

Inflamación sistémica durante las agudizaciones de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica

A. Noguera, O. Malo, J. Sauleda, X. Busquets, C. Miralles y A.G.N. Agustí

Servei de Pneumologia, Anàlisis Clíniques y Unidad de Investigación. Hospital Universitari Son Dureta. Palma de Mallorca.

OBJETIVO: La concentración de varias citocinas inflamatorias y proteínas de fase aguda está incrementada en la circulación sistémica de pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) en fase estable. Sin embargo, no se ha investigado hasta ahora si estos marcadores de inflamación aumentan durante la agudización de la enfermedad, o se modifican con el tratamiento esteroide.

Por este motivo, los objetivos de este estudio son: 1) describir la evolución de varios marcadores inflamatorios en la circulación sistémica durante la agudización de la EPOC, y 2) valorar los potenciales efectos del tratamiento esteroide durante esta agudización.

MÉTODOS: Los valores en suero del factor de necrosis tumoral α (TNF- α), interleucina 6 (IL-6), interleucina 8 (IL-8) y proteína C reactiva (PCR) se determinaron en 10 pacientes (65 ± 2 años) con EPOC grave ($FEV_1 35 \pm 4\%$ referencia), hospitalizados debido a un fracaso respiratorio agudo ($PaO_2 57 \pm 2$ mmHg; $PaCO_2 48 \pm 3$ mmHg). Las muestras de sangre fueron obtenidas en la sala de urgencias (antes de comenzar el tratamiento con esteroides i.v.), en las primeras 24 h de hospitalización, en el momento del alta médica y 2 meses más tarde. Paralelamente se estudiaron 8 sujetos sanos no fumadores de edad similar (54 ± 3 años) que se utilizaron como casos control.

RESULTADOS: En comparación con los casos control, los pacientes de EPOC evidenciaron en la sala de urgencias concentraciones más elevadas de IL-6 ($5,1 \pm 1,6$ frente a $1,8 \pm 0,5$ pg/ml; $p < 0,05$) y PCR ($2,2 \pm 0,4$ frente a $0,6 \pm 0,2$ mg/dl; $p < 0,005$), pero concentraciones similares de IL-8 ($29 \pm 11,3$ frente a $34,7 \pm 10,3$ pg/ml; $p = ns$). Durante su recuperación, y a pesar del uso de esteroides i.v., ninguno de estos valores se modificó de manera estadísticamente significativa. Dos meses después del alta hospitalaria tampoco se observaron cambios en los valores de los marcadores estudiados.

El ensayo ELISA utilizado no fue capaz de detectar TNF- α ni en los pacientes ni en los casos control en ninguna de las muestras obtenidas.

CONCLUSIÓN: Estos resultados indican que: a) existe evidencia de inflamación sistémica durante una agudización del EPOC, y b) esta inflamación sistémica no parece estar influenciada de manera significativa por el tratamiento con esteroides por vía intravenosa.

Palabras clave: Bronquitis crónica. Enfisema. Inflamación. Tratamiento antiinflamatorio.

Systemic inflammation during exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease

OBJECTIVE. The circulating blood levels of several inflammatory cytokines and acute phase proteins are higher in patients with stable chronic obstructive pulmonary disease (COPD). However, whether or not these inflammatory markers increase during COPD exacerbation or are modified by corticosteroid treatment has not been investigated.

The objective of this study was therefore 1) to describe changes in several inflammatory markers in systemic circulation during COPD exacerbation, and 2) to assess the potential effects of corticosteroid treatment during exacerbation.

METHODS. Serum levels of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha), interleukin 6 (IL-6), interleukin 8 (IL-8) and C-reactive protein (CRP) were determined for 10 patients (65 ± 2 years old) with severe COPD ($FEV_1 35 \pm 4\%$ reference) who were hospitalized for acute respiratory failure ($PaO_2 57 \pm 2$ mm Hg; $PaCO_2 48 \pm 3$ mm Hg). Blood samples were obtained in the emergency room (before starting intravenous corticosteroid treatment), during the first 24 hours of admission, upon discharge and two months later. Eight healthy non-smokers of a similar age (54 ± 3 years) were also studied as control subjects.

