



**Universidad
de Cartagena**
Fundada en 1827



Universidad De Cartagena
Instituto de Investigaciones Inmunológicas

**Análisis de los niveles de NGAL y YKL-40 como
biomarcadores de la respuesta inflamatoria en el
fenotipo de superposición EPOC/Asma**

**Trabajo de grado para optar por el título de Magíster en
Inmunología**

Realizado por:

Bayron Mijail Zelaya Vallecillo

Tutora:

Nathalie Acevedo Caballero MD., PhD.

21 de octubre de 2021

Cartagena de Indias, Bolívar Colombia

A mi hija que es mi motor para salir adelante siempre. A Wendy Meza por apoyarme de manera incondicional. También, a mi familia que ha vigilado y apoyado mis pasos desde pequeño y en especial a mi madre que me ha enseñado el valor de la perseverancia y la lucha.

Tabla de contenido

1. Resumen.....	10
2 Introducción	12
3. Marco conceptual	13
3.1 Superposición EPOC/asma (ACO).....	13
3.2 La respuesta inflamatoria en la superposición EPOC/asma.	15
3.4 Células de sangre periférica que participan en la fisiopatología de las enfermedades respiratorias.	17
3.4.1 Neutrófilos.....	17
3.4.2 Monocitos.....	20
3.4.3 Linfocitos.....	20
4. Cociente neutrófilos/linfocitos (NLR).....	22
5. Proteínas inflamatorias en plasma derivadas de neutrófilos y monocitos	23
5.1 Lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos (NGAL).....	23
5.2 Proteína 1 similar a quitinasa 3 (CHI3L1) o YKL-40.....	26
6. Hipótesis	29
7. Objetivos.....	29
7.1 Objetivo General	29
7.2 Objetivos específicos	29
8. Metodología.....	30
8.1 Diseño del estudio.....	30
8.2 Población en estudio y tamaño de muestra.....	30
8.3 Los criterios de inclusión, exclusión y selección de los controles del proyecto.....	30
8.4 Conteo de células y el cociente neutrófilos/linfocitos (NLR)	31
8.5 Medición de NGAL y YKL-40	31
8.6 Cuantificación de proteínas mediante Olink	33
8.7 Análisis estadísticos.....	34
8.8. Consideraciones éticas	35
9. Resultados.....	36
9.1 Características de la población del estudio	36
9.2 Distribución de las variables	37
9.3 Análisis de biomarcadores de la respuesta inflamatoria en los diferentes grupos.	38
9.3.1 YKL-40.....	38
9.3.2 Correlación entre los niveles de YKL-40 y leucocitos en sangre.	39
9.3.3 NGAL	40

9.3.4	Correlación entre los niveles de NGAL y leucocitos en sangre.....	40
9.4	Comparación de los niveles de leucocitos en sangre periférica entre los diferentes grupos	41
9.5	Asociación de biomarcadores con variables clínicas y demográficas.....	42
9.5.1	Sub análisis de correlación entre los niveles de YKL-40 y el conteo de células de sangre periférica y el grupo ACO.....	43
9.5.2.	Análisis de correlación entre YKL-40 y parámetros de función pulmonar en el grupo ACO.....	44
9.5.3	Sub análisis de asociación entre los niveles de NGAL y el conteo de células de sangre periférica en el grupo ACO.....	44
9.5.4	Análisis de correlación entre NGAL y parámetros de función pulmonar en el grupo ACO.....	45
9.5.5	Correlación entre leucocitos de sangre periférica y parámetros de función pulmonar en el grupo ACO.....	45
9.6	Análisis de regresión lineal	47
9.7	Análisis de área bajo la curva (AUC) para YKL-40, NGAL y los conteos de leucocitos.....	48
9.8	Análisis de Proteínas inflamatorias en el grupo ACO	52
10.	Discusión	54
11.	Agradecimientos.....	58
12.	Referencias	59
13.	Anexos.....	67

Índice de tablas

Tabla 1. Proteínas en los gránulos y vesículas secretoras de los neutrófilos.

Tabla 2. Datos descriptivos de la población en estudio.

Tabla 3. Diferencias entre los valores de los biomarcadores por ciudad en cada grupo.

Tabla 4. Correlación YKL-40, NGAL y variables clínicas en el grupo ACO.

Tabla 5. Correlación entre células de sangre periférica y variables clínicas en el grupo con ACO.

Tabla 6. Análisis de regresión lineal entre los biomarcadores.

Tabla 7. Datos de correlación de Spearman (ρ) entre YKL-40, NGAL y las proteínas inflamatorias en el grupo ACO.

Tabla 8. Datos de correlación de Spearman (ρ) entre YKL-40, NGAL y las proteínas inflamatorias en el grupo EPOC.

Índice de Figuras

Figura 1. Clasificación de los fenotipos de ACO, en A) se muestran los 4 fenotipos de ACO propuestos y en B) se observan los 4 fenotipos de ACO según las características clínicas.

Figura 2. Interacción celular y molecular de la respuesta inmunológica en las vías respiratorias en pacientes con asma, EPOC y ACO.

Figura 3. Interacción entre células que participan en el daño tisular en las enfermedades respiratorias. Se observan los neutrófilos como células centrales en la patología y que son activadas por los linfocitos Th1 y Th17. Se observa también como estímulos infecciosos y no infecciosos activan macrófagos e inician la migración celular y la inflamación en pulmón

Figura 4. Estructura tridimensional del dominio de “*lipocalin*”, de la familia de lipocalinas de la cual hace parte la NGAL. Tomado de Pfam (*Accession number*: PF08212).

Figura 5. Vías de regulación de la expresión de lipocalina asociada a la gelatinasa del neutrófilo (**NGAL**). Las proteínas como IL-1, IGF-1 regulan la expresión NGAL al alza y las vías de señalización de las quinasas y del NF κ B inician el proceso de síntesis. **IL-1**: Interleuquina 1, **TGF- α** : Factor de crecimiento transformante alfa, **TNF- α** : Factor de necrosis tumoral alfa, **IGF-1**: Factor de crecimiento insulínico tipo 1, **PI3K**: Fosfoinositol 3 quinasa, **PDK-1**: Quinasa dependiente de fosfoinositol 1, **AKT**: Proteína quinasa B, **I κ B**: Inhibidor de κ B, **NF- κ B**: Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras κ de los linfocitos B activados, **MMP**: Metaloproteínasa de matriz. Elaborado por Bayron Zelaya en Biorender.

Figura 6. A: Estructura tridimensional de la proteína YKL-40, en donde se observa la cadena alfa en donde encuentran sus dos sitios activos. Tomado de UniProt (*Accesion number* P36222).

Figura 7. Acciones de la YKL-40 en la célula inflamatoria en ambiente pulmonar. **INF- γ** : Interferón gamma, **IL-1 β** : Interleuquina 1 beta, **STAT 1**: Transcriptor de señales y activador de transcripción 1, **p38**; proteína quinasa p38 activada por mitogeno, **NF- κ B**: Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras κ de los linfocitos B activados, **PI3K**: Fosfoinositol 3 quinasa, **PDK-1**: Quinasa dependiente de fosfoinositol 1, **AKT**: Proteína quinasa B. Elaborado por Bayron Zelaya en Biorender.

Figura 8. Representación gráfica de los valores de NLR de acuerdo a la cantidad de neutrófilos o linfocitos en sangre periférica en los pacientes. Elaborado por Bayron Zelaya en Biorender.

Figura 9. ELISA tipo sandwich para la detección de YKL-40 y NGAL en plasma humano. Se puede observar el anticuerpo de captura en rojo unido a la fase solida (placa de poliestireno) “capturando” el antígeno en la muestra (YKL-40 o NGAL según sea el kit). Un segundo anticuerpo marcado con biotina reconoce también a la proteína ya unida al primer anticuerpo. La enzima peroxidasa de rábano picante (HRP) con estreptavidina se une al anticuerpo biotinilado para formar un conjugado que es capaz de degradar el sustrato (Peróxido de hidrogeno) para dar color que pueda ser medible. Elaborado por Bayron Zelaya en Biorender.

Figura 10. Pasos del ensayo de extensión por proximidad. A) Preamplificación: las muestras fueron incubadas con sondas PEA. B) Amplificación mediante PCRq en un chip de tecnología microfluídica. Figura elaborada por Bayron Zelaya desde Biorender.

Figura 11. Histogramas de distribución de los niveles de biomarcadores analizados en el estudio. A) Proteína 1 similar a la quitinasa 3 (YKL-40), B) Lipocalina asociada a la gelatinasa del neutrófilo (NGAL), C) Neutrófilos (células/ μ l), D): Monocitos (células/ μ l), E) Linfocitos (células/ μ l), F) Cociente neutrófilos/linfocitos (NLR).

Figura 12. Comparación entre niveles de YKL-40 (ng/ml) entre pacientes con Asma, ACO, EPOC y grupo control. **YKL-40**: Proteína 1 similar a la quitinasa 3, **ACO**: Superposición EPOC/asma, **EPOC**: Enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

Figura 13. Gráfica de correlación de Spearman (ρ) entre YKL-40 y las células de sangre periférica. A) correlación YKL-40 y los monocitos, B): correlación YKL-40 y porcentaje de neutrófilos. Cel/ μ l = número absoluto de células/ μ l.

Figura 14. Comparación entre niveles de NGAL en pacientes con asma, ACO, EPOC y grupo control. **NGAL**; Lipocalina asociada a la gelatinasa del neutrófilo, **ACO**: Superposición EPOC/asma, **EPOC**: Enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

Figura 15. Gráfica de correlación de Spearman (ρ) entre NGAL y células de sangre periférica. A) NGAL y los conteos de neutrófilos, B) NGAL y los conteos de monocitos.

Figura 16. Se observa las gráficas comparativas de los niveles celulares en la población en estudio. A) recuento de linfocitos, B) recuento de neutrófilos, C) recuento de monocitos y D) NLR. **NLR:** cociente neutrófilos linfocitos, **ACO:** Superposición EPOC/asma, **EPOC:** Enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

Figura 17. Gráfica de correlación de Spearman (ρ) entre YKL-40 y células de sangre periférica en el grupo con ACO. A) se puede observar la correlación entre YKL-40 y el porcentaje de neutrófilos, B) Correlación entre YKL-40 y el número de monocitos (Cel/ μ l).

Figura 18. Grafico de dispersión se muestra la correlación de Spearman (ρ) entre YKL-40 y los valores de función pulmonar en el grupo de pacientes con ACO.

Figura 19. Gráfica de correlación de Spearman (ρ) entre NGAL y células de sangre periférica en el grupo con ACO, A) correlación entre NGAL y el número de neutrófilos, B) correlación entre NGAL y el número de monocitos (Cel/ μ l).

Figura 20. Gráfica de correlación de Spearman (ρ) entre A) NGAL y la edad, B) NGAL y el %FEV₁/FVC post broncodilatador.

Figura 21. Gráfica que muestran la correlación de Spearman (ρ) entre A) puntaje CAT vs linfocitos, B) %FEV₁/FVC post BD vs monocitos, C) %FEV₁/FVC post BD vs porcentaje de neutrófilos.

Figura 22. Gráficas de correlación de Spearman (ρ) entre A) NLR y la IgE total, B) NLR y función pulmonar y C) NLR y la edad.

Figura 23. Curva característica operativa del receptor (ROC) con biomarcadores inflamatorios; YKL-40, NGAL, NLR, número de monocitos, número de neutrófilos y número de linfocitos para diferenciar ACO de los sujetos control.

Figura 24. Curva de características operativas del receptor (ROC) con biomarcadores inflamatorios YKL-40, NGAL, NLR, número de monocitos, número de neutrófilos, número de linfocitos para diferenciar los pacientes con ACO de los pacientes con asma.

Figura 25. Curvas de características operativas del receptor (ROC) con biomarcadores inflamatorios A: NGAL, B: YKL-40, C: NLR. Cada una de las gráficas detalla la sensibilidad y especificidad del biomarcador (percentiles de 50% para YKL-40 y NLR y de 25% para NGAL) para diferenciar ACO de asma.

Figura 26. Curvas de características operativas del receptor (ROC) de biomarcadores inflamatorios YKL-40, NGAL, NLR, número de monocitos, número de neutrófilos, número de linfocitos para diferenciar los pacientes con ACO de pacientes con EPOC.

Abreviaturas

ACO Superposición EPOC/asma

ADN y ARN Ácido desoxirribonucleico y ácido ribonucleico

CXCL Ligando de quimiocina con motivo CXC

EPOC Enfermedad pulmonar obstructiva crónica

ELISA Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima “enzyme-linked immunosorbent assay”

GOLD Iniciativa global para la enfermedad obstructiva crónica

GINA Iniciativa global para el asma

Ges-EPOC Guía española para la enfermedad obstructiva crónica

IgM Inmunoglobulina M

IL Interleuquina

INF Interferón

ILC Célula linfoide innata

FGF Factor de crecimiento fibroblástico

FEV₁ Volumen expiratorio forzado en el primer segundo

MIP 1 Proteína inflamatoria del macrófago1 alfa

MCP Proteínas quimioatrayente de monocitos

MMP Metaloproteinasa de matriz

NGAL Lipocalina asociada a gelatinasa del neutrófilo

NLR Cociente neutrófilos/linfocitos

Th Linfocitos T ayudadores

TNF- α Factor de necrosis tumoral alfa

TSLP Linfopoyetina del estroma tímido

YKL-40 Proteína 1 similar a la quitinasa 3

ROS Especies reactivas de oxígeno.

