

Marcadores de remodelado bronquial en el esputo inducido de fumadores sanos

B. Avilés^a, J. Belda^a, G. Margarit^a, J. Bellido-Casado^a, C. Martínez-Brú^b y P. Casan^a

^aDepartamento de Neumología. Hospital de la Santa Creu i de Sant Pau. Universitat Autònoma de Barcelona. Barcelona. España.

^bDepartamento de Bioquímica. Hospital de la Santa Creu i de Sant Pau. Universitat Autònoma de Barcelona. Barcelona. España.

OBJETIVO: El remodelado bronquial en la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) se ha relacionado con el equilibrio entre la metaloproteína (MMP) 9 y su inhibidor, el inhibidor tisular de MMP tipo 1 (TIMP-1). Dicho equilibrio no se ha analizado en fumadores sanos. Nuestro objetivo ha sido estudiar dicho equilibrio en el esputo inducido de fumadores sanos respecto a sanos no fumadores (controles) y pacientes con EPOC.

PACIENTES Y MÉTODOS: Se obtuvieron 35 muestras de esputo inducido, de las que 12 provenían de fumadores sanos, otras 12 de controles y 11 de pacientes con EPOC. Se estudiaron la celularidad de las muestras y la concentración de MMP-9 (total y fracción activa) y TIMP-1 mediante enzimoanálisis.

RESULTADOS: Los fumadores sanos mostraron mayor concentración media (\pm desviación estándar) de MMP-9 total (273 ± 277 ng/ml) y una ratio mayor ($0,16 \pm 0,14$) que los controles (128 ± 146 ng/ml y $0,08 \pm 0,06$, respectivamente). Sin embargo, la ratio MMP-9 activa/TIMP-1 fue equiparable en ambos grupos. Los pacientes con EPOC mostraron los valores más altos de MMP-9 total (477 ± 262 ng/ml) y activa (178 ± 126 ng/ml) y los más bajos de TIMP-1 (1.044 ± 1.036 ng/ml). Globalmente, la ratio mostró una relación inversa con el volumen espiratorio forzado en el primer segundo. Dicha relación fue aún superior con la MMP-9 activa y con el grado de tabaquismo.

CONCLUSIONES: Los fumadores sanos presentaron una mayor concentración de MMP-9 total en relación con el grado de exposición tabáquica. Una ratio MMP-9 activa/TIMP-1 conservada en fumadores sanos podría explicar la ausencia de obstrucción progresiva de la vía aérea. La medida de la MMP-9 activa puede ser útil en la determinación del remodelado bronquial.

Palabras clave: Metaloproteína 9 (MMP-9). Remodelado bronquial. Fumadores sanos.

Markers of Airway Remodeling in Induced Sputum From Healthy Smokers

OBJECTIVE: Airway remodeling in chronic obstructive pulmonary disease (COPD) has been linked to the equilibrium between matrix metalloproteinase (MMP) 9 and its inhibitor, tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP) 1. However, that equilibrium has not been analyzed in healthy smokers. The aim of this study was to assess the equilibrium between MMP-9 and TIMP-1 in induced sputum from healthy smokers, healthy nonsmokers (controls), and patients with COPD.

PATIENTS AND METHODS: Samples of induced sputum were obtained from 35 individuals: 12 healthy smokers, 12 controls, and 11 patients with COPD. In each sample, a differential cell count was performed and enzyme-linked immunosorbent assays were used to analyze the concentrations of MMP-9 (total and active fraction) and TIMP-1.

RESULTS: Compared with controls, healthy smokers were found to have a higher mean (SD) concentration of total MMP-9 (273 [277] ng/mL vs 128 [146] ng/mL) and a higher ratio of total MMP-9 to TIMP-1 (0.16 [0.14] vs 0.08 [0.06]). However, the ratio of active MMP-9 to TIMP-1 was similar in the 2 groups. Samples from patients with COPD had the highest concentrations of total MMP-9 (477 [262] ng/mL) and active MMP-9 (178 [126] ng/mL) and the lowest concentrations of TIMP-1 (1.044 [1.036] μ g/mL). When all groups were considered together, there was an inverse relationship between the MMP-9/TIMP-1 ratio and the forced expiratory volume in the first second (FEV₁). The relationship between the active MMP-9/TIMP-1 ratio and FEV₁ was even stronger, and the relation of both ratios with FEV₁ became stronger still when smoking was considered.