RESULTS. The COPD patients had higher concentrations of IL-6 (5.1 ± 1.6 vs. 1.8 ± 0.5 pg/mL, $p < 0.05$) and CRP (2.2 ± 0.4 vs. 0.6 ± 0.2 mg/dL, $p < 0.005$) than did controls, but the concentrations of IL-8 were similar (29 ± 11.3 vs. 34.7 ± 10.3 pg/mL, $p = ns$). No statistically significant changes were seen either during recovery, in spite of intravenous corticosteroid treatment, or two months after discharge.

The ELISA test used was unable to detect TNF-alpha in any of the samples obtained from either patients or controls.

CONCLUSION. The results show that 1) there is evidence of systemic inflammation during exacerbation of COPD, and 2) such systemic inflammation does not appear to be influenced significantly by intravenous corticosteroid treatment.

Key words: Chronic bronchitis. Emphysema. Inflammation. Anti-inflammatory treatment

Financiado, en parte, por el Fondo de Investigación Sanitaria 98/0128 y ABEMAR.

Correspondencia: Dr. A.G.N. Agustí.
Servei Pneumologia. Hospital Universitari Son Dureta.
Andrea Doria, 55. 07014 Palma Mallorca.
Correo electrónico: aagusti@hdsd.es

Recibido: 17-7-2001; aceptado para su publicación: 18-12-2001.

Introducción

La enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) se caracteriza por una excesiva respuesta inflamatoria a agentes inhalados, fundamentalmente al humo de tabaco^{1,2}. Se puede detectar esta respuesta inflamatoria en

sangre periférica de pacientes con EPOC estable^{3,4}, mediante la elevación de los valores plasmáticos de factor de necrosis tumoral α (TNF- α), interleucina (IL) 6, IL-8 y proteínas de fase aguda (proteína C reactiva [PCR])^{5,6}. Se postula que durante la agudización de la enfermedad se produce un aumento del proceso inflamatorio pulmonar, pero hasta ahora no se ha investigado cómo se refleja este proceso de agudización en la circulación periférica.

Se propugna el tratamiento con esteroides durante la agudización de la enfermedad, pero no se sabe cómo y en qué grado este tratamiento afecta al proceso de inflamación sistémica.

Por tanto, este estudio pretende investigar: *a*) si existe evidencia de inflamación sistémica durante una agudización del EPOC que requiere hospitalización, y *b*) los efectos potenciales del tratamiento con esteroides por vía intravenosa sobre el perfil inflamatorio sistémico.

Métodos

Sujetos de estudio

Se estudió de forma consecutiva a 10 pacientes varones hospitalizados debido a una agudización de su EPOC junto con 8 varones voluntarios sanos no fumadores de edad similar, reclutados entre el personal de nuestro hospital y que no tenían antecedentes de enfermedades inflamatorias actuales o pasadas. Todos los pacientes eran ex fumadores (> 20 paquetes/año), y acudieron a urgencias de nuestro hospital debido a un incremento de los síntomas respiratorios en los días previos. No presentaban signos de posible infección como fiebre y expectoración purulenta, y su función cardíaca era normal. Todos presentaron fracaso respiratorio a su ingreso (PaO₂ 57 \pm 2 mmHg; PaCO₂ 48 \pm 3 mmHg, sin respiración asistida). Se excluyó a los pacientes con evidencia de neumonía u otras enfermedades que pudieran interferir su diagnóstico y/o su evolución clínica, tal como asma bronquial o cáncer de pulmón. Todos habían sido tratados con broncodilatadores inhalados antes de su ingreso hospitalario. Sólo cuatro de ellos habían recibido esteroides inhalados (por vía nasal) antes del estudio.

