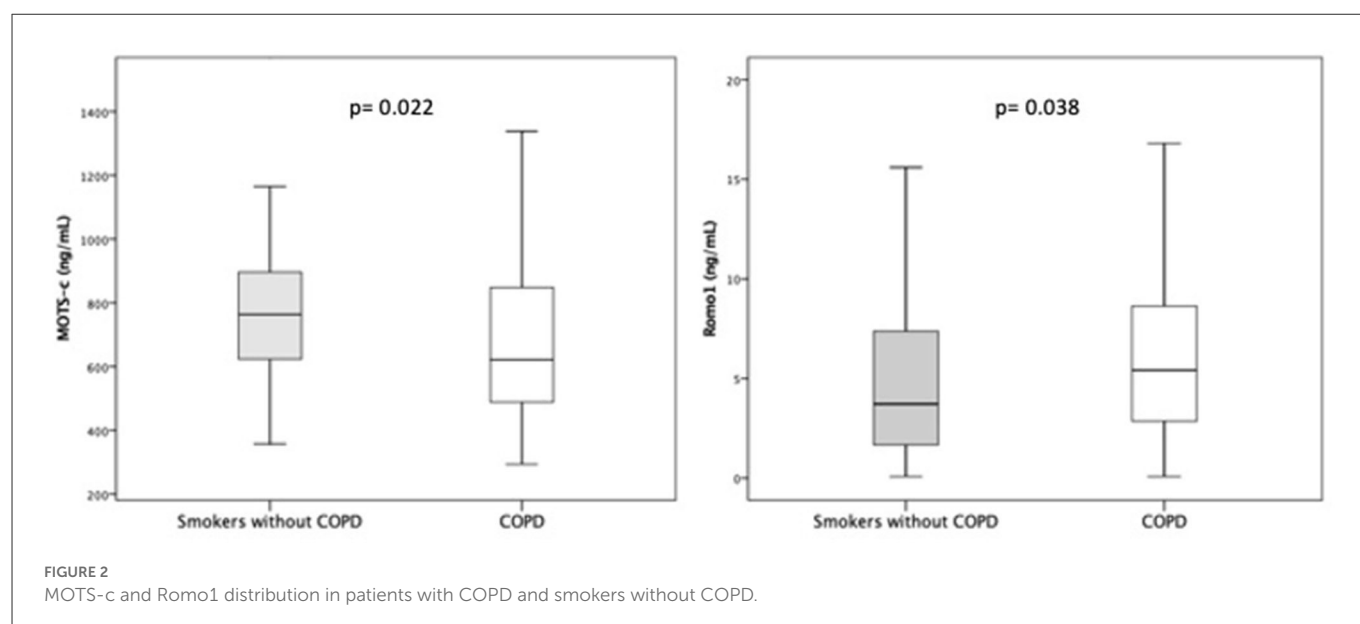
FVC, Forced Vital Capacity; FEV₁, Forced expiratory Volume in the first second; mMRC, modified Medical Research Council Dyspnea score; CAT, COPD Assessment Test; ICS, Inhaled Corticosteroids; GOLD, Global initiative for Chronic Obstructive Lung Disease; BMI, Body Mass Index; FFMI, Fat Free Mass Index; 6MWD, 6- Minute Walking Distance; Bold font indicates statistical significance.

604–906 ng/mL; *p* = 0.022) (Figure 2). Our findings revealed no significant differences between serum levels of MOTs-c detected in patients with COPD either with (median 681 ng/mL, IQR 452–1150 ng/mL) or without T2DM (median 688 ng/mL, IQR 504–924 ng/mL; *p* = 0.853). Furthermore, serum levels of MOTs-c did not correlate with hemoglobin A1c (*r* = 0.165, *p* = 0.649) in patients with T2DM; thus, all COPD patients were evaluated as a single group.

Serum levels of Romo1 were higher among those in the COPD group (median 5.42 ng/mL, IQR 2.84–8.72 ng/mL) vs. controls (median 3.72 ng/mL, IQR 1.64–7.59 ng/mL, *p* = 0.038) (Figure 2).