CONCLUSIONS: Healthy smokers had a higher concentration of total MMP-9 and that concentration was correlated with their exposure to tobacco smoke. Maintenance of the active MMP-9/TIMP-1 ratio in healthy smokers may explain the absence of progressive airway obstruction. Measurement of active MMP-9 concentration could be useful for assessment of airway remodeling.

Key words: Matrix metalloproteinase 9. Airway remodeling. Healthy smokers.

Introducción

La mortalidad por enfermedad respiratoria atribuible al tabaco, sin incluir el cáncer de pulmón, se ha multiplicado en los últimos años y se ha convertido en un importante problema de salud¹. A pesar de ello, hoy día siguen sin conocerse con exactitud los efectos y la cronología de las alteraciones que se producen en la vía

Estudio financiado en parte por la Red Respira (RTIC 03/11).

Correspondencia: Dr. J. Belda.
 Clínica d'Asma i Al·lergia. Departament de Pneumologia.
 Hospital de la Santa Creu i de Sant Pau. Universitat Autònoma de Barcelona.
 St. Antoni M.^a Claret, 167. 08025 Barcelona. España.
 Correo electrónico: jbellda@santpau.es

Recibido: 18-5-2005; aceptado para su publicación: 15-11-2005.

aérea como consecuencia de la exposición al tabaco. Diversos trabajos han demostrado que la exposición al humo del tabaco induce estrés oxidativo celular y liberación de mediadores inflamatorios sobre las vías aéreas de sujetos sanos tanto de forma aguda como crónica^{2,3}. Esta alteración produciría en sujetos sensibles cambios estructurales en la pequeña vía aérea que provocarían el descenso progresivo de la función pulmonar. La aparición de una limitación crónica progresiva al flujo aéreo reflejaría en parte el denominado remodelado pulmonar que caracterizaría a la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC)⁴. Algunas enzimas, como la metaloproteínasa (MMP) 9, se han asociado con la EPOC, en la que un número creciente de estudios han descrito una sobreproducción local de MMP-9 y una alteración en el equilibrio entre ésta y su inhibidor, el inhibidor tisular de MMP tipo 1 (TIMP-1)^{5,6}. También se ha descrito su utilidad como marcador de remodelado^{7,8}.

Las MMP, y en particular la MMP-1, MMP-2 y MMP-9, son enzimas colagenasas que regulan la homeostasis de la matriz pulmonar, constituida mayoritariamente por colágeno y otras proteínas^{9,10}. El efecto directo que el tabaco tiene sobre estas enzimas es poco conocido. Finlay et al¹¹ describieron por primera vez el incremento de MMP-9 en la EPOC y, analizando el lavado broncoalveolar de una muestra pequeña de fumadores, encontraron valores elevados en un subgrupo de ellos. Más recientemente Kang et al¹² describieron una mayor expresión de MMP-9 en los extractos de biopsia bronquial de sujetos fumadores, en comparación con los no fumadores, y que se relacionaba con el número de cigarrillos consumidos. Recientemente se ha planteado que sería el equilibrio entre estas proteasas y sus inhibidores lo que mejor reflejaría o se relacionaría con la intensidad de la enfermedad⁷. Apenas disponemos de datos sobre el TIMP-1 en fumadores para poder estudiar el efecto del tabaco sobre los cambios estructurales.

El objetivo de este estudio ha sido determinar el equilibrio entre MMP-9 y TIMP-1 en muestras de esputo inducido de sujetos sanos fumadores y compararlo con el de sujetos sanos no fumadores. Como referencia se incluyó un tercer grupo de sujetos con enfermedad pulmonar por tabaquismo (grupo con EPOC). Además se determinó la fracción activa de la MMP-9 y se analizó si añadía nueva información a la de la total.