Durante su hospitalización, el tratamiento estandarizado para todos los pacientes incluía: oxigenoterapia, broncodilatadores inhalados, antibióticos y esteroides por vía intravenosa con una dosis fija de 120 mg/día de metilprednisolona durante los primeros 3 días. Más tarde esta dosis fue reduciéndose y pasó a ser administrada por vía oral. Por norma general, los pacientes fueron dados de alta con una dosis de 10-15 mg/día de prednisolona vía oral con instrucciones para reducir gradualmente la dosis durante los 10 días siguientes al alta.

En el momento de obtener el alta hospitalaria, todos los pacientes presentaban una obstrucción irreversible al flujo de aire (FEV₁ 35 \pm 4% referencia).

Dos meses más tarde de ser dados de alta, ninguno de los pacientes recibía esteroides orales, aunque cuatro de ellos estaban en tratamiento con esteroides inhalados.

Todos los participantes dieron su consentimiento escrito después de ser informados con todo detalle de la naturaleza, características, riesgos y potenciales beneficios del estudio. Esta investigación había sido aceptada por el comité de ética de nuestro hospital.

Diseño del estudio

En todos los participantes (pacientes y casos control) se determinaron los valores en suero de TNF- α , IL-6, IL-8 y

PCR en sangre venosa periférica obtenida por punción de la vena antecubital. Las muestras de los pacientes se obtuvieron durante su hospitalización de una manera seriada: en la sala de urgencias (antes del inicio del tratamiento con esteroides por vía intravenosa), durante las primeras 24 horas de hospitalización (con esteroides por vía intravenosa), en el momento del alta médica (8-10 días después de su ingreso), y dos meses más tarde. Los casos control se estudiaron solamente en una ocasión. Las muestras fueron centrifugadas a 1.200 g durante 10 min inmediatamente después de su extracción. Las muestras de suero se congelaron a -70 °C hasta su análisis. Todas las muestras se analizaron de forma similar y simultánea a la finalización del estudio (véase más adelante). En el momento del alta médica, se realizó una espirometría forzada (GS Warren Collins, EE.UU.) y una gasometría de sangre arterial (IL BG3, Izasa, Spain) a los pacientes de acuerdo a las directrices internacionales¹⁰. Los valores de referencia espirométricos fueron los correspondientes a los de la población mediterránea¹¹.

Medición de citocinas y proteínas de fase aguda

La concentración sérica de TNF- α , IL-6 e IL-8 se midió mediante un ensayo inmunoenzimático tipo sandwich (ELISA). Para la determinación de TNF- α e IL-6, se incubaron placas de microtiter de 96 pocillos recubiertos del correspondiente anticuerpo monoclonal (Endogen, Inc. MA, EE.UU.) con 50 μ l de estándares de recombinante humano de la correspondiente citocina (Endogen, Inc. MA, EE.UU.) o muestras desconocidas y 50 μ l de anticuerpo marcado con biotina (Endogen, Inc. MA, EE.UU.) a 20-25 °C durante 2 h. Para la determinación de IL-8, se incubaron placas de microtiter de 96 pocillos recubiertos del correspondiente anticuerpo monoclonal (Endogen, Inc. MA, EE.UU.) con 50 μ l de estándares de recombinante humano de la correspondiente citocina (Endogen, Inc. MA, EE.UU.) o muestras desconocidas y 50 μ l de anticuerpo marcado con biotina (Endogen, Inc. MA, EE.UU.) a 20-25 °C durante una hora. A continuación, las placas se lavaron tres veces con tampón de lavado (Endogen, Inc. MA, EE.UU.) y se incubaron con 50 μ l de anticuerpo marcado con biotina (Endogen, Inc. MA, EE.UU.) a 20-25 °C durante una hora. Al final del período de incubación, las placas se lavaron tres veces con tampón de lavado (Endogen, Inc. MA, EE.UU.) y se incubaron durante 30 min a 20-25 °C con 100 μ l de solución Streptavidina-HRP (Endogen, Inc. MA, EE.UU.). Después, las placas se lavaron de nuevo tres veces con tampón de lavado y se incubaron con 100 μ l de solución TMB Substrate (Endogen, Inc. MA, EE.UU.) durante 30 min a 20-25 °C en oscuridad. La absorbancia a 450 nm se leyó utilizando un fotómetro de placa (Titertek Multiskan plus, Labsystem and Flow Laboratories, Finlandia). Los límites de detección del ensayo fueron 5 pg/ml para TNF- α , 1 pg/ml para IL-6 y 2 pg/ml para IL-8. La concentración de PCR se midió por turbidimetría con un límite de detección de 0,3 mg/dl (Synchron Cx7 Delta, Beckman Instruments Inc, Brea, CA, EE.UU.). Los coeficientes de variación del ensayo de TNF- α , IL-6 y IL-8 fueron del 10%.