TNF Factor de necrosis tumoral

BAFF Factor activador de células B

APRIL Ligando inductor de proliferación

CAT Test de evaluación de calidad de vida

ACQ-5 Cuestionario de control del asma-5

SGRQ Cuestionario respiratorio Saint George

FVC Capacidad vital forzada

Cel/ μ l Células por microlitro

1. Resumen

Se estima que el fenotipo de superposición EPOC/asma (ACO) afecta aproximadamente al 20% de los pacientes con asma y a más del 30 % de los pacientes con EPOC. El estudio de este fenotipo ACO no solo es de gran interés teórico por las posibles vías inflamatorias que pudieran estar involucradas en su patogénesis sino por las repercusiones que tiene en los individuos que lo padecen. Se sabe que los pacientes con ACO sufren deterioro importante en la calidad de vida, ya que presentan síntomas respiratorios más fuertes, más disnea, más sibilancias, y niveles reducidos de actividad física. Además, el ACO se asocia con exacerbaciones más frecuentes, mayor tasa de hospitalización y mayores costos de atención médica que el asma o la EPOC por sí solas.

El objetivo de este trabajo de grado fue analizar los niveles de las proteínas NGAL y YKL-40 en plasma como biomarcadores de la respuesta inflamatoria en el fenotipo ACO. Para ello se midieron estos marcadores en el plasma de 397 individuos que incluían 100 controles, 100 pacientes con EPOC, 74 pacientes con ACO y 123 pacientes con asma. También se analizó la relación entre los niveles de esos marcadores con los conteos de leucocitos en sangre periférica y 67 proteínas indicadoras de inflamación en el plasma. Los resultados mostraron que los niveles de YKL-40 y NGAL no difieren entre los pacientes con ACO y los pacientes con EPOC. Además, encontramos que, si bien NGAL mostró diferencias significativas en sus niveles entre los asmáticos y los pacientes con ACO, los análisis de área bajo la curva (AUC) mostraron que NGAL no tiene la capacidad de diferenciar esos dos fenotipos con una AUC > 0.70. Otro hallazgo importante en este estudio fue la observación de que ninguno de los conteos de leucocitos circulantes ya sean linfocitos, neutrófilos o monocitos mostraron diferencias entre los pacientes con ACO y los pacientes con EPOC o con asma. Sin embargo, cuando se analizó el cociente neutrófilos/linfocitos (NLR) se encontró que este era más alto en pacientes con ACO comparado con pacientes con asma y pudiera ser considerado dentro de los marcadores que pudieran ayudar a distinguir estos dos fenotipos. Los análisis de regresión corrigiendo por edad y género confirmaron que NGAL se asocia con ACO, mientras que la asociación con YKL-40 desaparece después de la corrección. Los niveles de la proteína YKL-40 se correlacionaron con otras proteínas en el plasma siendo las más significativas CST5, IL-10RB, OPG y VEGFA mientras que las correlaciones más significativas para los niveles de NGAL se encontraron con IL6, OSM, PD-L1, TNF, CCL23, CD40, EN-RAGE y TGF-alfa. Cabe destacar que algunas de esas proteínas han sido asociadas al fenotipo ACO y en este estudio se pudo evidenciar por ejemplo la relación de los niveles de NGAL con CCL23, CCL25, EN-RAGE e IL-6. También se encontró que los niveles de NGAL y YLK-40 son directamente proporcionales a los conteos de monocitos y neutrófilos en sangre periférica. En conclusión, los biomarcadores NGAL y YLK-40 por si solos no

tienen la capacidad de diferenciar a los pacientes con el fenotipo ACO de aquellos con asma y EPOC. Sin embargo, se observan diferencias en sus niveles cuando se comparan los pacientes con ACO con los controles sanos y se encontraron relaciones entre esas proteínas y los parámetros de función pulmonar, con el número de leucocitos y con los niveles de otros mediadores inflamatorios. Este estudio también confirma el aumento significativo de YLK-40 y de NGAL en pacientes con EPOC comparado con controles sanos sugiriendo que esas proteínas pudieran estar involucradas en su fisiopatología. Se requieren estudios futuros donde todos estos datos puedan ser analizados en combinación y empleando herramientas integrativas con el fin de aumentar su sensibilidad y especificidad. Los resultados también sugieren que el fenotipo ACO si bien tiene ciertas diferencias con la EPOC, son ambas entidades indistinguibles en términos de los mediadores analizados aquí y sugiere que el ACO pudiera ser más un fenotipo del EPOC que una entidad en sí misma como.

.

2 Introducción

En las últimas décadas la tendencia de las enfermedades respiratorias va al alza, el crecimiento del índice de morbilidad y mortalidad ha hecho que sean consideradas problemas de salud pública prioritarios¹, ya que contribuyen hasta en un 8% de muertes, especialmente en niños y adultos mayores². El asma y la EPOC se han descrito como las dos enfermedades respiratorias más comunes, afectando en conjunto a más de 500 millones de personas y con una tasa de mortalidad que va en aumento³. Hay una cantidad considerable de pacientes que sufren sintomatología de ambas enfermedades, una condición llamada superposición EPOC/asma (ACO), esta es una afección que puede estar presente en pacientes con asma, así como en pacientes con EPOC. No hay un consenso sobre la clasificación, el diagnóstico y el tratamiento de ACO, y por razones que aún no están claras los pacientes que la sufren tienden a empeorar su calidad de vida, por aumento de las exacerbaciones, hospitalizaciones y la respuesta al tratamiento⁴. Los mecanismos inflamatorios de esta enfermedad pueden variar desde una respuesta inflamatoria de tipo 2 con eosinofilia a una respuesta neutrofílica y de linfocitos T CD8⁺⁵. Esta heterogeneidad de la enfermedad lleva a la necesidad de una investigación más detallada sobre los mecanismos inflamatorios subyacentes.

Los mecanismos patogénicos en el ACO no están bien comprendidos y en los últimos años se ha observado que mecanismos inflamatorios que van más allá de la inflamación alérgica son de importancia en la patogénesis del asma y del ACO. Esos mecanismos involucran linfocitos T del perfil Th1 y Th17, infiltrado neutrofílico, monocitos y macrófagos, también la secreción de citoquinas y mediadores como la interleuquina 8 (IL-8), la IL-1 beta (IL-1 β), el ligando de quimiocina 1 (CXCL1), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), metaloproteinasas de matriz (MMP), el interferón gamma (INF- γ) y la IL-6 de conjunto denominados inflamación no tipo 2. En ACO, los biomarcadores (INH) basados en la inflamación no están totalmente identificados y es necesario evaluar si existe un perfil inflamatorio característico⁶. Se ha identificado que la lipocalina asociada a la gelatinasa de neutrófilos (NGAL), la proteína 1 similar a la quitinasa 3 o YKL-40 y el cociente de neutrófilos/linfocitos (NLR) pueden ser de utilidad en el diagnóstico de ACO⁷. Las proteínas YKL-40 y NGAL están fuertemente asociadas a la inflamación con aumento de neutrófilos, macrófagos y monocitos en sangre periférica, también con la presencia elevada de linfocitos Th1, Th17, así como con linfocitos T CD8⁺, y el aumento de MMP, la IL-8 y el

TNF- α ⁸. Sin embargo, muy pocos estudios se han desarrollado para clarificar la importancia de estos biomarcadores en nuestro ámbito.

También es necesario evaluar la relación entre las proporciones celulares y los niveles de estos marcadores en sangre especialmente las relaciones entre la frecuencia de neutrófilos, linfocitos y monocitos con diversas proteínas plasmáticas.

3. Marco conceptual

Las enfermedades crónicas respiratorias afectan los pulmones y las vías respiratorias, e incluyen el asma, las alergias respiratorias, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), la enfermedad pulmonar ocupacional, la hipertensión pulmonar, la rinosinusitis crónica, sarcoidosis, fibrosis pulmonar, y el síndrome de apnea del sueño. Estas enfermedades constituyen una importante causa de mortalidad y morbilidad y se sabe que su prevalencia va en aumento, por lo que representan un problema de salud pública. Estas enfermedades se caracterizan por la inflamación de las vías respiratorias dando lugar a complicaciones como tos, sibilancias y dificultad para respirar, afectando en gran medida la calidad de vida de los pacientes⁹⁻¹².

El asma y la EPOC son las enfermedades crónicas respiratorias más comunes, la carga global de estas enfermedades está aumentando, y se estimó que cada una de ellas afecta respectivamente a aproximadamente 339 millones y 251 millones de personas en todo el mundo¹³. Son enfermedades inflamatorias heterogéneas con etiología y fisiopatología distintas y que dan lugar a varios fenotipos. Estas dos enfermedades pueden presentarse en algún momento en un mismo paciente en una condición conocida como superposición EPOC/asma (ACO)¹⁴.

3.1 Superposición EPOC/asma (ACO)

El término se introdujo a principios del siglo XXI y se refiere a una condición que se ve en pacientes con EPOC los cuales tienen síntomas de asma y en pacientes con asma los cuales tienen síntomas de EPOC¹⁵. La guía conjunta GINA-GOLD describe ACO como *“La limitación persistente del flujo de aire con varias características generalmente asociadas con el asma y varias características generalmente asociadas con EPOC, por lo tanto, ACO es identificada por las características que estas dos entidades comparten”*¹⁶. Estudios establecen que la prevalencia de ACO en población general ronda entre el 1-5%. La prevalencia en pacientes con EPOC oscila entre el 17 al 27% dependiendo los criterios clínicos utilizados, llegando a alcanzar hasta el 53% en algunos estudios¹⁷⁻¹⁹. Se sabe que los pacientes con ACO sufren deterioro importante en la calidad de vida, ya que presentan síntomas respiratorios más fuertes, más disnea, sibilancias, y niveles reducidos de actividad física¹⁹. El ACO se presenta con exacerbaciones más frecuentes, mayor tasa de hospitalización y mayores costos de atención médica que asma y EPOC por sí solas¹⁸.

Existen varias pautas para el diagnóstico de ACO, la guía Ges-EPOC establece que se debe de cumplir el diagnóstico de EPOC, es decir, pacientes con más de 35 años y con exposición significativa al tabaquismo o algún otro agente inhalado, síntomas respiratorios persistentes y limitación del flujo aéreo. Una vez que se establece el diagnóstico de EPOC el paciente debe cumplir los criterios de diagnóstico de asma. Cuando se cumple el diagnóstico de EPOC y asma el paciente es diagnosticado con ACO ¹⁵. Si el paciente aún no es diagnosticado como paciente asmático, se continua con una prueba broncodilatadora del volumen espiratorio forzado en el primer segundo (FEV₁) y/o una eosinofilia en sangre periférica²⁰. GINA-GOLD también desarrollo una pauta en la que el diagnostico de ACO se inicia con la identificación de antecedentes de enfermedad respiratoria (infecciones recurrentes, tos crónica, producción de esputo) y luego las características de asma o EPOC que mejor describan al paciente (edad de inicio, patrón de síntomas, resultados de pruebas de función pulmonar y rayos x)²¹.

Muchos autores describen ACO como un fenotipo de EPOC, pero la inflamación tipo 2 y eosinofilia asociada al asma juegan un papel importante en un porcentaje de pacientes con ACO. Sugiriendo que no se limita únicamente a un fenotipo de EPOC²². ACO se puede describir como una enfermedad heterogénea, ya que incluye pacientes con diferentes formas de enfermedad de las vías respiratorias y que presentan un rango de mecanismos fisiológicos diferentes. Estos fenotipos están asociados a factores ambientales y algunos estudios han encontrado polimorfismos en genes como *CSMD1*, *SOX5* y *GPR65* asociados a la enfermedad ²³.

Los pacientes con ACO presentan un amplio espectro de síntomas y para detallar mejor la heterogeneidad de ACO Rhee *et al.*, propusieron una clasificación de fenotipos (**Figura 1**) basada en las observaciones de la heterogeneidad clínica, entre ellos; 1) El fenotipo **A** alérgico con eosinofilia, 2) el fenotipo **B** no alérgico asociado a asma no eosinofílica grave con neutrofilia y sin antecedentes de tabaquismo, 3) el fenotipo **C** es el más compatible con el fenotipo descrito en las guías GINA-GOLD y Ges-EPOC que describen superposición ya que son pacientes con antecedentes de asma de aparición temprana y con antecedentes de tabaquismo y por último el fenotipo **D**, que se presenta con EPOC pura, sin antecedentes de asma pero con hiperreactividad bronquial ²⁴.

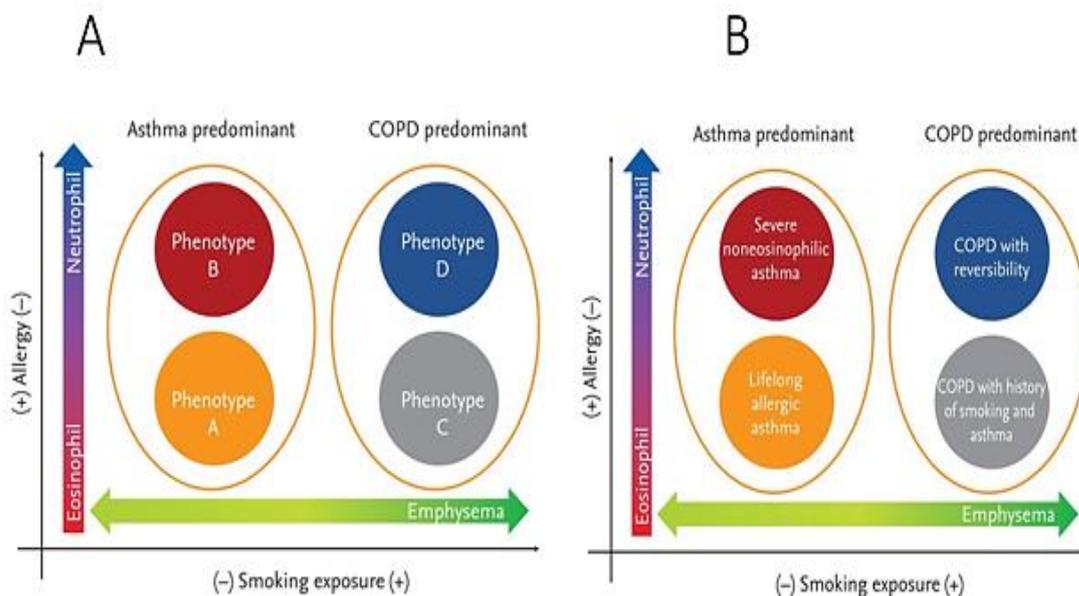


Figura 1. Clasificación de los fenotipos de ACO. A) se muestran los 4 fenotipos de ACO propuestos y B) se observan los 4 fenotipos de ACO según las características clínicas. Tomado de ²⁴.