Association of circulating levels of MOTs-c and Romo1 with baseline characteristics of COPD

Table 2 highlights the associations of MOTs-c and Romo1 with baseline characteristics of COPD and between both peptides. Multivariate logistic regression analysis showed that high levels of MOTs-c were positively associated with Romo1 levels (OR 1.075, 95% CI 1.005–1.150, *p* = 0.036), but no association was found with other COPD characteristics. On the other hand, multivariate logistic regression analysis confirmed that high levels of Romo1



were independently and positively associated with current smoking (OR 2.756, 95% CI 1.133–6.704, $p = 0.025$) and circulating MOTS-c levels (OR 1.001, 95% CI 1.000–1.003, $p = 0.012$) (Table 2).

Low MOTS-c and high Romo1 levels as predictors of basal oxygen saturation, distance and oxygen desaturation in 6MWT

Forty-eight patients with COPD presented with Oxygen desaturation (OD). Among these, 33 exhibited low MOTS-c levels and 23 patients exhibited high Romo1 levels. Thirty-five patients walked <350m during the 6MWT; this included 25 patients with low MOTS-c levels and 14 patients with high Romo1 levels. Multivariate logistic regression (Table 3) showed that low MOTS levels were significantly associated with OD (OR 3.25 95% CI 1.456–8.522, $p = 0.005$) and walking <350 meters (OR 3.246 95% CI 1.229–8.577, $p = 0.018$), but not with baseline O_2 levels. On the other hand, high Romo 1 levels were negatively associated with baseline O_2 levels (OR 0.776 95% CI 0.641–0.939, $p = 0.009$), but not with OD or walking < 350 m (Table 4).

Discussion

The results of our study provide the first evidence that circulating levels of MOTS-c are lower in patients with COPD compared with otherwise healthy current smokers; by contrast, circulating levels of Romo1 were higher in patients with COPD. MOTS-c and Romo1 were associated with different COPD characteristics; low circulating MOTS-c levels were associated with worse 6MWD and oxygen desaturation; by contrast, high circulating levels of Romo1 were associated with active smoking and lower baseline levels of oxygen saturation.

Interestingly we found a positive association between Romo1 and MOTS-c.

Circulating MOTS-c levels were reduced in COPD patients. Similar responses have been observed in other chronic diseases associated with OS, including T2DM (23), obesity with or without obstructive sleep apnea syndrome (24, 25), endothelial dysfunction/coronary artery disease (26), kidney failure (27), and multiple sclerosis (28). Interestingly, concomitant T2DM resulted in no further reductions in circulating MOTS-c levels compared to patients with COPD alone; these results suggest that the effects of these two diseases on MOTS-c levels are not additive. Low MOTS-c levels, as happens with “low T3 sick euthyroid syndrome”, may be a generalized non-specific response to many illnesses (29).

Reductions in circulating MOTS-c levels may result from mitochondrial damage. Alternatively, OS may induce profound sequestration of MOTS-c in the nucleus, thereby blocking its transfer into the peripheral circulation (12). Given that low levels of circulating MOTS-c have been reported in numerous diseases associated with OS, the second explanation may be the more likely of the two.

Lower levels of circulating MOTS-c were associated with shorter distances walked in the 6MWT, specifically with walking < 350 m, a parameter that is associated with the risk of death in COPD (6) and more profound OD. Exercise induces MOTS-c synthesis in healthy individuals (13, 30); MOTS-c in turn activates the synthesis of other enzymes (such as AMP-activated protein kinase) known to be induced by exercise (11, 31). On the other hand, it has been reported recently that MOTS-c promotes muscle differentiation of muscle progenitor cells (32). Thus, it is reasonable to hypothesize that individuals who are unable to induce MOTS-c synthesis will exhibit a comparatively low exercise capacity. One recent study evaluated the relationship between oxidative biomarkers associated with stable COPD and their role in exercise, identifying superoxide dismutase (SOD) as an independent determinant of performance in the 6MWT (33).

Our study shows that patients diagnosed with COPD have higher circulating levels of Romo1. This finding was also suggested

TABLE 2 Univariate and multivariate logistic regression analysis for the associations between baseline chronic obstructive pulmonary disease characteristics and high levels of MOTs-c and Romo1.