Pacientes y métodos

Selección de pacientes

Se reclutó a 37 voluntarios, entre los que hubo 26 sujetos sanos, 13 fumadores y 13 no fumadores, además de 11 pacientes con EPOC. Los voluntarios sanos no fumadores se reclutaron mayoritariamente entre el personal sanitario del hospital. Los voluntarios sanos fumadores se reclutaron entre los sujetos que acudían a la clínica de deshabituación tabáquica y no habían iniciado dicho programa. Los pacientes con EPOC se reclutaron consecutivamente entre aquellos que acudían a consultas externas del Servicio de Neumología. Se informó a todos ellos de las características del estudio, que fue aceptado por el Comité de Ética de nuestro hospital, y firmaron el consentimiento informado. Se consideró voluntario sano aquel que no tenía antecedentes respiratorios de interés, cuyos valo-

res de espirometría forzada y prueba broncodilatadora estaban en el margen de referencia –Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica (SEPAR)¹³ y que no habían fumado nunca. Los voluntarios sanos fumadores, además, eran fumadores activos.

Los criterios de inclusión para el grupo EPOC fueron presentar una limitación crónica al flujo aéreo según la definición de GOLD (Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease)¹ y una prueba broncodilatadora negativa (< 12%) en fase estable (registrada en la historia clínica del paciente). Todos los pacientes reclutados siguieron su tratamiento habitual, que se mantuvo estable desde al menos un mes antes del estudio. Los criterios de exclusión para los pacientes con EPOC fueron la presencia de exacerbación de la enfermedad o infiltrados, bronquiectasias o paquipleuritis extensas en la radiografía simple de tórax, grave alcoholismo, neoplasia, incapacidad para colaborar o insuficiencia cardíaca, hepática o renal grave. En la tabla I se resumen las características clínicas y de función pulmonar de todos los grupos.

Diseño y métodos del estudio

Se diseñó un estudio transversal observacional para comparar 3 grupos de pacientes: sanos no fumadores (grupo control), sanos fumadores y pacientes con EPOC. A todos los sujetos se les realizaron una anamnesis, exploración física y una inducción del esputo según el método descrito más abajo. Las muestras se remitieron al laboratorio de citología, donde se procesaron de forma inmediata. El sobrenadante obtenido se congeló a –80 °C y se remitió al Laboratorio de Bioquímica para su posterior procesamiento.

Inducción del esputo. El esputo se indujo en los sujetos sanos siguiendo la técnica descrita por Belda et al^{14,15}, con una leve modificación, mediante la nebulización de suero salino al 3% durante 7 min a los 10 min de la administración de salbutamol (200 µg) en cámara espaciadora. Si no se conseguía esputo, se incrementaba progresivamente la concentración salina (al 4%, al 5%) cada 7 min. En el caso de los pacientes con EPOC estable se utilizaba suero salino isotónico de inicio. Si se toleraba bien y no se conseguía un esputo válido, se continuaba la nebulización con suero hipertónico al 3% durante 7 min, que se repetía otra vez si no daba resultado. Las partículas se generaban mediante un nebulizador ultrasónico (Omron NE U07) con un diámetro medio de 7 µm y un débito de 3 ml/s. Al inicio de cada período de inhalación y al final de la inducción se realizaba una espirometría de control por seguridad, según los criterios SEPAR. Posteriormente se instruyó al paciente acerca de las maniobras más adecuadas para expectorar de manera efectiva. Todos los pacientes se enjuagaban la cavidad oral y sonaban la nariz para evitar en lo posible la contaminación del esputo, que se recogía en un recipiente estéril.

Procesamiento del esputo. En un plazo máximo de 2 h, de la muestra expectorada obtenida se separaban los tapones de moco de la saliva. Los tapones de moco se homogeneizaban con un volumen equivalente a 4 veces su peso con una solución fresca de ditiotreitilol al 0,1%. Posteriormente se añadía el mismo volumen de una solución salina de tampón fosfato (PBS) y se filtraba la solución a través de una malla de nailon con un diámetro de 41 µm. De esta solución se separaban 10 µl para el estudio de la viabilidad y el resto se centrifugaba durante 10 min a 1.500 rpm para separar el sedimento celular del sobrenadante. El sedimento se extendía en un porta para su posterior análisis y el sobrenadante se congelaba a –80 °C.

Recuento celular diferencial. En el sedimento celular obtenido se calculó la viabilidad celular con la tinción del azul de

tripano, que se analizaba con un hemocitómetro en fresco, y se realizó el recuento celular diferencial (neutrófilos, macrófagos, eosinófilos, basófilos, linfocitos y células epiteliales bronquiales) con la tinción de May-Grünwald-Giemsa.