Esta clasificación por fenotipos es útil para dirigir el tratamiento, pero también plantea la necesidad de definir mejor la enfermedad, ya que ACO no se puede diagnosticar fácilmente solo con espirometría y respuesta broncodilatadora ¹⁶. Por lo tanto, el descubrimiento, la validación y el uso de biomarcadores pueden convertirse en una herramienta importante para la diferenciación de la enfermedad. Según el instituto nacional de cáncer biomarcador se define como “molécula biológica que se encuentra en la sangre, líquidos u otros tejidos del cuerpo y es signo de un proceso normal o anormal, afección o enfermedad” y a lo largo del texto nos apegamos a esta definición ²⁵.

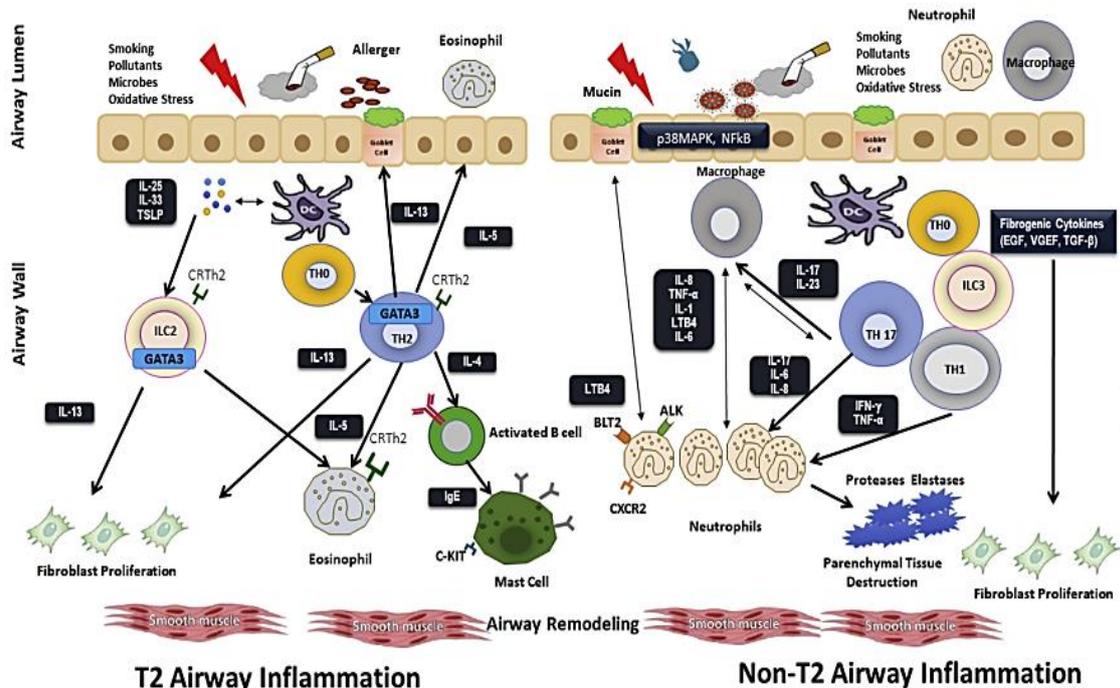
3.2 La respuesta inflamatoria en la superposición EPOC/asma.

El asma y la EPOC difieren entre sí por sus patrones de inflamación y mecanismos inmunológicos. En la inflamación crónica de estas dos enfermedades se activa la respuesta innata y adaptativa ^{26,27}. En los pacientes con ACO la respuesta inflamatoria no tipo 2 juega un papel importante y es dirigida por linfocitos CD8⁺ y células CD4⁺ Th1, en la que también se ven involucrados linfocitos Th17, neutrófilos, macrófagos, mastocitos y células linfoides innatas (ILC) tipo 3, así como mediadores inflamatorios.

La respuesta inflamatoria en las vías respiratorias es causada por el daño recibido en el epitelio pulmonar por el humo del tabaco, humo de combustibles de biomasa, alérgenos y gases que desencadenan la liberación de algunos mediadores y la activación de células de sangre periférica ^{28,29}. Aunque no se ha dilucidado cuando inicia la respuesta innata y adaptativa en la superposición EPOC/asma hay evidencia que demuestra que los alérgenos y otros

componentes pueden inducir la liberación de patrones moleculares asociados a daño (DAMP) como la HMGB1 y LL37 y que estos están involucrados en la inflamación crónica en estos pacientes³⁰. Las señales de alarma inducen liberación de IFN- γ , la IL-1 β y la IL-6 por el epitelio e inician la inflamación. Los macrófagos principalmente CD68⁺, mastocitos y células linfoides innatas tipo 3, pueden ser activadas de manera directa por agentes externos dada su localización en el epitelio. Esta activación celular conduce a la expresión de varios mediadores, entre ellos IL-8 que es una potente quimiocina atrayente de neutrófilos (CXCL8) así como la expresión de la quimiocina CXCL1 en el epitelio permitiendo la infiltración de neutrófilos y macrófagos al pulmón²⁸. Algunas observaciones en pacientes con EPOC y asma neutrofílica han demostrado que en la migración de neutrófilos al pulmón pueden estar involucradas también otras quimiocinas selectivas de neutrófilos como CXCL2-3, proteína atrayente de neutrófilos derivado de células epiteliales-78 (CXCL5 o también conocido como ENA-78), la proteína quimiotáctica de granulocitos humana-2 (CXCL6) y el péptido activador de neutrófilos-2 (CXCL7)³¹.

La liberación de componentes por parte de los macrófagos y neutrófilos genera daño epitelial, ya que tienden a generar especies reactivas de oxígeno (ROS), TNF- α , la IL-8, la proteína quimiotáctica de los monocitos-1 (MCP-1), el leucotrieno B4, catepsinas K, L, S y aumento de metaloproteinasas de matriz (MMP) 1, 2, 9, 12 y 14 (**Figura 2**). Además, la cantidad de neutrófilos aumenta la respuesta generando un daño a nivel pulmonar ya que estos tienen la



capacidad de producir elastasa de neutrófilos, catepsina G, proteinasa 3, así como la colagenasa (MMP-8) y gelatinasa B de neutrófilos (MMP-9). Las MMP tienen un papel importante ya que regulan la actividad de las citoquinas en el

ambiente inflamatorio pulmonar, aumentando la degradación de células en la zona ³¹.

Figura 2. Interacción celular y molecular de la respuesta inmunológica en las vías respiratorias en pacientes con asma, EPOC y ACO. **ILC2**; Célula linfocítica innata tipo 2, Th; células T ayudadoras, **TSLP**; Linfopoyetina estromal tímica, **B4T2**; Receptor de leucotrieno B4, **TGF**; Factor de crecimiento tumoral.

La inflamación en pulmón en estos pacientes involucra también la respuesta adaptativa, activándose luego que las células dendríticas migren a nódulos linfáticos y promuevan la inducción y la proliferación de linfocitos CD8⁺ productores de INF- γ y CXCR3^{high} que migran al tejido pulmonar causando daño al parénquima³². Se sabe también que en las enfermedades respiratorias hay presencia de linfocitos Th17 productores de IL-17A y linfocitos B que están involucrados en la inflamación en el parénquima y los bronquios. La producción de IL-22 y la IL17F por parte de los linfocitos inducen la expresión de CXCL8, CXCL1, CXCL5, IL-6, G-CSF y GM-CSF en el epitelio, estas proteínas inducen entre otras cosas la expansión de neutrófilos en la médula ósea, también inducen la supervivencia y la migración de neutrófilos al pulmón ^{28,31-34}.

3.3 Biomarcadores en la superposición EPOC/asma

Para el diagnóstico de ACO se han investigado algunos biomarcadores como la proteína C reactiva (PCR) y la IL-6. Sin embargo los niveles de mediadores de inflamación sistémica no tuvieron diferencias significativas entre la EPOC y el ACO ³⁵. También se han propuesto el fibrinógeno y el cociente plaquetas / linfocitos (PLR)^{6,36}.

Investigaciones de la respuesta inflamatoria en pacientes con ACO han revelado que existe elevación de células como neutrófilos en esputo y citoquinas como el INF- γ , el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) la IL-1 β , la proteína quimiotáctica de monocitos (MCP-1) y el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), pero que estos biomarcadores no diferencian entre pacientes con ACO, asma y EPOC, lo que impide una clasificación adecuada. Ciertos estudios han revelado que la lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos (NGAL), la proteína 1 similar a la quitinasa 3 (YKL-40) y el NLR podrían tener utilidad como posibles biomarcadores para el diagnóstico de ACO⁸.

3.4 Células de sangre periférica que participan en la fisiopatología de las enfermedades respiratorias.

3.4.1 Neutrófilos

Los neutrófilos son los glóbulos blancos más abundantes en la circulación representando del 40-60% de leucocitos en la sangre. El valor normal en números absolutos es de 2500-6000 (Células/ μ l). Los neutrófilos están involucrados en la respuesta innata eliminando patógenos como hongos y

bacterias mediante enzimas proteolíticas, especies reactivas de oxígeno, trampas extracelulares y la fagocitosis. El conocimiento clásico acerca de la función de los neutrófilos se limitaba a que estas células únicamente combatían a los patógenos extracelulares, pero avances en las últimas dos décadas demostraron que los neutrófilos están involucrados en la respuesta contra virus³⁷, bacterias intracelulares³⁸, regulación de las células dendríticas, regulación y activación de linfocitos B por medio de la expresión de citoquinas como BAFF, IL-21 y APRIL. También juegan un papel importante en la activación de los linfocitos T³⁹ y en la homeostasis de las células NK⁴⁰. Los neutrófilos se forman y maduran en la médula ósea y provienen de un progenitor hematopoyético mieloide, en el proceso de maduración en médula ósea se forman y diferencian sus tres grupos de gránulos y sus vesículas secretoras que contienen un gran número de proteínas como se ilustra en la **Tabla 1**. La lista no es completamente exhaustiva, pero ilustra las principales clases de proteínas que se encuentran en los diversos tipos de gránulos de neutrófilos. Se detallan moléculas de adhesión, receptores, proteínas antibacterianas, proteasas, otras clases funcionales de proteína ^{41,42}. Los neutrófilos juegan un rol importante en una gran variedad de enfermedades, como las infecciones, la diabetes mellitus por resistencia a la insulina⁴³, enfermedades cardiovasculares⁴⁴, enfermedades inflamatorias y cáncer⁴⁵. Jonsson *et al.*, encontraron que la depleción de neutrófilos inhibió la anafilaxia sistémica en ratones ⁴⁶.

Los neutrófilos están elevados en enfermedades respiratorias como el asma neutrofílica (NA), que es un subtipo de asma que se caracteriza por la infiltración masiva de neutrófilos en las vías respiratorias. El NA ocurre en el 15-25% de los asmáticos y es más prevalente entre los asmáticos graves dependientes de esteroides. Los pacientes con asma neutrofílica presentan porcentaje mayor de 60% de neutrófilos y menos de 3% de eosinófilos en esputo. Los estímulos infecciosos y no infecciosos como factores ambientales, el humo del tabaco y la polución inducen la migración de neutrófilos desde circulación a los pulmones (**Figura 3**) a través de un complejo de moléculas de adhesión que se activan en cascada como ser la β 2 integrina, ICAM1, PECAM1 entre otros⁴² y se ha identificado que las células Th1, Th17 puede promover esta migración⁴⁷.

Tabla 1. Proteínas en los gránulos y vesículas secretoras de los neutrófilos.

Membrane proteins			
Azurophil granules	Specific granules	Gelatinase granules	Secretory vesicles
N.a.	CD11b/CD18, CD66, CD67	CD11b/CD18, CD67	CD11b/CD18, CD67
N.a.	Gp91phox/p22phox	Gp91phox/p22phox	Gp91phox/p22phox
N.a.		MMP25	MMP25
N.a.	TNFR ^c , uPAR	TNFR ^c	LIR1-4,-6,-7,-9 ^c ; CD35; CD16; C1q-R; IFN- α R1 and IFN- α R2 ^c ; IFN- γ R1 and IFN- γ R2 ^c ; TNFR1 and TNFR2 ^c ; IL-(1,4,6,10,13,17,18)R ^c ; TGF- β R2 ^c ; CXCR-1 ^c ; CXCR 2 ^c ; CXCR-4 ^c ; CCR-1, -2, -3 ^c ; Ig(G,A,E)FcR ^c ; TLR-1, -2, -4, -6, -8 ^c ; CD14; MyD88 ^c ; MD-2 ^c ; fMLPR; TREM1 ^c
CD63, CD68, presenilin	SNAP-23, VAMP-2, Stomatin, PGLYRP ^c	SNAP-23, VAMP-2, Nramp1	SNAP-23, VAMP-2, Nramp1, alkaline phosphatase, DAF, CD10, CD13
Matrix Proteins			
Elastase, cathepsin G, proteinase 3	Collagenase, Gelatinase, uPA, cystatin C ^c , cystatin F ^c	Gelatinase, arginase 1	Plasma proteins
Defensins, BPI, MPO, lysozyme	hCAP18, NGAL, B12BP, lysozyme, lactoferrin, haptoglobin, pentraxin 3, prodefensin	Lysozyme	N.a.
Sialidase, Azurocidin, β -glucuronidase, azurocidin	α 1-anti-trypsin ^c , SLPI, orosomucoid, heparanase, β 2-microglobulin, CRISP3	β 2-microglobulin, CRISP3	N.a.