		High MOTs-c				High Romo-1			
		Univariate		Multivariate		Univariate		Multivariate	
		OR (95% CI)	<i>p</i>	OR (95% CI)	<i>p</i>	OR (95% CI)	<i>p</i>	OR (95% CI)	<i>p</i>
Age (years)		0.994 (0.952–1.037)	0.777	0.979 (0.931–1.030)	0.412	0.980 (0.937–1.024)	0.361	0.988 (0.937–1.041)	0.648
Sex									
	Male	1		1		1		1	
	Female	1.660 (0.822–3.353)	0.157	0.436 (0.187–1.020)	0.065	0.880 (0.430–1.799)	0.726	1.553 (0.673–3.588)	0.302
Smoking status									
	Former-smoker	1		1		1		1	
	Current-smoker	1.222 (0.596–2.503)	0.584	1.093 (0.469–2.545)	0.837	2.411 (1.119–5.195)	0.025	2.756 (1.133–6.704)	0.025
Exacerbation									
	0	1		1		1		1	
	≥ 1	1.404 (0.725–2.719)	0.314	2.200 (0.932–5.193)	0.072	0.812 (0.408–1.617)	0.554	0.739 (0.315–1.734)	0.487
Charlson									
	1	1		1		1		1	
	2	0.743 (0.273–2.021)	0.561	0.992 (0.317–3.105)	0.989	0.726 (0.252–2.092)	0.554	0.767 (0.242–2.445)	0.656
	>2	1.479 (0.635–3.445)	0.364	2.331 (0.772–7.042)	0.133	0.444 (0.180–1.095)	0.078	0.328 (0.107–1.010)	0.052
FEV1 (%)		1.003 (0.987–1.019)	0.735	0.994 (0.963–1.025)	0.685	1.006 (0.989–1.023)	0.501	0.990 (0.960–1.020)	0.506
FVC (%)		1.007 (0.991–1.024)	0.400	1.017 (0.986–1.048)	0.282	1.008 (0.990–1.025)	0.387	1.022 (0.992–1.052)	0.158
Romo1 /MOTS-c (ng/mL)		1.050 (0.990–1.114)	0.104	1.075 (1.005–1.150)	0.036	1.001 (1.000–1.002)	0.031	1.001 (1.000–1.003)	0.012
Diabetes Mellitus		0.228 (0.353–1.943)	0.665	1.095 (0.377–3.184)	0.867	0.420 (0.167–1.057)	0.066	0.554 (0.184–1.671)	0.294

High MOTs-c levels ≥ 622 ng/mL; High Romo1 levels > 5.42 ng/mL; Exacerbation, Need for antibiotic or systemic corticosteroids; FEV1, Forced expiratory Volume in the first second; FVC, Forced Vital Capacity; Bold font indicates statistical significance.

previously in a cross-sectional study that included a small population of COPD patients (15). The results of our study reveal for the first time an important association between high circulating levels of Romo1 with current smoking and reduced oxygen saturation (i.e., factors intrinsically associated with oxidative stress), although no relationship with exercise capacity. Our data revealed a positive (albeit weak) association between high circulating levels of MOTs-c and Romo1. This relationship that has not been described

previously, warrants further research and contrasts with the fact that low MOTs-c is associated with worse outcomes related with exercise capacity but high Romo1 is associated with low oxygen saturation, suggesting that each molecule relates to different characteristics of COPD. In a different model of respiratory disease, Ye et al. (34) have recently reported that serum Romo1 and ROS were increased in patients with obstructive sleep apnea syndrome.

TABLE 3 Multivariate logistic regression analysis showing factors associated with baseline low MOTS-c.

	<i>B</i>	Wald	<i>p</i>	OR	95% CI OR	
					Lower	Upper
Baseline SatO ₂	−0.063	0.694	0.405	0.939	0.810	1.089
Oxygen Desaturation	1.259	7.806	0.005	3.523	1.456	8.522
6MWD < 350 meters	1.178	5.643	0.018	3.246	1.229	8.577

Low MOTS-c levels < 622 ng/mL; All variables adjusted by Age, Sex, Charlson Index, High risk of exacerbation (2 or more exacerbations during previous year or 1 previous admission), FEV1, Forced Expiratory Volume in the first second, smoking status. Oxygen desaturation was defined as $\geq 4\%$ reduction between pretest and posttest arterial oxygen saturation ($\Delta \text{SpO}_2 \geq 4\%$) and posttest $\text{SpO}_2 < 90\%$ measured by pulse oximetry. 6MWD, 6-Minute Walking Distance. Bold font indicates statistical significance.

TABLE 4 Logistic regression analysis showing factors associated with baseline high Romo1.