Estudio del sobrenadante. La concentración presente de MMP-9 total y activa y de TIMP-1 se determinó por un método de enzoinmunoanálisis (MMP-9 total y activa y TIMP-1; Biotrak ELISA System Ref RPN 2614, RPN 2634 y RPN 2611 del catálogo de Amershan Biosciences, Buckinghamshire, Reino Unido).

Análisis estadístico

Se utilizó el programa SPSS versión 10.0 (1999) en el análisis estadístico. La muestra se describió con los valores medios para cada variable y su desviación estándar. Las comparaciones de las medias entre los 3 grupos se evaluaron con el análisis no paramétrico para muestras independientes de Kruskal-Wallis, y para los contrastes entre parejas se utilizó la U de Mann-Whitney. Para las correlaciones entre variables se utilizó el coeficiente de correlación lineal de Spearman.

Resultados

De los 37 sujetos reclutados, de 2 individuos se obtuvo una muestra insuficiente. Las características antropométricas y funcionales de los 35 sujetos finalmente incluidos aparecen reflejadas en la tabla I.

Estudio de la metaloproteína 9 total y de la fracción activa

Los resultados de las determinaciones de MMP-9 en esputo se exponen en la tabla II. Los pacientes con EPOC mostraron concentraciones de MMP-9 total y activa significativamente mayores que los sanos fumadores o controles no fumadores (fig. 1). Asimismo, los fumadores sanos presentaron concentraciones superiores de MMP-9 total respecto al grupo control, aunque sin alcanzar la significación estadística. Dentro del grupo de fumadores, cuando se analizó exclusivamente la MMP-9 total de los sujetos cuya exposición tabáquica era igual o superior a 20 paquetes-año ($n = 9$), las tendencias observadas inicialmente alcanzaron significación ($F = 7,65$; $p < 0,002$); además, se observó una relación positiva entre los valores de MMP-9 y la intensidad del tabaquismo ($r = 0,63$; $p < 0,001$).

El valor de la fracción activa de la MMP-9 activa fue similar en ambos grupos de sanos. La forma activa presentó en general menor variabilidad en sus resultados que la MMP-9 total. Por otra parte, la fracción no activa (proforma y MMP-9 unida a los inhibidores, básicamente) fue diferente en todos los grupos y gradualmen-

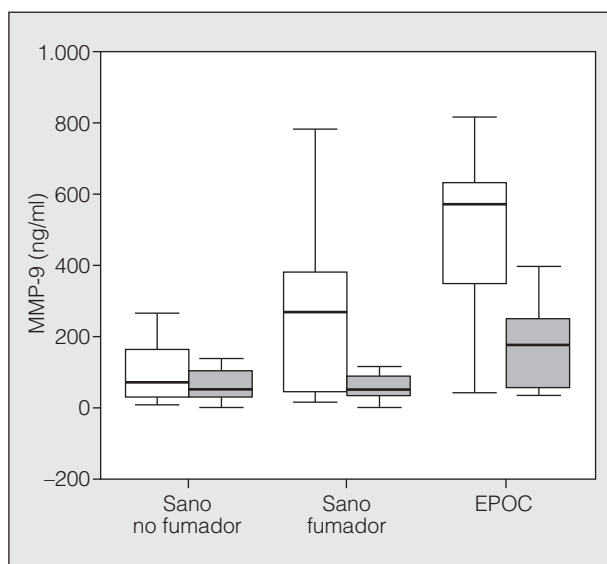


Fig. 1. Distribución de la metaloproteína 9 (MMP-9) total y activa por grupos de estudio. Barras blancas: MMP-9 total; barras sombreadas: MMP-9 activa. EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

te ascendente desde controles a enfermos. Esta fracción también se relacionó con el grado de tabaquismo ($r = 0,57$; $p = 0,001$).

Estudio de TIMP-1

La concentración de TIMP-1 se redujo progresivamente desde sanos a enfermos, aunque sin alcanzar diferencias significativas.