Nota: Tabla de proteínas contenidas en los gránulos del neutrófilo. Tomada de ⁴²

La inflamación consecuente es facilitada por estas células que secretan INF- γ , IL-17-A, IL-17F e inducen la secreción de IL-8 por el epitelio de las vías respiratorias y macrófagos (**Figura 3**). El aumento de neutrófilos en las vías respiratorias de los pacientes se asocia a mala respuesta a tratamiento y pérdida de la función pulmonar ^{48,49}. Bajo la influencia de todas las citoquinas antes mencionadas los neutrófilos liberan, elastasa del neutrófilo, MMP-9, ROS y MPO que conducen a la disrupción del epitelio bronquial, enfisema y obstrucción bronquial⁵⁰.

Otra enfermedad respiratoria en la que los neutrófilos están elevados es la EPOC. Aunque los mecanismos celulares y moleculares que desencadenan las afecciones pulmonares en dichos pacientes no son del todo claros, se sabe que las células T CD8⁺, los neutrófilos y los macrófagos son las principales células efectoras, y la IL-1 β , IL-6, IL-8, el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) y las metaloproteinasas de la matriz (MMP) son los mediadores de la inflamación involucrados en la inflamación de las vías respiratorias. La EPOC es una afección heterogénea que se caracteriza por una predominante neutrofilia pulmonar en los pacientes ⁵¹⁻⁵³. La cantidad de neutrófilos (y sus productos) se relaciona con la obstrucción de las vías respiratorias, la disminución del FEV₁, la reducción de la transferencia de gas y el desarrollo de enfisema. Cuando la función de los neutrófilos se ve afectada lleva a una función antimicrobiana

reducida y, al mismo tiempo, contribuye al daño pulmonar debido a la migración aberrante, luego a liberación de proteínas como la elastasa del neutrófilo en el espacio extracelular, la liberación de trampas extracelulares y otros contribuyen a la formación del enfisema⁵⁴.

Se sabe que algunos pacientes con ACO tienen recuentos de neutrófilos elevados en esputo. Gao *et al.*, analizaron las células en esputo inducido en pacientes con criterios de EPOC, ACO y asma, y encontraron que los pacientes con ACO presentaban rangos de 64-66.1% de neutrófilos en esputo, que era más que el promedio de los pacientes con asma, pero su rol en la patogenia e inflamación en ACO no está bien comprendida ⁷

3.4.2 Monocitos

Los monocitos son los fagocitos más grandes de la circulación representando el 4-8% de los leucocitos sanguíneos. Los monocitos promueven la inflamación a través de la diferenciación en macrófagos inflamatorios⁵⁵. Se clasifican en tres subconjuntos según la expresión de los marcadores de superficie CD14 y CD16: monocitos CD14^{high}CD16⁻ "clásicos" (alrededor del 85% de los monocitos), monocitos CD14⁺CD16⁺ "intermedios" (5-10%) y monocitos CD14⁻CD16^{high} "no clásicos" (5-10%) ⁵⁶. Los monocitos se infiltran rápidamente en el tejido pulmonar después de una lesión y contribuyen al inicio y amplificación de la inflamación a través de varios mecanismos, incluida la aceleración de la migración de neutrófilos a los pulmones y la generación de especies reactivas de oxígeno / nitrógeno⁵⁷. El número de macrófagos es hasta 10 veces mayor en las vías aéreas, parénquima y lavado broncoalveolar de pacientes con enfermedad respiratoria. Además, también se relacionan con la gravedad de la EPOC. El humo del tabaco activa los macrófagos, y éstos liberan mediadores inflamatorios como el TNF- α , la IL-8, la proteína quimiotáctica de los monocitos-1 (MCP-1), el leucotrieno B4 y especies reactivas de oxígeno, así como proteasas tales como MMP-2, MMP-9, MMP-12, y catepsinas K, L y S ⁵⁸.

3.4.3 Linfocitos

Los linfocitos son células inmunitarias que se dividen principalmente en células B y T. Estas células se desarrollan a partir de las células troncales de la médula ósea de un linaje hematopoyético de linfocitos. Los linfocitos T terminan su maduración en el timo, y los linfocitos B maduran en la médula ósea. Representan entre el 20-40% de los leucocitos en sangre periférica y juegan un rol central en la respuesta específica contra patógenos. Los linfocitos se subdividen en: linfocitos B, linfocitos T y linfocitos $\gamma\delta$ ⁵⁹. Aunque morfológicamente son indistinguibles entre ellos, pueden ser reconocidos desde el punto de vista inmunocitoquímico por las diferencias en sus marcadores de superficie. Aproximadamente el 80% de los linfocitos circulantes son linfocitos T, en torno al 15% son linfocitos B, dependiendo si son linfocitos efectores o de memoria sus vidas medias difieren ampliamente desde unos pocos meses hasta muchos años ⁶⁰.

Tras la estimulación por un antígeno específico, tanto los linfocitos B como los T proliferan y se diferencian en dos subpoblaciones: Los linfocitos de memoria y las células efectoras. Estas células efectoras pueden llevar a cabo funciones de eliminación de antígenos y células infectadas por virus. Los linfocitos B son responsables del sistema inmunitario mediado por anticuerpos; se diferencian en células plasmáticas, que producen anticuerpos frente a los antígenos. Los linfocitos T son responsables del sistema inmunitario mediado por células. Algunos linfocitos T se diferencian en linfocitos T citotóxicos (linfocitos T CD8⁺) que destruyen las células extrañas o alteradas por virus. Además, los linfocitos T pueden ser ayudadores CD4⁺ o linfocitos T reguladores (Treg)⁶¹.

Los linfocitos juegan un rol importante en la respuesta inmune en pulmón, montando una respuesta adaptativa contra agentes infecciosos y no infecciosos. Los linfocitos T CD4⁺ y las citoquinas que juegan un rol central en el asma, los Th2 generan una respuesta posterior al reconocimiento del antígeno y secretan varias citoquinas como IL-4, IL-5, IL-13. Se sabe también que los linfocitos Th17 secretores de IL-17 juegan un papel importante en estos tejidos (**Figura 3**). Además, en las vías respiratorias de los pacientes con EPOC se sabe que los linfocitos T CD8⁺ son la subpoblación más abundante y son responsables del daño tisular en las vías respiratorias de estos pacientes. Se ha observado una correlación significativa entre el aumento de linfocitos T CD8⁺ y la disminución del FEV₁ en pacientes con EPOC ⁶². Otro subgrupo de linfocitos que se ha descrito como relevante en la enfermedad pulmonar son los linfocitos Th1 secretores de INF- γ e IL-9, que modulan el reclutamiento y la activación de monocitos, linfocitos B y linfocitos T CD8⁺. La participación en la fisiopatología del linfocito en pacientes con ACO no está claro y aunque se han detectado aumentos de estas células en parénquima y mucosa pulmonar, sus niveles en sangre y su relevancia en ACO aún no están del todo claros^{62,63}.

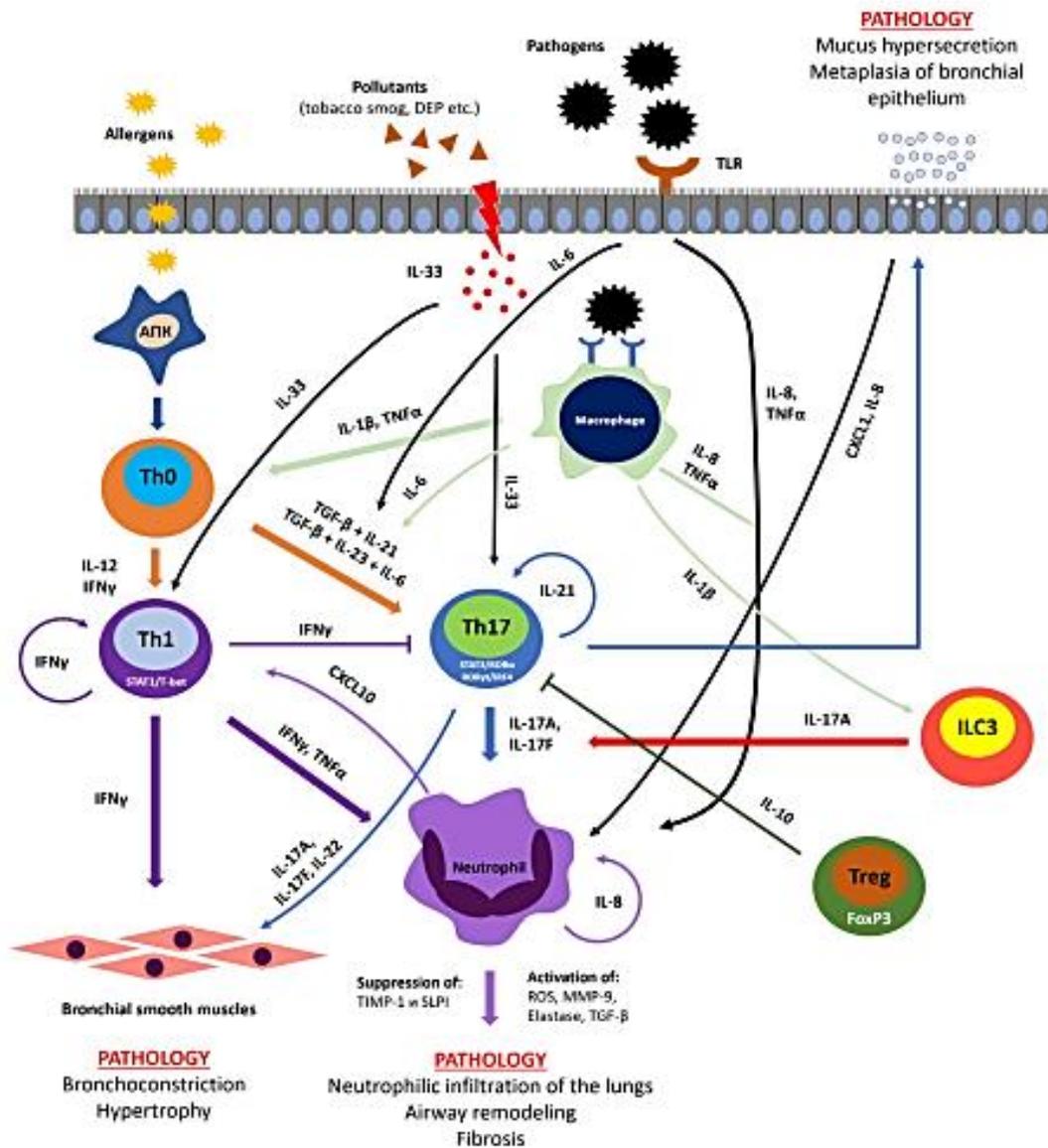


Figura 3. Interacción entre células que participan en el daño tisular en las enfermedades respiratorias. Se observan los neutrófilos como células centrales en la patología y que son activadas por los linfocitos Th1 y Th17. Se observa también como estímulos infecciosos y no infecciosos activan macrófagos e inician la migración celular y la inflamación en pulmón. Tomada de ⁵⁰

4. Cociente neutrófilos/linfocitos (NLR).

El NLR es un biomarcador de fácil obtención y bajo coste económico. El NLR refleja inflamación sistémica ya que se ha observado que existe neutrofilia con linfopenia relativa en sangre en esta condición⁶⁴. El NLR se obtiene con el recuento diferencial de células en un hemograma completo, al dividir el número total de neutrófilos sobre el número total de linfocitos. Ha sido utilizado para apoyar en el diagnóstico y evaluación de enfermedades cardiovasculares, como predictor independiente y de sobrevida en algunas neoplasias^{65,66} y como marcador de estrés en pacientes con enfermedades críticas⁶⁷.

El NLR se ha descrito también en varias enfermedades respiratorias, por ejemplo, Lee *et al* utilizaron el NLR como marcador para clasificación de

pacientes con EPOC. Ellos evaluaron controles sanos, pacientes con exacerbaciones de EPOC y EPOC estable, encontrando que el NLR en los pacientes con exacerbaciones fue mayor que en el período estable y en el grupo de controles sano, mientras que el NLR disminuyó significativamente en el período de recuperación de los pacientes con exacerbación aguda, sirviendo como predictor de hospitalización⁶⁸. Taylan *et al.*, encontraron que el índice NLR de los pacientes con EPOC aumenta paulatinamente conforme se agrava la enfermedad, lo que indica que el NLR podría usarse como un predictor temprano del episodio agudo de los pacientes con EPOC⁶⁹. También, Cris *et al.*, describieron que los niveles de eosinófilos se correlacionan negativamente con el índice NLR en pacientes con EPOC, indicando que este podría abonar en la diferenciación de fenotipos⁷⁰. Todos estos estudios confirman que el índice NLR puede ser importante para evaluar las exacerbaciones agudas y la gravedad de la EPOC⁷¹. Esclarecer un valor diferenciador de este biomarcador y utilizarlo para evaluar enfermedades respiratorias podría ser beneficioso en el futuro.

5. Proteínas inflamatorias en plasma derivadas de neutrófilos y monocitos

5.1 Lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos (NGAL)

Esta glicoproteína fue descrita por Kjeldsen *et al.*, a finales del siglo pasado como una proteína de 198 aminoácidos que se ubica en los gránulos de los neutrófilos asociada a la gelatinasa de neutrófilos. La NGAL está codificada por el gen *LCN2* ubicado en el locus 9q44.11 el cual tiene siete exones que producen al menos cinco ARNm que se traducen en proteína, de los cuales uno codifica una proteína secretada de 198 aminoácidos⁷². La familia de las lipocalinas comprende un grupo diverso de proteínas solubles secretadas que se unen a ligandos hidrófobos y actúan como transportadores llevando pequeñas moléculas a células específicas. Entre las lipocalinas más conocidas se encuentran; La lipocalina-1, la lipocalina lagrimal (TL), la proteína de la glándula de von Ebners (VEG), la pre-albúmina lagrimal, la 2-microglobulina de rata y la proteína de ratón 24p3 las cuales se unen a una gran cantidad de moléculas hidrófobas. Estas proteínas están involucradas en procesos inflamatorios y de detoxificación. Además, son alérgenos de animales como perro, vaca, gato, ratón entre otros⁷³.