Análisis estadístico

Los resultados se expresan como media \pm ESM. Los valores medidos en pacientes, y casos y controles se compararon entre sí mediante un test de T no pareado. Con la finalidad de determinar los efectos del tratamiento esteroide en pacientes con EPOC, los valores medidos en los pacientes durante su hospitalización y después de ser dados de alta se compararon utilizando el test ANOVA. Un valor de p inferior a 0,05 se consideró estadísticamente significativo.

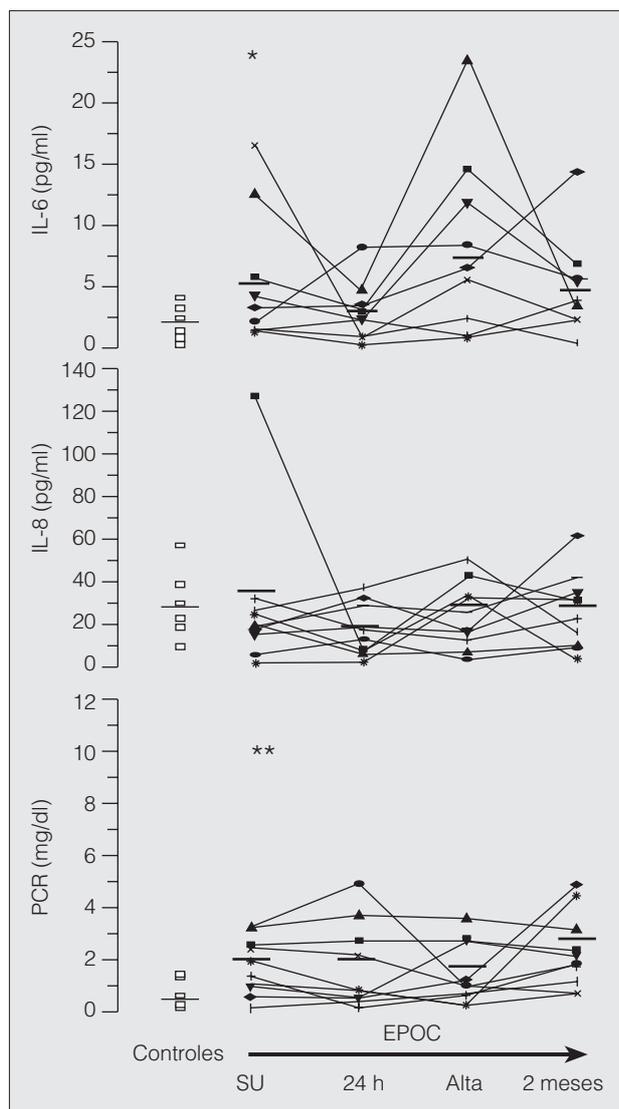


Fig. 1. Valores individuales de IL-6, IL-8 y PCR en los casos control (sujetos sanos) [cuadrado abierto □] y en los pacientes con EPOC (símbolos) determinados seriadamente durante un episodio de agudización que requería hospitalización: en la sala de urgencias, en las primeras 24 h después de su ingreso hospitalario, en el momento del recibir el alta (8-10 días después de su ingreso) y 2 meses más tarde. Las barras indican los valores medios. No se detectó TNF- α en ninguna muestra de pacientes ni de casos control en ninguna extracción. * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$. IL: interleucina; PCR: proteína C reactiva; EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica; TNF- α : factor de necrosis tumoral α .

TABLA 1
Datos clínicos y de función pulmonar de los pacientes con EPOC

	Pacientes con EPOC			
	SU	24 h	Alta	2 meses
PaO ₂ (mmHg)*	57 \pm 1,9	ND	61,8 \pm 1,7	61,8 \pm 3
PaCO ₂ (mmHg)*	47,7 \pm 2,7	ND	45,6 \pm 3,2	41,4 \pm 1,9
pH*	7,39 \pm 0,01	ND	7,43 \pm 0,01	7,42 \pm 0,01
FEV ₁ (% ref.)	ND	ND	34,7 \pm 4	ND
FEV ₁ /FVC (%)	ND	ND	44,7 \pm 3,3	ND

*En aire ambiente. EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica; ND: no disponible.

Resultados

Los pacientes presentaron una media \pm ESM de edad de 65 ± 2 años. Los sujetos control fueron algo más jóvenes (54 ± 3 años; $p < 0,05$). Todos los pacientes fueron ex fumadores de consideración (67 cajetillas/año) mientras que ninguno de los sujetos control fumaba.