	<i>B</i>	Wald	<i>p</i>	OR	95% CI OR	
					Lower	Upper
Baseline SatO ₂	−0.254	6.800	0.009	0.776	0.641	0.939
Oxygen desaturation	0.064	0.018	0.892	1.066	0.425	2.673
6MWD < 350 meters	−0.311	0.353	0.552	0.733	0.263	2.043

High Romo1 levels > 5.42 ng/mL; All variables adjusted by Age, Sex, Charlson Index, High risk of exacerbation (2 or more exacerbations during previous year or 1 previous admission), FEV1, Forced expiratory Volume in the first second, Smoking status. Oxygen desaturation (OD) was defined as $\geq 4\%$ reduction between pretest and posttest arterial oxygen saturation ($\Delta \text{SpO}_2 \geq 4\%$) and posttest $\text{SpO}_2 < 90\%$ measured by pulse oximetry. 6MWD, 6-Minute Walking Distance. Bold font indicates statistical significance.

Several of the strengths of this study are worth highlighting. First, this study was designed specifically to evaluate the impact of COPD on circulating levels of MOTS-c and Romo1 in a group of carefully selected and well-characterized patients without comorbidities (other than T2DM and asymptomatic coronary diseases) that might influence the results and a matched for current smoking control group of smokers without COPD (in order to avoid smoking as a potential confounding factor). Second, we considered a variety of factors and clinical characteristics of COPD that might have an impact on circulating levels of MOTS-c and Romo1.

Our study has several limitations. Most importantly, this type of study reveals associations but not causality. Any assessments of causality will require specifically designed *In vitro* and *in vivo* experimental studies. Furthermore, largely because of the complex pathophysiology of mitochondrial dysfunction and oxidative stress, a full understanding of this phenomenon will require consideration of a large collection of markers. Finally, our patient cohort was enrolled from a single center. Thus, these findings will need to be replicated in large multicenter trials with patients from a large range of socio-demographic settings and who exhibit a variety of comorbidities that might influence the results.

Conclusion

Our study provides the first evidence of reductions in circulating levels of MOTS-c levels in patients diagnosed with COPD, lower MOTS-c is associated with lower 6MWD and higher rate of oxygen desaturation. Our study also revealed increases in levels of Romo1 in COPD patients that are associated with current smoking and baseline oxygen saturation but are not associated with 6MWD or oxygen desaturation in 6MWT. Further studies will be needed to confirm our findings which will open new perspectives in the multidimensional management of COPD.

Data availability statement

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

Ethics statement

The studies involving human participants were reviewed and approved by the Ceim of Cantabria. The patients/participants provided their written informed consent to participate in this study.

Author contributions

Guarantor of the paper: CA. Conceptualization: CA and MG-U. Data curation: DF-P, CA, PM-A, and FM. Formal analysis: DF-P and CA. Project administration: CA and PM-A. Methodology: CA, MG-U, DB, AB, and AG. Resources: CA, MG-U, and AB. Visualization: CA and BL. Supervision: MG-U and PM-A. Software: DB. Writing—original draft: CA and CC. Writing—review and editing: CA, PM-A, AB, BL, AG, DB, and CC. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

Funding

This study was funded by Instituto de Investigación Sanitaria of Cantabria (IDIVAL): NextVAL grant: NVAL19/01. This study received funding from GSK (NCT04449419). The funder was not involved in the study design, collection, analysis, interpretation of data, the writing of this article or the decision

to submit it for publication. GSK was provided the opportunity to review a preliminary version of this manuscript for factual accuracy, but the authors are solely responsible for final content and interpretation.

Acknowledgments

We want to particularly acknowledge the patients and the Biobank Valdecilla (PT17/0015/0019) integrated in the Spanish Biobank Network for its collaboration.

Conflict of interest

CA has received speaker or consulting fees from Boehringer Ingelheim, Pfizer, AstraZeneca, Novartis, Chiesi, Faes Farma, Esteve, and GSK. CC has received speaker or consulting fees from

AstraZeneca, Bial, Boehringer Ingelheim, Chiesi, GSK, Menarini, Novartis, and research grants from GSK, Menarini, and AstraZeneca. DF-P has received speaker or consulting fees from Chiesi and GSK.