La NGAL es una lipocalina que se regula al alza en la inflamación y que constituye un componente de los gránulos en los neutrófilos, también se expresa en células de tejidos que normalmente están expuestos a microorganismos. La NGAL puede formar homodímeros y puede formar heterodímeros con la gelatinasa de neutrófilos MMP-9 y la proteinasa de neutrófilos 4⁷³. Anteriormente se creía que NGAL como la mayoría de las lipocalinas únicamente modulaba los procesos celulares al unirse a ligandos lipídicos e interactuar con receptores específicos de la superficie celular. Sin embargo, se ha descrito que esta proteína también se une a un sideróforo férrico cargado negativamente actuando como agente bacteriostático⁷⁴. La unión de NGAL al hierro se hace por medio del pliegue de lipocalina que es común entre todas las lipocalinas y que consta

de una estructura de barril beta antiparalela que comprende ocho láminas beta (**Figura 4**).

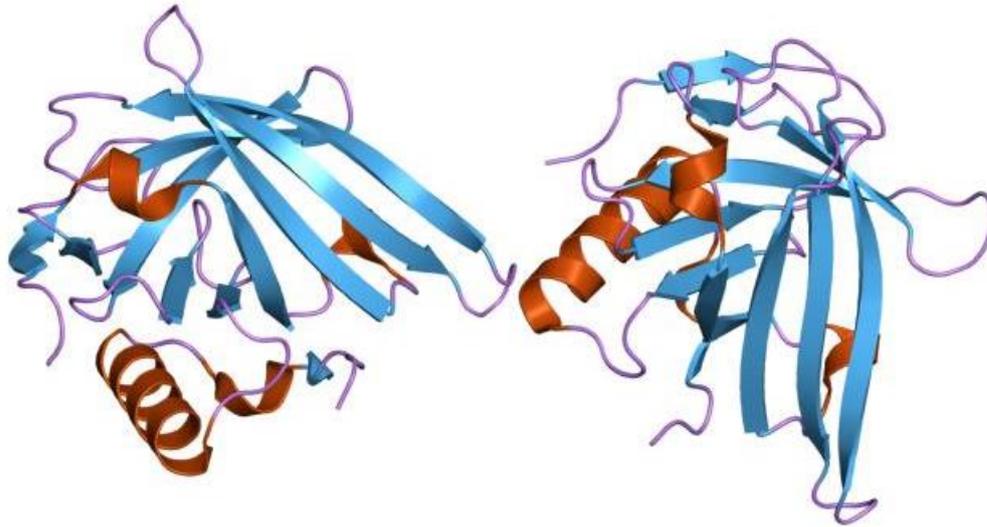


Figura 4. Estructura tridimensional del dominio de “*lipocalin*”, de la familia de lipocalinas de la cual hace parte la NGAL. Tomado de Pfam (*Accesion number*: PF08212).

La NGAL es una proteína antimicrobiana de fase aguda de 25 kDa secretada por neutrófilos, células epiteliales de la mucosa respiratoria e intestinal, células endoteliales y células tubulares renales. Es sintetizada durante la granulopoyesis en la fase de mielocito inmaduro durante el desarrollo de los gránulos secundarios. EL ARN mensajero de la NGAL se expresa normalmente en una gran variedad de tejidos en el humano adulto, incluyendo la médula ósea, el útero, la próstata, las glándulas salivales, el estómago, el colon, la tráquea, el pulmón, el hígado y los riñones ²³.

Se ha descrito que la interleuquina-1 (IL-1) α y β ⁷⁵, la insulina, el factor de crecimiento insulínico 1 (IGF-1), el TGF- α y el TNF- α , regulan al alza a NGAL mediante las vías MEK, NF κ B y PI-3K. Además, algunos estudios han demostrado que la inducción de *novo* de NGAL durante una infección esta inducida por citoquinas como la IL-17 y la IL-22 en los neutrófilos y otras células (**Figura 5**) ⁷⁶.

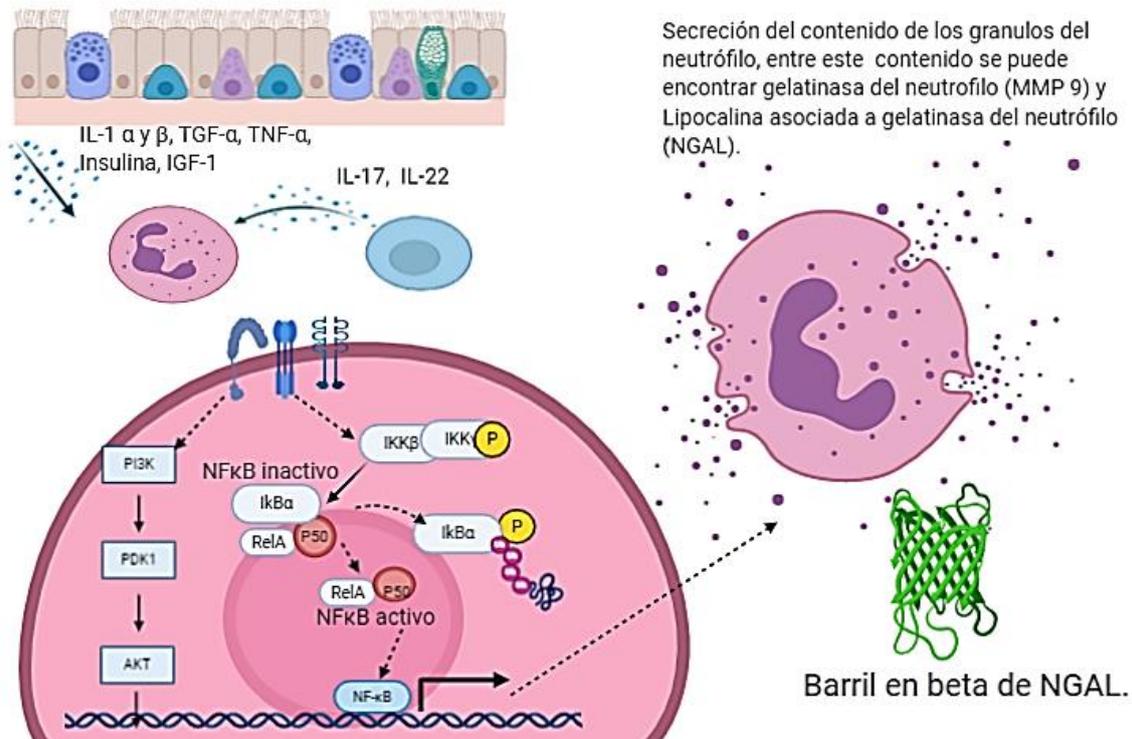


Figura 5. Vías de regulación de la expresión de lipocalina asociada a la gelatinasa del neutrófilo (NGAL). La IL-1 y IGF-1 regulan la expresión NGAL al alza y las vías de señalización de las quinasas y del NFκB inician el proceso de síntesis. **IL-1:** Interleuquina 1, **TGF-α:** Factor de crecimiento transformante alfa, **TNF-α:** Factor de necrosis tumoral alfa, **IGF-1:** Factor de crecimiento insulínico tipo 1, **PI3K:** Fosfoinositol 3 quinasa, **PDK-1:** Quinasa dependiente de fosfoinositol 1, **AKT:** Proteína quinasa B, **IκB:** Inhibidor de κB, **NF-κB:** Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras κ de los linfocitos B activados, **MMP:** Metaloproteinasas de matriz. Elaborado por Bayron Zelaya en Biorender.

La NGAL es un biomarcador que se está utilizando de manera muy prometedora en estudios de diabetes, cáncer y también como pronóstico de disfunción renal aguda⁷⁷⁻⁸⁰. Además, se ha descrito que NGAL podría estar involucrada en la patogénesis de la EPOC. Siguiendo esta línea Eagan *et al.*, midieron NGAL en participantes de una cohorte de 402 pacientes con EPOC y 229 controles sanos. En ese estudio se encontró que los niveles de NGAL en plasma fueron significativamente más altos en pacientes con EPOC en comparación con los sujetos control, también encontraron que NGAL se relacionó con características importantes de la EPOC como el tabaquismo y la neutrofilia⁸¹.

Otros estudios han descrito a NGAL como posible biomarcador en ACO. Por ejemplo, Iwamoto *et al.*, llevaron a cabo un estudio en el cual midieron mieloperoxidasa (MPO), el factor surfactante A (SP-A), el receptor soluble para productos finales de glicación (sRAGE) y NGAL en esputo y plasma de 134 pacientes con EPOC y ACO. En este estudio se encontró que NGAL tuvo aumento significativo en pacientes con ACO en relación a pacientes con EPOC y asma⁵⁵. También, Gao *et al.*, midieron en esputo la IL-13, la MPO, NGAL, la proteína 1 similar a la quitinasa 3 (YKL-40), la IL-6 y encontraron que solo NGAL tenía la capacidad de clasificar ACO de asma y EPOC⁷. Sin embargo, se considera que la medición en esputo tiene limitantes por la dificultad de la toma

de muestra y la complejidad en el procesamiento de esta. Suk Jo *et al.*, evaluaron IL-8, IL-6, PCR y NGAL en sueros de 137 pacientes con EPOC encontrando que NGAL era un posible biomarcador para diferenciar ACO, ya que los niveles de NGAL fueron significativamente más altos en mujeres con ACO que en EPOC ⁸².

5.2 Proteína 1 similar a quitinasa 3 (CHI3L1) o YKL-40

Otro biomarcador fuertemente asociado a inflamación en enfermedades crónicas respiratorias es la proteína 1 similar a quitinasa 3 (CHI3L1) o (YKL-40). Esta es una proteína de 40 kDa, que pertenece a la familia 18 glucosil hidrolasas o proteínas similares a la quitinasa de mamíferos. A diferencia de las otras proteínas de este grupo, la YKL-40 no posee actividad quitinasa y se une a oligosacáridos, heparina y al ácido hialurónico (**Figura 6**) ⁸³.

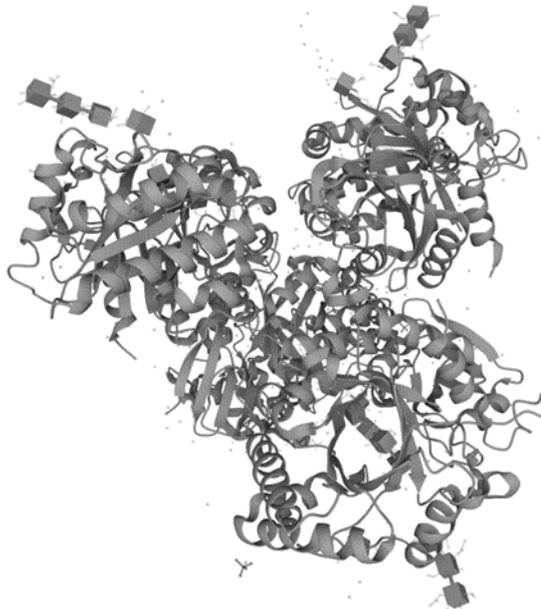


Figura 6. A: Estructura tridimensional de la proteína YKL-40, en donde se observa la cadena alfa en donde encuentran sus dos sitios activos. Tomado de UniProt (*Accesion number* P36222).

La YKL-40 es codificada por el gen *CHI3L1* en el cromosoma 1q32.1, posee 10 exones y también promotores que contienen sitios de unión para varios factores de transcripción. YKL-40 se regula al alza en pacientes con asma, cáncer y otras enfermedades caracterizadas por inflamación y remodelación tisular ⁸⁴. Es una proteína secretada por neutrófilos en estado activado y también se ha descrito que es secretada por macrófagos y monocitos. Sin embargo, algunos autores han descrito que se expresa pobremente en monocitos y en células dendríticas derivadas de monocitos, pero sí en macrófagos activados, por lo tanto, se considera un marcador de diferenciación de macrófagos ⁸⁵. La YKL-40 también es producida por otras células, incluidas; células del epitelio de las vías respiratorias, células del músculo liso, células vasculares, células sinoviales, condrocitos, fibroblastos y células mamarias. La secreción de esta proteína es

inducida por citoquinas, factores de crecimiento, componentes de la matriz extracelular, fármacos y estrés ⁸⁶.

La expresión de YKL-40 está regulada por citoquinas incluidas la IL-6, IL-13, el IFN- γ y hormonas como la vasopresina. Se ha descrito que el factor de transcripción Sp1 se ve involucrado en su expresión, además los factores de transcripción PU.1, Sp3, se unen inespecíficamente al promotor del gen que codifica la YKL-40 ⁸⁵. También, se ha descrito que la IL-1 y el TNF- α estimulan su expresión por medio de las vías del NF- κ B ⁸⁶. Por otro lado, se ha demostrado que la YKL-40 puede inhibir la respuesta celular inducida por la IL-1 y el TNF- α , lo que sugiere que la inducción de YKL-40 puede funcionar retroalimentando la respuesta local con el fin de controlarla. También se ha descrito que existe represión negativa de la YKL-40 por parte del NF- κ B al reclutar histonas desacetiladas ^{87,88}.