Relación metaloproteína 9/TIMP-1

El equilibrio entre los marcadores de remodelado de la vía aérea se ha definido por su ratio. Los pacientes con EPOC mostraron un ratio más alta que los sujetos sanos. El grupo de fumadores presentó un valor de la ratio intermedio entre el grupo control y el de EPOC (fig. 2). Al analizar la ratio MMP-9 activa/TIMP-1 se modificaron los resultados previos. Los sanos, fumadores o no, presentaron ratios similares, mientras que el grupo con EPOC siguió presentando ratios más elevadas (tabla II).

Relación entre marcadores de remodelado y obstrucción bronquial

Existió una relación significativa e inversa entre la ratio MMP-9/TIMP-1 y el volumen espiratorio forzado en el primer segundo, expresado como porcentaje del teórico ($FEV_1\%$), en todos los grupos ($r = -0,3$; $p = 0,02$).

TABLA I
Características clínicas de los sujetos del estudio

	Edad (años)	Sexo (V/M)	FEV ₁ (l)	FEV ₁ (% teórico)	Tabaquismo (paquetes/año)	Fumador activo
Sano control	32 ± 3	6/6	3,9 ± 0,9	106 ± 11	0	0
Sano fumador	34 ± 8	5/7	4,5 ± 1,1	103 ± 11	18 ± 9	12/12
EPOC	61 ± 11	9/2	1,1 ± 0,7	38 ± 21	54 ± 22	5/11

Los valores se expresan como media ± desviación estándar, excepto en el sexo. EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica; V: varones; M: mujeres; FEV₁: volumen espiratorio forzado en el primer segundo.

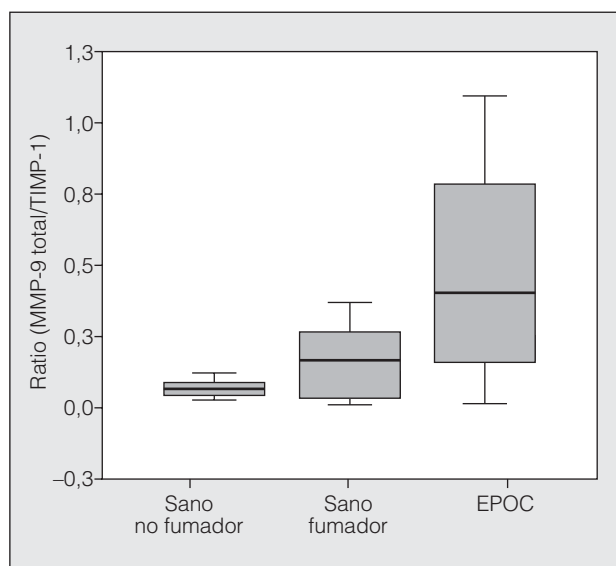


Fig. 2. Distribución de la ratio metaloproteinasa 9 (MMP-9)/inhibidor tisular de las metaloproteinasas tipo 1 (TIMP-1) por grupos de estudio. EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

Cuando analizamos aisladamente el grupo con EPOC, la relación fue superior ($r = -0,56$; $p = 0,002$) y mejoró al considerar el grado de tabaquismo ($r = -0,81$; $p < 0,0001$). Las relaciones entre ratio y FEV_1 fueron superiores a las halladas entre la MMP-9 y el FEV_1 .

Relación entre marcadores de remodelado e inflamación bronquial

El recuento celular diferencial no mostró diferencias significativas entre fumadores sanos y el grupo control (tabla II). Los pacientes con EPOC sí presentaron diferencias significativas en el número de neutrófilos y macrófagos respecto a los otros 2 grupos (tabla II).

La relación de los polimorfonucleares con la MMP-9 activa y la MMP-9 total fue: $r = 0,5$; $p = 0,003$, y $r = 0,68$; $p < 0,001$, respectivamente. La relación de la MMP-9 total aumentó con el grado de tabaquismo ($r = 0,82$; $p < 0,001$).

Discusión

Por lo que sabemos, éste es el primer estudio que cuantifica las MMP y sus inhibidores en el esputo indu-

cido de sujetos fumadores sin obstrucción al flujo aéreo, comparándolos con controles sanos y pacientes con EPOC. La concentración de MMP-9 en el esputo fue superior en fumadores sanos a la del grupo control. Los valores más altos de MMP-9 los presentó el grupo con EPOC. Contrariamente, la concentración de TIMP-1 fue menor en el grupo de enfermos. Por su parte, el equilibrio o ratio entre MMP-9 y su inhibidor mostró un incremento progresivo desde el grupo de sanos hasta el grupo con EPOC.