No se detectó TNF- α ni en los pacientes ni en los casos control en ninguna ocasión. En la figura 1 se exponen los valores individuales IL-6, IL-8 y PCR determinados en los casos control y en los pacientes. En la sala de urgencias (antes del comienzo del tratamiento con esteroides por vía intravenosa) los pacientes presentaron concentraciones elevadas estadísticamente significativas de IL-6 ($5,1 \pm 1,6$ frente a $1,8 \pm 0,5$ pg/ml; $p < 0,05$) y PCR ($2,2 \pm 0,4$ frente a $0,6 \pm 0,2$ mg/dl; $p < 0,005$), pero concentraciones de IL-8 similares ($29 \pm 11,3$ frente a $34,7 \pm 10,3$ pg/ml; $p = ns$) a las concentraciones de los casos control (fig. 1). Estos resultados se mantuvieron invariables cuando los 4 pacientes que habían recibido esteroides inhalados antes de la toma de muestras fueron excluidos del análisis. Durante su recuperación, y después del uso de esteroides por vía intravenosa, tampoco ninguna de estas concentraciones se modificó de una manera estadísticamente significativa (fig. 1). Dos meses después de ser dados de alta, dichas concentraciones permanecían invariables (fig. 1). No se encontró ninguna correlación con significación estadística entre los niveles de estos marcadores inflamatorios y distintas variables clínicas (como índice de masa corporal) o variables funcionales (como FEV₁, PaO₂).

Discusión

Este estudio demuestra que el estado inflamatorio sistémico anormal de pacientes con EPOC en condiciones estables^{3,4} se mantiene (y no parece estar aumentado) durante la agudización de la enfermedad. A la vez pone de manifiesto que no se desarrolla una respuesta al tratamiento antiinflamatorio con esteroides por vía intravenosa. Indudablemente, no se trata de un estudio controlado. Es un estudio prospectivo y seriado y, por tanto, sujeto a varias limitaciones; la principal es el número relativamente pequeño de sujetos estudiado, motivado por la dificultad en la realización del seguimiento completo de los pacientes (el número de casos y controles estudiados está en concordancia con el número de pacientes). No obstante, este estudio proporciona información no descrita todavía.