La función de la YKL-40 aún no está clara, pero está involucrada en eventos como la migración celular y la quimiotaxis, también se ha descrito que inhibe la lesión pulmonar inducida por oxidantes, aumenta la inmunidad adaptativa de tipo 2, regula la apoptosis, estimula la activación de macrófagos alternativos y contribuye a la fibrosis y la cicatrización de heridas ⁸⁹. También, se ha detectado asociación entre variables genéticas en genes relacionados con las quitinasas (*CHIA* y *CHI3L1*) y la respuesta IgE contra proteínas del nematodo *Áscaris lumbricoides*, dando pistas de su posible participación en la respuesta contra los parásitos actuando como proteínas quimio atrayentes al sitio de la infección ⁹⁰. Además, es un potente mitógeno activando la vía de señalización Akt al unirse al receptor IL-13R α 2 e iniciar una cascada de señales que conduce a una mayor proliferación celular (**Figura 7**), lo que sugiere que esta proteína podría desempeñar un papel importante en las condiciones patológicas ⁹¹.

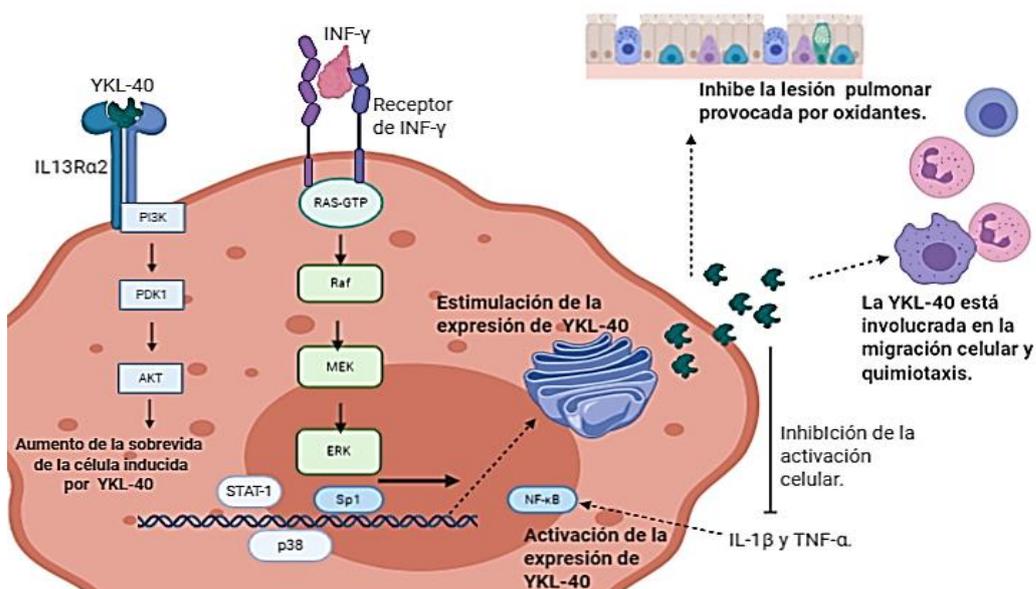


Figura 7. Acciones de la YKL-40 en la célula inflamatoria en ambiente pulmonar. **INF- γ** : Interferón gamma, **IL-1 β** : Interleuquina 1 beta, **STAT 1**: Transcriptor de señales y activador de transcripción

1, **p38**; proteína quinasa p38 activada por mitogeno, **NF-κB**: Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras κ de los linfocitos B activados, **PI3K**: Fosfoinositol 3 quinasa, **PDK-1**: Quinasa dependiente de fosfoinositol 1, **AKT**: Proteína quinasa B. Elaborado por Bayron Zelaya en Biorender.

Las altas concentraciones de YKL-40 en suero se correlacionan con la morbilidad en diferentes enfermedades como la neumonía, la artritis reumatoide, la fibrosis hepática en curso, así como con la mortalidad de cáncer de mama recurrente y cáncer colorrectal ⁸⁷. De acuerdo con algunos hallazgos, los niveles de YKL-40 en el pulmón y el suero aumentan en enfermedades como el asma y la EPOC en donde se eleva producto de la remodelación bronquial y las exacerbaciones ⁹². Además, se ha visto elevaciones en enfermedades como la esclerosis sistémica y también en fibrosis pulmonar, y también se ha visto elevada en pacientes fumadores y con obstrucción pulmonar ⁸¹.

Se han descrito varios estudios en participantes con EPOC y asma en los que se evalúa la proteína YKL-40. Por ejemplo, Otsuka *et al.*, detalla que los niveles de YKL-40 en esputo se correlacionan positivamente con la gravedad del asma y se correlaciona con niveles de neutrófilos altos en estos pacientes. En este mismo estudio la YKL-40 se correlacionó con niveles altos de neutrófilos y macrófagos en pacientes con EPOC ⁹³. De igual manera, James *et al.*, mostraron que la YKL-40 está aumentada en pacientes con asma y EPOC en comparación con los pacientes sanos. En su estudio ellos observaron también que la YKL-40 tiene una correlación con la función pulmonar ⁹⁵. Un metanálisis elaborado por Tong *et al.*, mostró que los niveles séricos y de esputo de YKL-40 eran significativamente más altos en pacientes con EPOC que los controles sanos. También que los niveles de YKL-40 se correlacionan con la función pulmonar y son significativamente diferentes entre grupos de pacientes con exacerbaciones y grupos de pacientes estables ⁹⁶.

A pesar de todos estos estudios, la utilización de YKL-40 como biomarcador aún no está totalmente comprendida. Para la diferenciación de pacientes con ACO, se ha utilizado la medición de YKL-40 en combinación con otros biomarcadores como la periostina. Shirai *et al.*, demostraron que los niveles de periostina estaban bajos en 66 pacientes con EPOC comparados con pacientes con asma y ACO y los niveles de YKL-40 están bajos en 177 pacientes con asma comparados con pacientes con EPOC y ACO. Notaron que la proporción de participantes con altos niveles de periostina y altas concentraciones de YKL-40 estaban en el grupo ACO, sugiriendo que la elevación de ambos (periostina y YKL-40) podría identificar ACO de asma y EPOC ⁹⁷.

Un estudio más reciente elaborado por Wang *et al.*, tuvo como objetivo medir biomarcadores plasmáticos como ser; periostina, TSLP, YKL-40 y NGAL y su correlación con la función pulmonar, la respuesta broncodilatadora y alteraciones radiográficas en pacientes con asma, EPOC y ACO. Su estudio demostró que los pacientes con ACO tenían niveles de NGAL moderadamente más elevados que los pacientes con asma, ayudando a la diferenciación entre pacientes con

ACO y pacientes con asma. También demostró que los pacientes con ACO tenían niveles significativamente menores de YKL-40 que pacientes con EPOC. De esta manera demostró que la evaluación combinada de ambos biomarcadores podría diferenciar entre asma, EPOC y ACO ⁸.

6. Hipótesis

Los biomarcadores inflamatorios NGAL, YKL-40 y el NLR tienen diferencias significativas entre los pacientes con ACO y los pacientes con asma, EPOC y controles sanos.

7. Objetivos

7.1 Objetivo General

Analizar los niveles de NGAL y YKL-40 en plasma como biomarcadores de la respuesta inflamatoria en el ACO.

7.2 Objetivos específicos

1. Cuantificar NGAL y YLK-40 en plasma y evaluar las diferencias de sus niveles entre los pacientes con ACO, asma, EPOC y controles sanos.
2. Calcular el cociente entre neutrófilos y linfocitos (NLR) y evaluar las diferencias entre los pacientes con ACO, asma, EPOC y controles sanos.
3. Evaluar la relación entre los niveles de NGAL y YLK-40 con las proporciones de leucocitos en sangre y otros mediadores inflamatorios.
4. Investigar la asociación de los niveles de NGAL, YKL-40 y el NLR con parámetros de función pulmonar y niveles de IgE en pacientes con ACO.
5. Evaluar la sensibilidad y la especificidad de NGAL, YKL-40 y el cociente NLR para diferenciar ACO de asma y EPOC.

8. Metodología

8.1 Diseño del estudio

Es un estudio explorativo de casos y controles en donde se llevó a cabo el análisis de algunos biomarcadores de la respuesta inflamatoria de muestras de pacientes con asma, EPOC, ACO y sujetos control reclutados en el marco de un estudio más grande llamado "Identificación de biomarcadores en el síndrome de superposición EPOC/asma" financiando por Minciencias (contrato 756-2017).

8.2 Población en estudio y tamaño de muestra

La población de estudio en este proyecto pertenece a la cohorte Cartagena-Bogotá "IBACO". Un total de 397 participantes reclutados en clínicas de neumología de las ciudades de Cartagena y Bogotá entre febrero del 2018 y marzo del 2020. Estos estaban divididos en sujetos sanos (n=100), pacientes con diagnóstico de asma (n=123), EPOC (n=100) y criterios diagnósticos de ACO (n=74). Se realizaron una serie de preguntas a los participantes basados en un cuestionario de síntomas respiratorios que fue validado por el Instituto de Investigaciones Inmunológicas y la Fundación Neumológica Colombiana y se incluyeron 119 preguntas y obtener información sobre condiciones de vida, comorbilidades y otros síntomas alérgicos. Entre la información recolectada en el cuestionario están factores de riesgo como el tabaquismo y exposición al humo de leña, características sociodemográficas, y el tipo de tratamiento que recibía el paciente al momento del examen. Además, se incluyó el índice de comorbilidad de Charlson, con el cual se pudo identificar a los individuos con enfermedades que pudieran afectar las mediciones que se realizaron en el estudio. Posteriormente si el paciente cumplía los requisitos y firmaba el consentimiento informado, se procedió a la extracción de una muestra de sangre para la medición de biomarcadores en plasma. El tamaño de muestra fue calculada previamente en el marco de este proyecto, resultando que una cantidad de 100 pacientes con EPOC, 74 con ACO, 123 con asma y 100 sujetos tiene un poder estadístico del 80 % para diferenciar niveles en las medias de marcadores entre esos grupos.

8.3 Los criterios de inclusión, exclusión y selección de los controles del proyecto

Los participantes en el estudio fueron primeramente seleccionados mediante diagnóstico clínico basados en las guías (GesEPOC y GINA)^{98,99}. Los participantes debieron cumplir los criterios de inclusión; persona de más de 40 años diagnosticado con asma, EPOC o ACO por medio de un neumólogo, con buena respuesta al tratamiento y estabilidad de la enfermedad respiratoria en las últimas 8 semanas.

Se excluyeron del proyecto a personas con exacerbaciones en las últimas 8 semanas, que hubiesen presentado infecciones respiratorias en las últimas 8 semanas, con comorbilidades como la diabetes y la hipertensión arterial no controladas, cáncer o inmunosupresión.

Para la selección de los controles se reclutaron sujetos sanos de 40 años o mayores, sin antecedentes de enfermedad pulmonar, EPOC, o asma y que tenían pruebas de función pulmonar normales seleccionados de la población general. A los sujetos control se les realizó un cuestionario de calidad de vida y comorbilidades con el cual se identificaron factores que influyen en su condición como control y se verificó que no tuvieran ninguno de los criterios de exclusión antes mencionados.

La elección de los pacientes con estabilidad en la enfermedad se decidió ya que el nivel de biomarcadores y células aumenta con las exacerbaciones y crisis en la enfermedad respiratoria. Estudios confirman la correlación entre el aumento de las células y biomarcadores con la gravedad de la enfermedad y las exacerbaciones, así que se procuró tener grupos de enfermos sin exacerbaciones para evitar incluir participantes que introdujeran confusión.

8.4 Conteo de células y el cociente neutrófilos/linfocitos (NLR)

Para la cuantificación de neutrófilos y linfocitos fue necesario el conteo leucocitario mediante hemograma automatizado (tipo IV) utilizando muestras en tubos con anticoagulante EDTA. Los hemogramas se elaboraron en el laboratorio Eduardo Fernández de Cartagena y en el laboratorio de la Fundación Neumología de Colombia en la ciudad de Bogotá. Los niveles de neutrófilos y linfocitos en valores absolutos y en porcentajes fueron analizados como una variable continua y también se usaron sus valores absolutos para calcular el NLR. El cociente de neutrófilos/linfocitos se obtuvo al dividir el valor absoluto de neutrófilos (células/ μ l) sobre el valor absoluto de linfocitos (células/ μ l). Un NLR menor a 1 denota una cantidad de linfocitos en sangre que supera la cantidad de neutrófilos y un NLR mayor a 1 denota un número mayor de neutrófilos que de linfocitos (**Figura 8**).

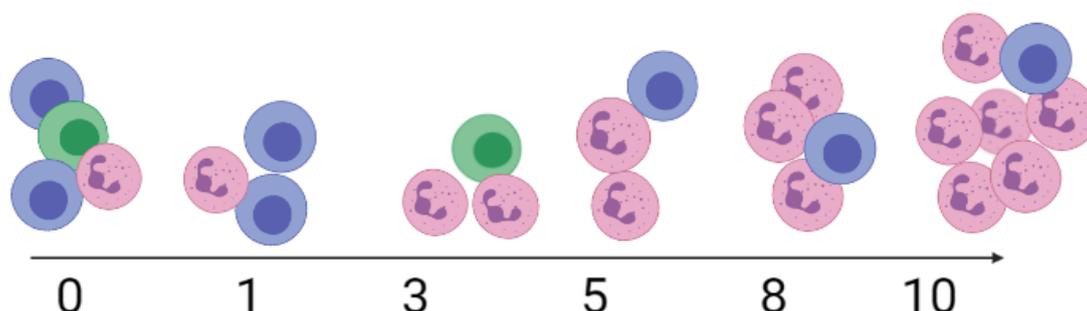


Figura 8. Representación gráfica de los valores de NLR de acuerdo a la cantidad de neutrófilos o linfocitos en sangre periférica en los pacientes. Elaborado por Bayron Zelaya en Biorender.

8.5 Medición de NGAL y YKL-40

La medición de los biomarcadores **NGAL** y **YKL-40** se realizó mediante un inmunoensayo de absorción ligado a enzima (ELISA) en formato sándwich empleando estuches comerciales **ELISA Duoset (R&D systems USA**, número de catálogo: **DY2599** para **YKL-40** y número de catálogo **SLNC 20** para **NGAL**).