The remaining authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

References

- Lozano R, Naghavi M, Foreman K. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the global burden of disease study 2010. *Lancet*. (2012) 380:2095–128.
- Barnes PJ. Inflammatory mechanisms in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J Allergy Clin Immunol*. (2016) 138:16–27. doi: 10.1016/j.jaci.2016.05.011
- Mumby S, Adcock S. Recent evidence from omic analysis for redox signalling and mitochondrial oxidative stress in COPD. *J Inflamm*. (2022) 19:10. doi: 10.1186/s12950-022-00308-9
- Miravittles M, Calle M, Molina J, Almagro P, Gómez JT, Trigueros JA, et al. Spanish COPD guidelines (GesEPOC) 2021: updated pharmacological treatment of stable COPD. *Arch Bronconeumol*. (2022) 58:69–81. doi: 10.1016/j.arbres.2021.03.026
- Schols AMWJ, Broekhuizen R, Weling-Scheepers CA, Wouters EF. Body composition and mortality in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Clin Nutr*. (2005) 82:53–9. doi: 10.1093/ajcn.82.1.53
- 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 index in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med*. (2004) 350:1005–12. doi: 10.1056/NEJMoa021322
- Waatevik M, Johannessen A, Gomez Real F, Aanerud M, Hardie JA, Bakke PS, et al. Oxygen desaturation in 6-min walk test is a risk factor for adverse outcomes in COPD. *Eur Respir J*. (2016) 48:82–91. doi: 10.1183/13993003.00975-2015
- Fermont JM, Masconi KL, Jensen MT, Ferrari R, Di Lorenzo VAP, Marott JM, et al. Biomarkers and clinical outcomes in COPD: a systematic review and meta-analysis. *Thorax*. (2019) 74:439–46. doi: 10.1136/thoraxjnl-2018-211855
- Kirkham PA, Barnes PJ. Oxidative stress in COPD. *Chest*. (2013) 144:266–73. doi: 10.1378/chest.12-2664
- Lee C, Zeng J, Drew BG, Sallam T, Martin-Montalvo A, Wan J, et al. The mitochondrial-derived peptide MOTs-c promotes metabolic homeostasis and reduces obesity and insulin resistance. *Cell Metab*. (2015) 21:443–54. doi: 10.1016/j.cmet.2015.02.009
- Reynolds JC, Lai RW, Woodhead JST, Joly JH, Mitchell CJ, Cameron-Smith D, et al. MOTs-c is an exercise-induced mitochondrial-encoded regulator of age-dependent physical decline and muscle homeostasis. *Nat Commun*. (2021) 12:470. doi: 10.1038/s41467-020-20790-0
- Kim KH, Son JM, Benayoun BA, Lee C. The mitochondrial-encoded peptide MOTs-c translocates to the nucleus to regulate nuclear gene expression in response to metabolic stress. *Cell Metab*. (2018) 28:516–24. doi: 10.1016/j.cmet.2018.06.008
- Merry TL, Chan A, Woodhead JST, Reynolds JC, Kumagai H, Kim SJ, et al. Mitochondrial derived peptides in energy metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. (2020) 319:E659–66. doi: 10.1152/ajpendo.00249.2020
- Swarnabala S, Gattu M, Perry B, Cho Y, Lockey RF, Koliputi N. Romo1 links oxidative stress to mitochondrial integrity. *J Cell Commun Signal*. (2015) 9:73–5. doi: 10.1007/s12079-014-0249-3
- Ye L, Mao S, Fang S, Zhang J, Tan Y, Gu W. Increased serum Romo1 was correlated with lung function, inflammation, and oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. *Inflammation*. (2019) 42:1555–60. doi: 10.1007/s10753-019-01017-x
- Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease (2022). *Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease*. (2022). Available online at: <https://goldcopd.org/https://goldcopd.org/2022-gold-reports-2> (accessed July 31, 2022).
- García-Río F, Calle M, Burgos F, Casan P, Del Campo F, Galdiz JB, Giner J, González-Mangado N, Ortega F, Puente Maestu L. Spanish society of pulmonology and thoracic surgery (SEPAR) spirometry. *Arch Bronconeumol*. (2013) 49:388–401. doi: 10.1016/j.arbr.2013.07.007
- Barreiro E, Bustamante V, Cejudo P, Galdiz JB, Gea J, de Lucas P, et al. SEPAR guidelines for the evaluation and treatment of muscle dysfunction in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Arch Bronconeumol*. (2015) 51:384–95. doi: 10.1016/j.arbr.2015.04.027
- Cederholm T, Bosaeus I, Barazzoni R, Bauer J, Van Gossum A, Klek S, et al. Diagnostic criteria for malnutrition - an ESPEN consensus statement. *Clin Nutr*. (2015) 34:335–40. doi: 10.1016/j.clnu.2015.03.001
- Casanova C, Cote C, Marin JM, Pinto-Plata V, de Torres JP, Aguirre-Jaime A, et al. Distance and oxygen desaturation during the 6-min walk test as predictors of long-term mortality in patients with COPD. *Chest*. (2008) 134:746–52. doi: 10.1378/chest.08-0520
- Husebø GR, Grønseth R, Lerner L, Gyuris J, Hardie JA, Bakke PS, et al. Growth differentiation factor-15 is a predictor of important disease outcomes in patients with COPD. *Eur Respir J*. (2017) 49:1601298. doi: 10.1183/13993003.01298-2016
- Kempf T, von Haehling S, Peter T, Allhoff T, Cicoira M, Doehner W, et al. Prognostic utility of growth differentiation factor-15 in patients with chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol*. (2007) 50:1054–60. doi: 10.1016/j.jacc.2007.04.091
- Ramanjaneya M, Bettahi I, Jerobin J, Chandra P, Abi Khalil C, Skarulis M, et al. Mitochondrial-derived peptides are down regulated in diabetes subjects. *Front Endocrinol*. (2019) 10:331. doi: 10.3389/fendo.2019.00331
- Du C, Zhang C, Wu W, Liang Y, Wang A, Wu S, et al. Circulating MOTs-c levels are decreased in obese male children and adolescents and associated with insulin resistance. *Pediatr Diabetes*. (2018) 19:1058–64. doi: 10.1111/pedi.12685
- Baylan FA, Yasar E. Relationship between the mitochondria-derived peptide MOTs-c and insulin resistance in obstructive sleep apnea. *Sleep Breath*. (2021) 25:861–6. doi: 10.1007/s11325-020-02273-0
- Qin Q, Delrio S, Wan J, Widmer RJ, Cohen P, Lerman LO, et al. Downregulation of circulating MOTs-c levels in patients with coronary endothelial dysfunction. *Int J Cardiol*. (2018) 254:23–7. doi: 10.1016/j.ijcard.2017.12.001
- Liu C, Gidlund EK, Witasap A, Qureshi AR, Söderberg M, Thorell A, et al. Reduced skeletal muscle expression of mitochondrial-derived peptides human and MOTs-c and Nrf2 in chronic kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol*. (2019) 317:F1123–31. doi: 10.1152/ajprenal.0020.2.2019
- Tekin S, Bir LS, Avcı E, Senol H, Tekin I, Cinkir U. Comparison of serum mitochondrial open reading frame of the 12S rRNA-c (MOTS-c) levels in patients with