Los estudios previos ponen de manifiesto que tiene lugar una inflamación excesiva en los pulmones de los pacientes con EPOC^{1,2} y que dicha inflamación puede detectarse en la circulación sistémica^{3,4}. Por ejemplo, en dos estudios se han encontrado valores elevados de citoquinas y proteínas de fase aguda en pacientes con EPOC estable^{5,6}. Los resultados obtenidos dos meses después del alta hospitalaria en nuestro estudio concuerdan con estas observaciones (fig. 1). Sin embargo, el rango de valores de PCR observado (1-4 mg/dl) indica la presencia de un estado inflamatorio de grado leve^{12,13}. Durante

la sepsis, por ejemplo, los valores de PCR son más altos y generalmente varían entre 4 y 20 mg/dl¹⁴. No se encontraron valores elevados de IL-8 en ninguno de nuestros pacientes. Este hecho aparentemente contrasta con un estudio previo en el que se ha descrito un incremento de los valores de IL-8 en los pacientes con EPOC estable⁶. Aun así, en este estudio sólo se pudo detectar IL-8 en la mitad de los pacientes estudiados⁶.

A nuestro entender, este estudio es pionero en la investigación del perfil inflamatorio sistémico de la EPOC durante una agudización de la enfermedad. Se pone de manifiesto que en la sala de urgencias la concentración de IL-6 y PCR es más elevada en los pacientes que en los casos control (fig. 1). Este hecho indica que durante una agudización de la EPOC hay evidencia de inflamación sistémica como ocurre en los pacientes con EPOC estable. Sin embargo, la observación de que dos de los 10 pacientes estudiados presentan resultados de PCR, dentro del rango de normalidad en la sala de urgencias, cuestiona la validez de esta proteína como marcador de fase aguda en la EPOC y corrobora su mayor utilidad en la monitorización de la enfermedad por medio de determinaciones seriadas.

La síntesis de IL-6 se produce en las células de un gran número de tejidos, pero los sitios principales de producción *in vivo* son probablemente los monocitos estimulados¹⁵ y las células endoteliales. Se sabe que la IL-6 es un importante inductor fisiológico de la síntesis de proteínas de fase aguda en el hígado, y la IL-1 y el TNF- α desempeñan un papel secundario^{17,19}. La correlación entre la IL-6 y la PCR observada en nuestro estudio (fig. 1) corrobora este hecho. Estos marcadores inflamatorios no fueron significativamente diferentes entre sí, cuando se determinaron dos meses después de su alta hospitalaria (fig. 1). Esta observación sugiere que la inflamación sistémica de la EPOC no está aumentada durante el proceso de agudización de la enfermedad y que, por tanto, el aumento del estado inflamatorio basal que ocurre en estas condiciones está probablemente localizado en los pulmones. La posibilidad de que los esteroides puedan haber reducido parcialmente el valor elevado de los marcadores durante la agudización, produciendo una aparente falta de variación entre los estados agudizado y estable, se puede excluir teniendo en cuenta que las muestras de la sala de urgencias se obtuvieron antes del comienzo del tratamiento con esteroides por vía intravenosa. Además, el tratamiento con esteroides por vía intravenosa durante el período de recuperación de la agudización no influyó de manera estadísticamente significativa en la concentración de dichos marcadores inflamatorios (fig. 1). De hecho, la ausencia de efecto de los esteroides sobre los marcadores inflamatorios en la EPOC concuerda con estudios previos en esputo inducido²⁰ y en aire exhalado²¹ en EPOC en fase estable, así como con su discreto efecto clínico publicado recientemente en un amplio estudio multicéntrico²². Estas observaciones contrastan con las de otras enfermedades pulmonares inflamatorias, como el asma bronquial, en la que los citados marcadores inflamatorios responden favorablemente a la terapia antiinflamatoria^{20,23}.