Para la medición de estos biomarcadores se siguió las instrucciones del fabricante. Primero se llevó a cabo una titulación de plasmas, seleccionando 5 muestras obtenidas durante las pruebas piloto del estudio. Las muestras utilizadas en la titulación fueron representativas de pacientes con enfermedades respiratorias y sujetos sanos. Las concentraciones en las que se diluyeron las muestras de plasma fueron 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160 y 1:320 para ambos biomarcadores. Una vez se culminó la titulación se analizaron los resultados y se encontró que la dilución de las muestras de plasma más adecuada para medir estos biomarcadores era la de 1:40.

Se midieron los niveles de NGAL y YKL-40 en las muestras de los participantes. Para ello primero se llevó a cabo la unión del anticuerpo primario diluido con PBS en la placa de ELISA agregando 100 microlitros a cada pozo y posteriormente se realizó una incubación a temperatura ambiente por toda la noche. Luego se llevó a cabo un proceso de lavado y secado de las placas para eliminar el resto de los anticuerpos no unido en la superficie sólida. Luego se realizó un proceso de bloqueo con PBS y se incubó por 1 hora y posteriormente se hicieron 3 lavados con buffer de lavado (Tween 20 al 0.5%). Seguido a esto, se agregaron 100 μ l de muestra de plasma diluido 1:40 y de las proteínas estándar en sus respectivos pozos, se cubrieron las placas e incubaron durante 2 horas. Después se realizó un nuevo proceso de lavado y secado, luego se agregaron 100 μ l de anticuerpo de detección diluido en cada pozo, se cubrieron las placas y se incubaron nuevamente por 2 horas. Seguido de un nuevo proceso de lavado, se agregó 100 μ l de dilución de trabajo de estreptavidina-peroxidasa de rábano picante (HRP) a cada pozo y se incubó por 20 minutos a temperatura ambiente protegiendo la placa de la luz. Se prosiguió con un proceso de lavado y secado y luego se agregaron 100 μ l de sustrato (peróxido de hidrogeno estabilizado con tetrametilbencidina) y la placa se incubó por 20 minutos a temperatura ambiente. Finalizando esta última incubación, se agregaron 50 μ l del reactivo de parada (ácido sulfhídrico 2N) asegurando el cambio de color en la reacción. Por último, se procedió a la lectura en un espectrofotómetro o lector de ELISA. La lectura de la densidad óptica de cada pocillo se midió inmediatamente después de parada la reacción usando un lector de microplacas ajustado a 450 nm. Se creó una curva de calibración utilizando un software de computadora capaz de generar un ajuste de curva logístico de cuatro parámetros (4P-L), utilizando para esto la densidad óptica (D.O) de los estándares con concentraciones que van de 78.1, 156.2, 312.5, 625, 1250, 2500, 5000 pg/ml para NGAL y de 31.3, 62.5, 125, 250, 500, 1000 y 2000 pg/ml para YKL-40. Por último, la D.O de las muestras se trazaron frente a la curva de las concentraciones estándar de NGAL y YKL-40 y se ajustó por el factor de dilución para obtener la concentración de las muestras. El principio de reacción del ELISA llevado a cabo en el estudio se puede observar en la **Figura 9**. Muestras de plasma que sobrepasaron niveles de YKL-40 superiores a 160 ng/ml no se pudieron seguir diluyendo lo cual llevó a que el nivel de estos pueda ser superior e influir en el tamaño de los intervalos y en el hecho que se alcanza un valor máximo idéntico en muchos participantes.

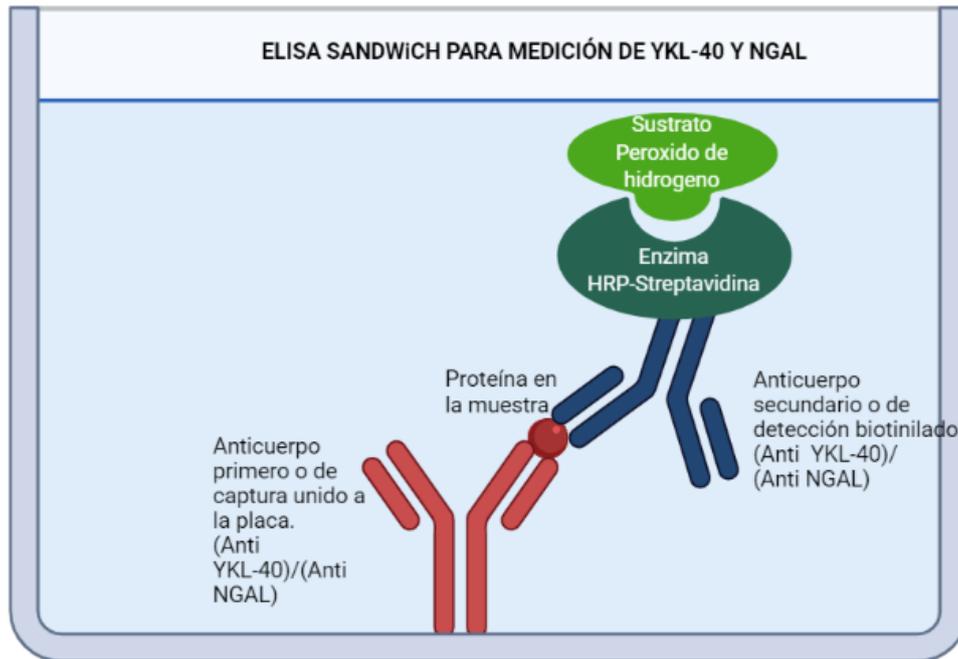


Figura 9. ELISA tipo sandwich para la detección de YKL-40 y NGAL en plasma humano. Se puede observar el anticuerpo de captura en rojo unido a la fase sólida (placa de poliestireno) “capturando” el antígeno en la muestra (YKL-40 o NGAL según sea el kit). Un segundo anticuerpo marcado con biotina reconoce también a la proteína ya unida al primer anticuerpo. La enzima peroxidasa de rábano picante (HRP) con estreptavidina se une al anticuerpo biotinilado para formar un conjugado que es capaz de degradar el sustrato (Peróxido de hidrógeno) para dar color que pueda ser medible. Elaborado por Bayron Zelaya en Biorender.

8.6 Cuantificación de proteínas mediante Olink

Para cuantificar los niveles de expresión de proteínas inflamatorias en plasma que pudieran estar relacionadas con NGAL y YLK-40 se llevó a cabo un ensayo de extensión por proximidad (PEA) utilizando el Panel de Inflamación **Target 96** de Olink. Este método requiere el reconocimiento de dos sondas PEA (anticuerpo unido a oligonucleótido) (**Figura 10**). Primero se incubaron las muestras con las sondas PEA, luego se realizó una pre-amplificación de los oligonucleótidos (**Figura 10A**), luego de un tratamiento con enzimas digestivas se realizó una amplificación por PCR en tiempo real en un chip de tecnología microfluídica de *Fluiding*, con primers específicos que identifican cada proteína en el panel (**Figura 10B**). Los ensayos fueron elaborados por la empresa Olink en Boston, EEUU.

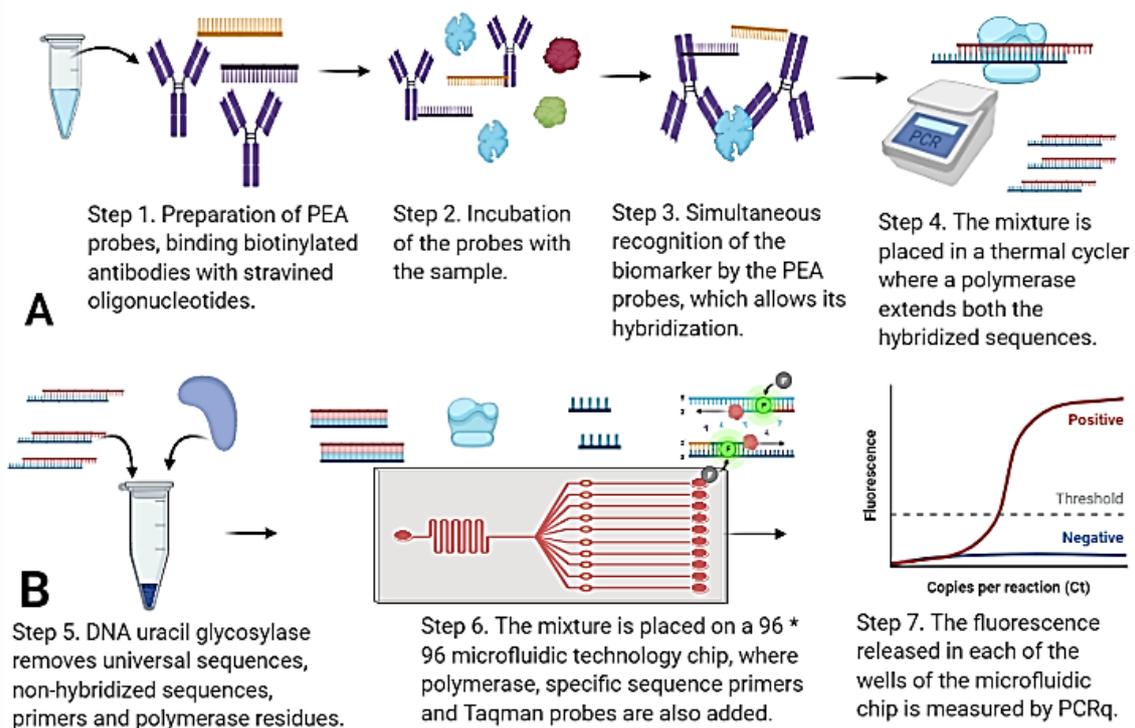


Figura 10. Pasos del ensayo de extensión por proximidad. A) Preamplificación: las muestras fueron incubadas con sondas PEA. B) Amplificación mediante PCRq en un chip de tecnología microfluídica. Figura elaborada por Bayron Zelaya desde Biorender.

8.7 Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo mediante el software SPSS versión 20, GraphPad Prism versión 7. Se realizaron pruebas de comparación de variables entre casos y controles. Para las variables cualitativas se realizó la prueba de Chi cuadrado (X^2) o el test exacto de Fisher. Para las variables cuantitativas primero se evaluó su distribución mediante la prueba de Kolmogorov Smirnov. Se hizo la descripción de algunas variables mediante medias y desviación estándar si la distribución era normal o medianas con rangos intercuartiles si la distribución no era normal. Se realizaron pruebas de correlación de Pearson y Spearman (ρ) entre las proteínas medidas y otras variables cuantitativas obtenidas en los participantes. También se realizaron análisis de comparación entre grupos para variables no paramétricas, se usaron las pruebas de Kruskal Wallis y Mann-Whitney para comparar los valores de los biomarcadores entre los diferentes grupos. Para evaluar la capacidad predictiva de estos biomarcadores se realizaron análisis de *Receiver Operating Characteristic* (ROC). Se realizó también análisis de regresión lineal para determinar el efecto de las variables, edad, género sobre los biomarcadores inflamatorios. Se consideró estadísticamente significativo un valor de $P < 0.05$. En este estudio el valor de P significativo es válido para identificar únicamente diferencias estadísticas y no diferencias clínicas.

8.8. Consideraciones éticas

El estudio fue aprobado por los comités de ética de la Universidad de Cartagena (4169722017) acta 97 con fecha 2/06/2017 y de la Fundación Neumológica Colombiana (232-07122017) y cuenta con el consentimiento informado por escrito firmado por cada uno de los participantes. Para el desarrollo de este proyecto de investigación se cumplieron los principios de la declaración de Helsinki y las normas nacionales para la investigación y el trato con seres humanos y en la toma y procesamiento de sus muestras biológicas.

9. Resultados

9.1 Características de la población del estudio

La cohorte IBACO se formó de pacientes adultos de dos ambientes urbanos de Colombia. Se recolectaron 200 participantes de la ciudad de Cartagena la cual se encuentra a 2 metros sobre el nivel del mar y 197 participantes de Bogotá, ubicada a 2630 metros sobre el nivel del mar. Los participantes del estudio están distribuidos en 4 grupos: 123 pacientes con diagnóstico de asma con una edad promedio de 60.2 años y distribuidos en 38 hombres (30.9%) y 85 mujeres (69.1 %); 74 pacientes con ACO con una edad promedio de 67.4 años, distribuido en 43 hombres (58.1 %) y 31 mujeres (41.9%); 100 pacientes con EPOC con una edad media de 71.9 años y distribuidos en 60 hombres (60%) y 40 mujeres (40%) y 100 sujetos sanos con una edad media de 56.3 años distribuidos en 37 hombres (37%) y 63 mujeres (63%). Teniendo en cuenta estas diferencias entre edades y distribución de género entre los grupos a comparar los análisis fueron corregidos por edad y género. En la **Tabla 2** se muestra como el grupo de pacientes con ACO presentan una frecuencia mayor a exposición al humo de leña que los otros grupos, así como antecedentes de tabaquismo y un consumo actual de tabaco en que en proporción es mayor que el grupo con asma y el grupo control. Los grupos de EPOC y ACO presentan además una media del índice paquete/año mayor al grupo con asma.

Tabla 2. Datos descriptivos de la población en estudio.