- multiple sclerosis and healthy controls. *Cureus*. (2022) 14:e26981. doi: 10.7759/cureus.26981
29. Salas-Lucia F, Bianco AC. T3 levels and thyroid hormone signaling. *Front Endocrinol*. (2022) 13:1044691 doi: 10.3389/fendo.2022.1044691
30. Hyatt JK. MOTS-c increases in skeletal muscle following long term physical activity and improves acute exercise performance after a single dose. *Physiol Rep*. (2022) 10:e15377 doi: 10.14814/phy2.15377
31. Dieli-Conwright CM, Sami N, Norris MK, Wan J, Kumagai H, Kim SJ, et al. Effect of aerobic and resistance exercise on the mitochondrial peptide MOTS-c in hispanic and non-hispanic white breast cancer survivors. *Sci Rep*. (2021) 11:16916. doi: 10.1038/s41598-021-96419-z
32. Garcia-Benlloch S, Revert-Ros F, Blesa JR, Alis R. MOTS-c promotes muscle differentiation *in vitro*. *Peptides*. (2022) 155:170840 doi: 10.1016/j.peptides.2022.170840
33. Neves CDC, Lage VKS, Lima LP, Matos MA, Vieira ELM, Teixeira AL, et al. Inflammatory and oxidative biomarkers as determinants of functional capacity in patients with COPD assessed by 6-min walk test-derived outcomes. *Exp Gerontol*. (2021) 152:111456. doi: 10.1016/j.exger.2021.111456
34. Ye L, Quian Y, Li Q, Fang S, Yang Z, Tan Y, et al. Serum Romo1 is significantly associated with disease severity in patients with obstructive sleep apnea syndrome. *Sleep Breath*. (2018) 22:743–8 doi: 10.1007/s11325-017-1606-2

Association of GDF-15 with 6 minute walking test.