Una mejor comprensión de esta diferencia de comportamiento sería de gran valor para explicar los mecanismos inflamatorios celulares del EPOC y mejorar las alternativas terapéuticas a utilizar en el futuro.

Se trata del primer estudio que investiga la variación de los valores séricos de TNF- α durante un proceso de agudización grave de la EPOC. A pesar de la utilización de un ensayo ELISA, que se correlaciona en gran medida con el TNF- α biológicamente activo²⁴, no se detectó TNF- α ni en los pacientes ni en los casos control. Un estudio reciente que también utiliza un ensayo ELISA para cuantificar el TNF- α en pacientes con EPOC estable obtiene idénticos resultados⁶. Por contraposición, otros autores sugieren que la EPOC puede estar asociado a valores aumentados de TNF- α . No obstante, estos autores o bien han analizado esputos inducidos²⁵, o bien han utilizado métodos analíticos más sensibles (radioinmunoanálisis)²⁶, o bien sólo han hallado valores séricos del TNF- α elevados en un subgrupo de pacientes con pérdida de peso²⁶, o bien han estimulado monocitos circulantes *in vitro* para activar la producción de TNF- α ²⁷. El TNF- α biológicamente activo es difícil de detectar en el suero ya que rápidamente forma complejos con su receptor^{18,28,29}. Dado que algunos autores han publicado valores elevados de receptores de TNF- α en la EPOC⁶, se puede especular que la incapacidad para detectar TNF- α en los pacientes con un proceso de agudización grave de EPOC se debe a la unión de la dicha citocina a los receptores circulantes de TNF- α .

En resumen, este estudio demuestra que el estado inflamatorio crónico de los pacientes con EPOC es detectable en la circulación sistémica y que este perfil inflamatorio típico persiste en el tiempo y no parece aumentar durante la agudización de la enfermedad. Asimismo, los resultados obtenidos en este estudio indican que la inflamación sistémica no se ve modificada por la terapia antiinflamatoria con esteroides. Las implicaciones clínicas y terapéuticas de estos resultados requieren investigaciones adicionales futuras.

Agradecimientos

Los autores agradecen de manera especial al personal de enfermería del hospital el cuidado que dispensó a los pacientes y su inestimable ayuda durante la realización de este estudio.

BIBLIOGRAFÍA

1. Jeffery PK. Bronchial biopsies and airway inflammation. *Eur Respir J* 1996;9:1583-7.
2. Saetta M, Di Stefano A, Maestrelli P, Ferrareso A, Drigo R, Potenza A, et al. Activated T-Lymphocytes and macrophages in bronchial mucosa of subjects with chronic bronchitis. *Am Rev Respir Dis* 1993;147:301-6.
3. Rahman I, Morrison D, Donaldson K, MacNee W. Systemic oxidative stress in asthma, COPD, and smokers. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;154:1055-60.
4. Noguera A, Busquets X, Sauleda J, Villaverde JM, MacNee W, Agusti A. Expression of adhesion molecules and G proteins in circulating neutrophils in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;158:1664-8.
5. Yasuda N, Gotoh K, Minatoguchi S, Asano K, Nishigaki K, Nomura M, et al. An increase of soluble Fas, an inhibitor of apoptosis, associated with progression of COPD. *Respir Med* 1998;92:993-9.