De manera congruente con los estudios que han analizado la presencia de MMP en el pulmón afectado de EPOC^{16,17}, los resultados en nuestros pacientes con EPOC también presentaron valores elevados de MMP-9. Además, los fumadores sanos presentaron una mayor concentración de MMP-9 respecto a los controles. En la bibliografía revisada sólo encontramos 2 trabajos que estudian la presencia de MMP-9 en fumadores sanos. Kang et al¹² observaron, mediante el estudio inmunohistoquímico de homogeneizado de biopsias pulmonares, una mayor presencia de MMP-9 en fumadores. Finlay et al¹¹ analizaron el lavado broncoalveolar de un grupo de fumadores sanos y encontraron valores elevados en algunos de ellos. Además, Lim et al¹⁸ observaron en estudios *in vitro* que los macrófagos alveolares de fumadores liberaban mayor concentración de MMP-9 que los de personas sanas. Los datos del presente estudio describen la elevación de la MMP-9 en el esputo inducido, con hallazgos coincidentes a los descritos. Sin embargo, se ha utilizado una técnica sencilla y fácilmente disponible en cualquier laboratorio¹⁹ que proporciona muestras de manera no invasiva.

Pocos estudios han analizado la concentración del TIMP-1 y los resultados son contradictorios. En el presente trabajo, los valores del TIMP-1 del grupo de enfermos son inferiores a los del grupo de fumadores, y los de éstos, a su vez, inferiores a los del grupo control. Dichos resultados coinciden con los de los estudios inmunohistoquímicos de Kang et al¹² realizados en biopsias, donde la presencia de TIMP-1 es menor en fumadores y, asimismo, disminuye si aparece obstrucción al flujo aéreo. Por otra parte, en estudios *in vitro*, tras estimular macrófagos alveolares procedentes de pacientes con EPOC, Russell et al²⁰ observaron una menor síntesis de TIMP-1 que en aquellos que provenían de sujetos sanos. Los resultados de Vignola et al⁸ en muestras de esputo mostraron diferencias: la producción de TIMP-1 era mayor en pacientes con EPOC que en personas sa-

TABLA II
Resultados de citología y marcadores de remodelado en esputo

	N.º total células ($\times 10^6/g$)	Viabilidad (%)	PMN (%)	Macrófagos (%)	Eosinófilos (%)	MMP-9 (ng/ml)	
						Total	Activa
Control	5.990 \pm 4.363	59 \pm 25	38 \pm 15	59 \pm 15	0,2 \pm 0,4	128 \pm 146	75 \pm 66
Sano fumador	9.914 \pm 9.301	69 \pm 14	53 \pm 18	40 \pm 17	1,7 \pm 3,1	273 \pm 277	88 \pm 106
EPOC	20.257 \pm 25.612	72 \pm 35	82 \pm 18*	14 \pm 17*	1,1 \pm 0,8	477 \pm 262*	178 \pm 124*
			($p < 0,001$)	($p = 0,001$)		($p = 0,015$)	($p = 0,032$)

Los valores se expresan como media \pm desviación estándar.

PMN: polimorfonucleares; MMP-9: metaloproteinasa 9; TIMP-1: inhibidor tisular de metaloproteinasas tipo 1.

*Significación estadística respecto a los demás grupos.

nas. El motivo de esta discrepancia podría residir en la diferente forma de procesar el esputo, que afectaría a las determinaciones del sobrenadante²¹. Además, los pacientes seleccionados por Vignola et al⁸ mostraron un menor grado de obstrucción (mediana de FEV₁%: 71) y una diferente exposición tabáquica.

Los escasos estudios que han determinado la ratio entre estos marcadores coinciden en que su medición es más representativa del grado de remodelado que cualquiera de las determinaciones por separado^{8,22}. Los resultados del presente estudio mostraron que la ratio era mayor en los pacientes con EPOC que en los controles, y que se relacionaba de manera inversa con el FEV₁. Esto indicaría una menor disponibilidad de TIMP-1 por molécula de MMP-9 y, por tanto, una mayor predisposición a la destrucción tisular^{23,24}, que favorecería el remodelado.