C. A. Amado Diago1 , P. Martín Audera2 , D. Boucle Tirador2 , M. García-Unzueta2 , M. Ruiz De Infante Pérez3 , A. Berja2 , A. R. Guerra2 , B. A. Lavin2 , S. Izquierdo Cuervo2 , G. Andretta2 , M. Cristeto2 , J. S. Osorio Chaves2 , L. González2 , N. Borja Vargas2 , J. Agüero2 , D. Ferrer Pargada2 .
1Neumology, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla - Santander (Cantabria) (Spain), 2 Hospital Universitario Marqués de Valdecilla - Santander (Cantabria) (Spain), 3Hospital Sierrallana Santander (Cantabria) (Spain)

amadodiago.carlos@gmail.com

BACKGROUND

GDF-15 is a cytokine associated with inflammation and poor prognosis in chronic conditions. Walking less than 350 meters in 6 minute walking test is associated with poorer COPD outcomes, including survival. We hypothesised that high levels of this molecule are associated with low distance in the 6 minute walking test.

METHODS

133 patients with COPD were enrolled in the study. After signing informed consent, spirometric values, serum GDF-15, distance walked in 6-min (6MWD), FFMI, and demographic characteristics were recorded.

RESULTS

Cohort characteristics were Age 68+/-7.22 years, male 64% 6MWD 425 (330-481) m, FEV1 (%) 54+/-21.7, GDF-15 1010 (824-1500) pg/mL, FFMI 18.9+/-3.1 Kg/m2. GDF-15 correlated with 6MWD (r = 0.406, p< 0.001) Lineal. Logistic regression analysis showed that patients with high GDF-15 (more than 1500 ng/L were at a higher risk of walking less 350 m in 6MW Test OR 14.949 (CI95% 3.189-70.0, p<0.001) after adjustent by sex, age, smoking status, fat free mass index, mMRC Dyspnoea score and FEV1.

Table 1. Demographic Characteristics.

Clinical Characteristic	n=133
Sex male (%)	64%
Age (years)	68+/-7,2
FVC (%)	84,27+/-19,3
FEV1 (%)	54,4+/-21,7
FEV1/FVC	49,3+/-12,2
Current smokers (%)	30,1
CAT Score	13,5+/-7,66
mMRC Dyspnoea Score	
6 Minute Walking Test Distance (m)	425 (330-481)
FFMI (Kg/m²)	18.9+/-3.1
GDF-15 (pg/mL)	1010 (824-1500)

Figure 1. Correlation between 6 minute walking distance and GDF-15

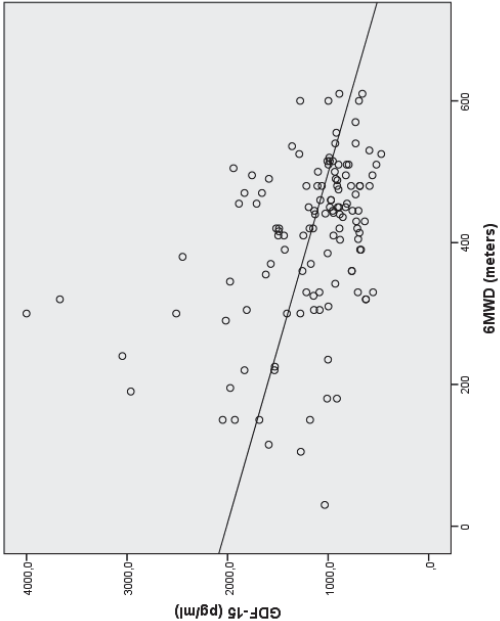


Table 2. Logistic regresion model for the risk of low 6 minute walking distance.

	B	Wald	p	OR	95% C.I. OR	
					Inferior	Superior
GDF15alto(1)	-2,705	11,771	0,001	0,067	0,014	0,314
Sex(1)	-1,677	2,909	0,088	0,187	0,027	1,284
Age (years)	0,044	0,878	0,349	1,045	0,953	1,146
Fumador_SINO(1)	0,516	0,537	0,464	1,675	0,422	6,646
FFMI (Kg/m2)	-0,090	0,345	0,557	0,914	0,677	1,234
FEV1 (%)	-0,041	4,342	0,037	0,959	0,923	0,998
mMRC Disphnoea score	1,261	12,101	0,001	3,529	1,734	7,181
Constant	0,393	0,011	0,917	1,481		

CONCLUSION

High levels of GDF- 15 are associated with low 6MWD.