6. Schols AMWJ, Buurman WA, Staal-van den Brekel AJ, Dentener MA, Wouters EFM. Evidence for a relation between metabolic derangements and increased levels of inflammatory mediators in a subgroup of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 1996;51:819-24.
7. Celli B, Snider G, Heffner J, Tied B, Ziment I, Make B, et al. Standards for the diagnosis and care of patients with chronic obstructive pulmonary disease. Official statement of the American Thoracic Society. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;152:S77-120.
8. Siafakas NM, Vermeire P, Pride NB, Paoletti P, Gibson J, Howard P, et al. Optimal assessment and management of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). European Respiratory Society consensus statement. *Eur Respir J* 1995;8:1398-420.
9. The COPD Guidelines group. BTS Guidelines for the management of chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 1997;52:S1-28.
10. American Thoracic Society Official Statement. Standardization of Spirometry. 1994 Update. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;152:1107-36.
11. Roca J, Sanchis J, Agustí-Vidal A, Segarra F, Navajas D, Rodríguez-Roisín P, et al. Spirometric reference values for a mediterranean population. *Bull Eur Physiopathol Respir* 1986;22:217-24.
12. Peltola HO. C-reactive protein for rapid monitoring of infections of the central nervous system. *Lancet* 1982;1:980-3.
13. Salonen E-M, Vaheri A. C-reactive protein in acute viral infections. *J Med Virol* 1981;8:161-7.
14. Morley JJ, Kushner I. Serum C-reactive protein levels in disease. *Ann NY Acad Sci* 1982;389:406-18.
15. Turner M, Feldman M. Comparison of patterns of expression of tumor necrosis factor, lymphotoxin and interleukin-6 mRNA. *Biochem Biophys Res Commun* 1988;153:1144-51.
16. Sironi M, Breviario F, Prozerpio P. IL-1 stimulates IL-6 production in endothelial cells. *J Immunol* 1989;142:549-53.
17. Nijsten M, De Groot ER, Ten Duis HJ, Klasen HJ, Hack CE, Aarden LA. Serum levels of interleukin-6 and acute phase responses. *Lancet* 1987;2:921.
18. Whitcher JT, Evans SW. Cytokines in disease. *Clin Chem* 1990;36:1269-81.
19. Castell JV, Andus T, Kunz D, Heinrich PC. Interleukin-6 the major regulator of acute phase protein synthesis in man and rat. *Ann NY Acad Sci* 1989;557:87-101.
20. Keatings VM, Jatakanon A, Worsdell YM, Barnes PJ. Effects of inhaled and oral glucocorticoids on inflammatory indices in asthma and COPD. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;155:542-8.
21. Agustí AGN, Villaverde JM, Togores B. Serial measurements of exhaled nitric oxide during exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2000;15:177-80.
22. Niewoehner DE, Erbland ML, Deupree RH, Collins D, Gross NF, Light RW, et al. Effect of systemic glucocorticoids on exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 1999;340:1941-7.
23. Kharitonov SA, Yates D, Robbins RA, Logan-Sinclair R, Shinebourne EA, Barnes PJ. Increased nitric oxide in exhaled air of asthmatic patients. *Lancet* 1994;343:133-5.
24. Engelberts I, Moller A, Schoen G, Van der Linden CJ, Buurman WA. Evaluation of measurement of human TNF by ELISA. *Lymphokine Cytokine Res* 1991;10:69-76.
25. Keatings VM, Collins PD, Scott DM, Barnes PJ. Differences in interleukin-8 and tumor necrosis factor- α in induced sputum from patients with chronic obstructive pulmonary disease or asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;153:530-4.
26. Di Francia M, Barbier D, Mege JL, Orehek J. Tumor necrosis factor- α levels and weight loss in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1994;150:1453-5.
27. De Godoy I, Donahoe M, Calhoun WJ, Mancino J, Rogers RM. Elevated TNF- α Production by peripheral blood monocytes of weight-losing COPD Patients. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;153:633-7.
28. Loetscher H, Pan Y, Lanham HW, Brockhaus M, Tabuchi H, Lesslauer W. Molecular cloning and expression of the human 55kD tumor necrosis factor receptor. *Cell* 1990;61:351-9.
29. Smith CA, Davis T, Anderson D, Solam L, Beckmann MP, Jerzy R, et al. A receptor for tumor necrosis factor defines an unusual family of cellular and viral proteins. *Science* 1990;248:1019-23.