Por otra parte, cuando se calculó la ratio en función de los valores de la MMP-9 activa (MMP-9 activa/TIMP-1), el grupo con EPOC seguía mostrando igualmente una ratio elevada. Sin embargo, disminuía el valor obtenido en sanos fumadores hasta equipararse al del grupo control. Esto podría indicar que los fumadores sanos, a pesar de las diferentes concentraciones totales de enzimas, mantienen un mismo equilibrio que el grupo control, lo que les protegería de la aparición de obstrucción al flujo aéreo.

La forma activa de la MMP-9 en muestras pulmonares se ha estudiado generalmente de manera semicuantitativa mediante la cimetrografía²⁵. Veerney et al²⁶, que estiman la fracción activa de forma cuantitativa mediante ensayos de inmunocaptura específica, señalan que esta determinación podría ser más adecuada, ya que es la fracción que ejerce la función final de destrucción del tejido. Los resultados de la determinación de MMP-9 activa en nuestro estudio mediante enzimo-inmunoanálisis fueron más homogéneos que los de la MMP-9 total, presentando valores menos dispersos y relacionándose de manera más estrecha con índices de obstrucción bronquial.

Por otro lado, al analizar el efecto del tabaco sobre marcadores de remodelado bronquial se observó una relación estrecha entre el grado de tabaquismo y la expresión de MMP-9, lo que indicaría que el tabaco podría comportarse como estímulo directo en la patogenia del remodelado bronquial²⁷.

En resumen, el presente estudio demuestra que los sujetos fumadores sanos presentan unos valores de

MMP-9 y TIMP-1 intermedios entre los encontrados en pacientes con EPOC y los sujetos sanos no fumadores, en relación con el número de cigarrillos fumados. La mayor presencia de enzimas en la vía aérea podría desempeñar un papel en las alteraciones histológicas en fumadores. Sin embargo, el equilibrio entre estas proteasas y sus inhibidores en fumadores sanos es similar al de sujetos sanos, lo cual podría explicar la ausencia de cambios suficientes para condicionar una obstrucción crónica al flujo aéreo. Más estudios, de diseño preferentemente longitudinal, deberían contestar si dichas alteraciones cumplen alguna función en el pronóstico de la enfermedad.

BIBLIOGRAFÍA

1. Pauwels RA, Buist AS, Calverley PM, Jenkins CR, Hurd SS; GOLD Scientific Committee. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. NHLBI/WHO Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) Workshop summary. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;163:1256-76.
2. Van der Vaart H, Postma DS, Timens W, Hylkema MN, Willemse BW, Boezen HM, et al. Acute effects of cigarette smoking on inflammation in healthy intermittent smokers. *Respir Res.* 2005; 6:22.
3. McCrea KA, Ensor JE, Nall K, Bleecker ER, Hasday JD. Altered cytokine regulation in the lungs of cigarette smokers. *Am J Respir Crit Care Med.* 1994;150:696-703.
4. Jeffery PK. Remodeling in asthma and chronic obstructive lung disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;16:S28-S38.
5. Jeffery PK, Laitinen A, Venge P. Biopsy markers of airway inflammation and remodelling. *Respir Med.* 2000; 94 Suppl F:9-15.
6. Beeh KM, Beier J, Kornmann O, Buhl R. Sputum matrix metalloproteinase-9, tissue inhibitor of metalloproteinase-1, and their molar ratio in patients with chronic obstructive pulmonary disease, idiopathic pulmonary fibrosis and healthy subjects. *Respir Med.* 2003;97:634-9.
7. Vignola AM, Riccobono L, Mirabella A, Profita M, Chanez P, Bellia V, et al. Sputum metalloproteinase-9/tissue inhibitor of metalloproteinase-1 ratio correlates with airflow obstruction in asthma and chronic bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998;158:1945-50.
8. Vignola AM, Paganin F, Capiou L, Scichilone N, Bellia M, Maaikel L, et al. Airway remodelling assessed by sputum and high-resolution computed tomography in asthma and COPD. *Eur Respir J.* 2004;24:910-7.
9. Atkinson JJ, Senior RM. Matrix metalloproteinase-9 in lung remodeling. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2003;28:12-24.
10. Nagase H, Woessner JF. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem.* 1999;274:21491-4.
11. Finlay GA, Russell KJ, McMahon KJ, D'Arcy EM, Masterson JB, FitzGerald MX, et al. Elevated levels of matrix metalloproteinases in bronchoalveolar lavage fluid of emphysematous patients. *Thorax.* 1997;52:502-6.
12. Kang MJ, Oh YM, Lee JC, Kim DG, Park MJ, Lee MG, et al. Lung matrix metalloproteinase-9 correlates with cigarette smoking and obstruction of airflow. *J Korean Med Sci.* 2003;18:821-7.
13. Sanchis J, Casan P, Castillo J, González N, Palenciano L, Roca J. Normativa para la práctica de la espirometría forzada. *Arch Bronconeumol.* 1989;25:132-42.
14. Belda J, Leigh R, Parameswaran K, O'Byrne PM, Sears MR, Hargreave FE. Induced sputum cell counts in healthy adults. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;161:475-8.
15. Belda J, Giner J, Casan P, Sanchis J. El esputo inducido en asma: validación y repetibilidad. *Arch Bronconeumol.* 1997;33:325-30.
16. Cataldo D, Munaut C, Noel A, Francken F, Bartsch P, Foidart JM, et al. MMP-2- and MMP-9-linked gelatinolytic activity in the sputum from patients with asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Int Arch Allergy Immunol.* 2000;123:259-67.