GDF-15 y su asociación con las características típicas de la EPOC.

Paula Martín Audera 1, Carlos Antonio Amado Diago 1, María Teresa García Unzueta 1, Milagros Ruiz De Infante 2, Daymara Bouclé Tirador 1, Juan Agüero Calvo 1, Ana Berja Miguel 1, Bernardo Alio Lavín Gomez 1

1 Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander. 2 Hospital Comarcal Sierrallana, Torrelavega

Introducción

La EPOC es una enfermedad heterogénea que se caracteriza por una obstrucción progresiva de las vías aéreas cuyo diagnóstico se basa en la espirometría y el antecedente de tabaquismo. El pronóstico de la EPOC depende de varios factores como la capacidad de ejercicio, la masa muscular o la agudización de la EPOC.

El GDF-15 (growth differentiation factor 15) es una hormona circulante que puede desempeñar funciones importantes en la inflamación crónica, la desnutrición y la capacidad de ejercicio.

Objetivo

Determinar si GDF-15 está elevada en los pacientes con EPOC, y si está relacionada con la masa muscular y un mayor riesgo de exacerbación con el fin de hallar un potencial biomarcador de laboratorio.



Metodología

Se reclutaron 165 pacientes con EPOC y 49 controles fumadores sin EPOC ajustados por edad y sexo. El test de la marcha de 6 minutos (TM6M) se realizó acorde a la Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica. La composición corporal se midió mediante impedancia bioeléctrica (OMROM BF511, Japan). El diagnóstico de desnutrición se determinó según el consenso ESPEN (IMC <18,5 kg/m² o 18,5-22 kg/m²), combinado con FFMI bajo (hombres <17 kg/m² y mujeres <15 kg/m²).

Se clasificaron como alto riesgo de exacerbación si tenían dos o más episodios moderados, o un episodio de exacerbación grave, según criterios GOLD, durante el año anterior. El GDF15 se midió por inmunoensayo específico tipo sándwich (ThermoFisher Scientific).

Resultados

En pacientes EPOC en situación basal, los niveles de GDF15 se encontraban más elevados que en el grupo control, con una media de 1244 pg/mL (913-1716) versus 1050 pg/mL (736.5-1487.5) p=0.013.

		GDF-15			
		Univariante		Multivariante	
		OR (95% IC)	p	OR (95% IC)	p
Edad (años)		1.063 (1.019-1.11)	0.005	1.010 (0.945-1.079)	0.776
Sexo					
	Masculino	1		1	
	Femenino	0.433 (0.224-0.837)	0.013	0.235 (0.072-0.770)	0.017
Fumador					
	Exfumador	1		1	
	Fumador actual	0.580 (0.295-1.142)	0.115	1.456 (0.535-3.964)	0.462
Exacerbaciones					
	0-1	1		1	
	>1	1.032 (0.551-1.935)	0.921	3.028 (1.134-8.03)	0.027
Composición corporal					
	Normal	1		1	
	Obeso	1.195 (0.618-2.312)	0.597	0.514 (0.161-1.642)	0.251
	Sarcopénico	2.319 (1.006-5.343)	0.048	3.578 (0.851-15.046)	0.082
TM6M		0.995 (0.992-0.988)	<0.001	0.995 (0.990-0.999)	0.017
Charlson					
	1	1		1	
	2	10.495 (4.236-26.000)	<0.001	1.183 (0.335-4.176)	0.794
	>2	10.833 (4.184-28.050)	<0.001	14.920 (4.694-47.619)	<0.001

Discusión

Los pacientes con EPOC estable en comparación con el grupo control, tenían niveles séricos significativamente más altos de GDF-15. Además, se pudo demostrar que estaba relacionado con los parámetros clínicos considerados característicos de la EPOC, como la masa muscular (sarcopenia) y mayor riesgo de exacerbaciones, entre otros.

El GDF15 podría ser un biomarcador prometedor, aunque inespecífico, en la EPOC; lo que podría significar un mayor papel del laboratorio en el diagnóstico de estos pacientes.