TIMP-1 (ng/ml)	Ratio	Ratio activa
1.579 ± 1.015	0,08 ± 0,06	0,05 ± 0,04
1.927 ± 1.306	0,16 ± 0,14	0,06 ± 0,06
1.444 ± 1.036	0,56 ± 0,6* (p = 0,017)	0,17 ± 0,13* (p = 0,005)

17. Segura-Valdez L, Pardo A, Gaxiola M, Uhal BD, Becerril C, Selman M. Related articles, links upregulation of gelatinases A and B, collagenases 1 and 2, and increased parenchymal cell death in COPD. *Chest*. 2000;117:684-94.
18. Lim S, Roche N, Oliver BG, Mattos W, Barnes PJ, Chung KF. Balance of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 from alveolar macrophages in cigarette smokers. Regulation by interleukin-10. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;162:1355-60.
19. Belda J. El esputo inducido como procedimiento diagnóstico y de seguimiento de las enfermedades respiratorias. *Arch Bronconeumol*. 2001;37:271-3.
20. Russell RE, Culpitt SV, DeMatos C, Donnelly L, Smith M, Wiggins J, et al. Release and activity of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 by alveolar macrophages from patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2002;26:602-9.
21. Djukanovic R, Sterk PJ, Fahy JV, Hargrave FE. Standardised methodology of sputum induction and processing. *Eur Respir J*. 2002;20:S1-S55.
22. Xu XM, Sun TY, Lin JB, Zhang HS. The role of matrix metalloproteinases-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in chronic obstructive pulmonary disease. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 2003;10:1138-41.
23. Mao JT, Tashkin DP, Belloni PN, Baileyhealy I, Baratelli F, Roth MD. All-trans retinoic acid modulates the balance of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in patients with emphysema. *Chest*. 2003;124:1724-32.
24. Parks WC, Shapiro SD. Matrix metalloproteinases in lung biology. *Respir Res*. 2001;2:10-9.
25. Ohnishi K, Takagi M, Kurokawa Y, Satomi S, Kontinen YT. Matrix metalloproteinase-mediated extracellular matrix protein degradation in human pulmonary emphysema. *Lab Invest*. 1998;78:1077-87.
26. Vernooy JH, Lindeman JH, Jacobs JA, Hanemaaijer R, Wouters EF. Increased activity of matrix metalloproteinase-8 and matrix metalloproteinase-9 in induced sputum from patients with COPD. *Chest*. 2004;126:1802-10.
27. Kirkham PA, Spooner G, Rahman I, Rossi AG. Macrophage phagocytosis of apoptotic neutrophils is compromised by matrix proteins modified by cigarette smoke and lipid peroxidation products. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;318:32-7.