Variable	ASMA (n = 123)	ACO (n = 74)	EPOC (n = 100)	CONTROL (n = 100)	P
Edad (años), media ± d.s	60.2±10.9	67.4 ±10.7	71.9 ±7.9	56.3 1±2.9	< 0.0001
Género femenino (%)	69.1	41.9	40	63	< 0.0001
IMC, media ± d.s	27.7 ± 4.6	25.7 ± 4.9	25.1 ± 4.5	25.2 ± 3.9	< 0.0001
Antecedentes de tabaquismo (%)	35.8	82.4	92	24	< 0.0001
Índice paquete/año, media ± d.s	1.9 ± 5.7	20.1 ± 26.7	31.9 ± 26.7	1.3 ± 4.4	< 0.0001
Tabaquismo pasivo (%)	48	45.9	51	33	0.052
Exposición al humo de leña (%)	23.6	50	32	17	< 0.0001
Rinitis alérgica (%)	65	51.4	23	12	< 0.0001
Score disnea (mMRC),. Media ± d.s	1.1 ± 0.9	1.3 ± 1.1	1.7± 1	0.3 ± 0.6	< 0.0001
% FEV ₁ pre-BD media ± d.s	71 ± 20.2	59 ± 19.8	55.9 ± 20.7	95.9 ± 18.5	< 0.0001
% FEV ₁ - post-BD, media ± d.s	77 ±21.6	65.2 ±20.9	59.6 ±21.7	97.7 ±18.3	< 0.0001
% FEV ₁ /FVC- pre-BD, media ± d.s	68 ± 12.3	59.9 ± 12.1	60 ±14	79.9 ± 6.1	< 0.0001
% FEV ₁ /FVC- post-BD %, media ± d.s.	70.8 ± 11.9	61.9 ± 11.4	60.5 ± 14.1	81.8 ± 6.2	< 0.0001
Puntaje-CAT, media ± d.s.	-	12.2± 7.6	14 ± 7.3	-	-
Puntaje-ACQ5, mediana.	3 (1-6)	3.5 (0.7-7)	-	-	-
Puntaje-SGRQ, media ± d.s.	36.5± 17.8	38.8 ±15.4	37± 18.45	-	-
IgE-Total (kU/l)*.	127 (45-290)	190 (61-536)	72.5 (24-175)	57.7 (20-183)	< 0.0001
IgE a <i>D. pteronyssinus</i> (kU/l)*.	0.2 (0.04-6.3)	0.2 (0.04-0.3)	0.05 (0.03-0.2)	0.04 (0.03-0.2)	< 0.0001
IgE a <i>B. tropicalis</i> (kU/l)*.	0.2 (0.01-2.3)	0.1 (0.02-2.7)	0.02 (0.0-0.3)	0.02 (0.0-0.2)	< 0.0001
IgE a <i>A. lumbricoides</i> (kU/l)*.	0.05 (0.01-0.4)	0.07 (0.02-0.5)	0.03 (0.0-0.1)	0.02 (0.0-0.07)	< 0.0001

Nota: **DS:** desviación estándar, **IgE:** Inmunoglobulina E específica, **FVC:** capacidad vital forzada, **FEV₁:** volumen espiratorio forzado en el primer segundo, **BD:** broncodilatador, **IMC:** índice de masa corporal, **CAT:** test de evaluación de la calidad de vida. El valor de *P* se refiere a la probabilidad de que la diferencia observada sea al azar. *Valores de IgE se expresan en mediana y rango intercuartil (IQR).

Se encontraron algunas diferencias significativas en los niveles de biomarcadores entre la ciudad de Cartagena y la ciudad de Bogotá. Pero no hubo diferencias significativas en el grupo de ACO (**Tabla 3**).

Tabla 3. Diferencias entre los valores de los biomarcadores por ciudad (Cartagena vs Bogotá) en cada grupo de pacientes y controles.

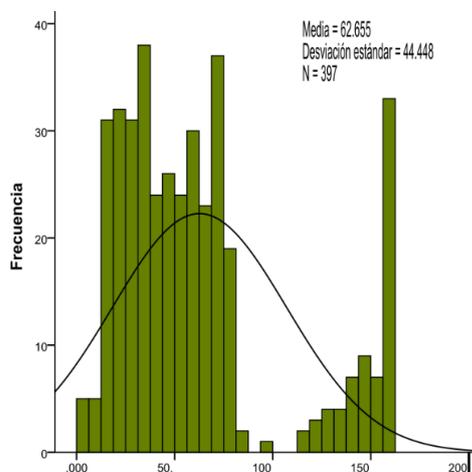
Grupo	YKL-40 ng/ml	Neutrófilos ((Cel/ μ l))	Monocitos (Cel/ μ l)	Linfocitos (Cel/ μ l)	NLR	NGAL ng/ml
ACO	.270	.470	.831	.788	.844	.372
ASMA	.802	.816	.780	.757	.700	.001
Control	.005	.519	.176	.015	.017	.053
EPOC	.725	.008	.591	.055	.054	.189

Nota: Los valores de *P* significativos entre las ciudades por grupo se muestran en rojo.

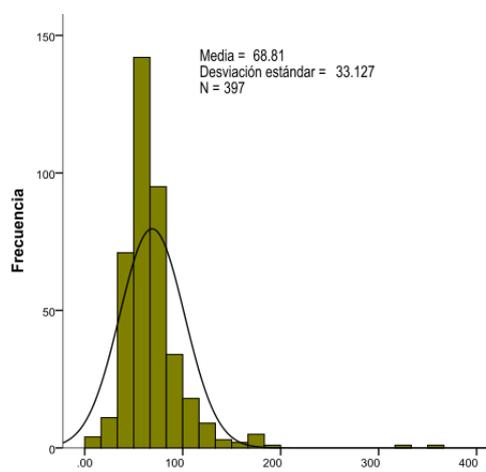
9.2 Distribución de las variables

Se evaluó la distribución de los niveles de los biomarcadores NGAL y YKL-40, así como del número de leucocitos en sangre periférica (neutrófilos, linfocitos, monocitos) y del NLR. Se encontró que esas variables no tenían una distribución normal (KS, $P < 0.05$) y en el caso de YKL-40 se observó una distribución bimodal. Los histogramas de distribución se presentan en la **Figura 11**. Cuando se analizó la distribución por grupo se identificó que para ACO todas las variables tenían distribución no normal (YKL-40 $P < 0.001$, NGAL $P < 0.001$, NLR $P = 0.013$, neutrófilos (Cel/ μ l) $P = 0.02$, monocitos (Cel/ μ l) $P = 0.03$, Linfocitos (Cel/ μ l) $P < 0.001$) pero no así los linfocitos en el grupo de asma ($P = 0.200$) y EPOC ($P = 0.200$).

A) YKL-40 (ng/ml)



B) NGAL (ng/ml)



C) Neutrófilos (células/ μ l)

D) Monocitos (células/ μ l)

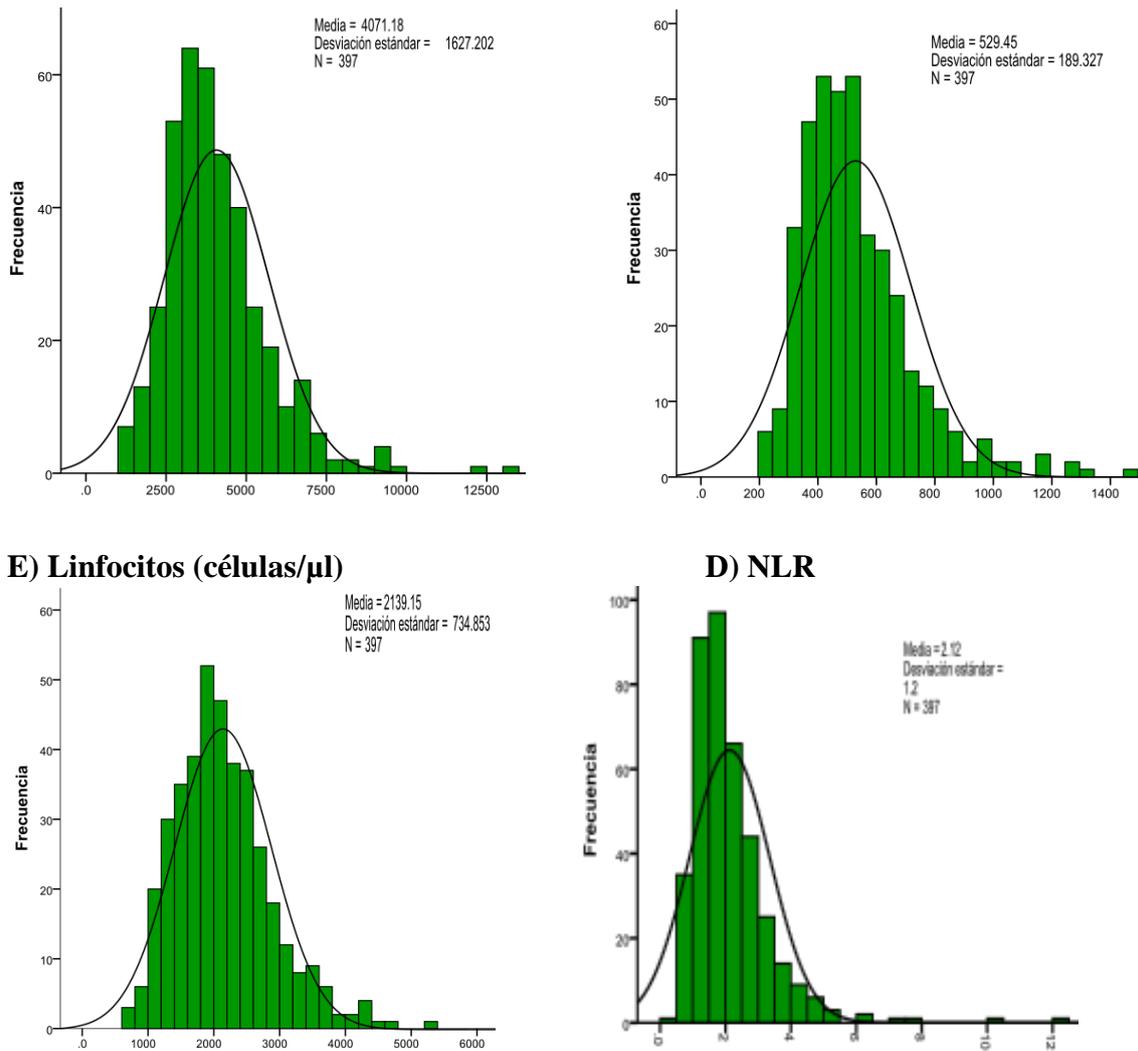


Figura 11. Histogramas de distribución de los niveles de biomarcadores analizados en el estudio. A) Proteína 1 similar a la quitinasa 3 (YKL-40), B) Lipocalina asociada a la gelatinasa del neutrófilo (NGAL), C) Neutrófilos (células/ μ l), D) Monocitos (células/ μ l), E) Linfocitos (células/ μ l), F) Cociente neutrófilos/linfocitos (NLR).

9.3 Análisis de biomarcadores de la respuesta inflamatoria en los diferentes grupos.

Se llevó a cabo un análisis comparativo entre los niveles de las proteínas YKL-40 y NGAL entre los grupos de estudio y su asociación con otras variables como las proporciones de leucocitos en sangre, parámetros de función pulmonar y niveles de IgE.

9.3.1 YKL-40

Cuando se comparó la concentración media de YKL-40 se encontraron diferencias significativas entre el grupo con asma y el grupo con ACO ($P=0.000021$) siendo más altos en el grupo ACO. También se encontraron diferencias significativas entre el grupo con asma y el grupo con EPOC ($P=0.000003$) siendo más altos en el grupo con EPOC. Como era lo esperado los niveles de YKL-40 fueron más altos en los pacientes con ACO ($P=0.000008$) y en los pacientes con EPOC ($P<0.0001$) al compararlos con los controles sanos. Cabe resaltar que en este estudio no se observaron diferencias significativas

entre los controles sanos y los pacientes con asma. Además, no se observaron diferencias en los niveles de YKL-40 cuando se compararon entre el grupo con ACO y el grupo con EPOC (**Figura 12**). En todos los grupos y debido a la distribución bimodal de este marcador hubo personas con niveles por encima de los 100 ng/ml, pero la proporción de ellos fue mucho más alta en el grupo de pacientes con ACO y en el grupo con EPOC (**Figura 12**). En los resultados obtenidos de YKL-40 mediante ELISA, 35 pacientes sobrepasaron los valores de 160 ng/ml lo cual fue el máximo de lectura y no se pudieron obtener valores cuantitativos más altos. Un total de 24 participantes (12%) de la ciudad de Cartagena tenían niveles mayores de 160 ng/ml y 7 participantes (3.6%) de Bogotá tuvieron datos sobre el nivel de 160 ng/ml. Cuando se analizaron los datos por grupo se pudo observar que 11 participantes con ACO, 4 participantes con asma, 5 participantes del grupo control y 11 participantes con EPOC sobrepasaron los 160 ng/ml lo que puede la parte superior de la gráfica comparativa de YKL-40 (Figura 12).

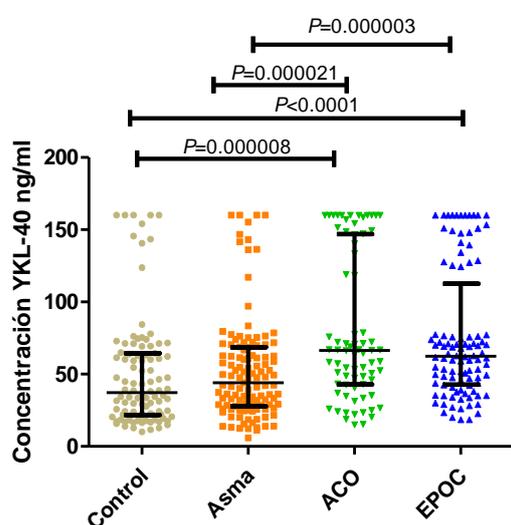


Figura 12. Comparación entre niveles de YKL-40 (ng/ml) entre pacientes con Asma, ACO, EPOC y grupo control. **YKL-40:** Proteína 1 similar a la quitinasa 3, **ACO:** Superposición EPOC/asma, **EPOC:** Enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

9.3.2 Correlación entre los niveles de YKL-40 y leucocitos en sangre.

Se realizó un análisis de correlación de Spearman (ρ) entre los niveles de YKL-40 en el plasma de los pacientes y los conteos de células de sangre periférica. La proteína YKL-40 mostro correlación positiva y significativa con el número de neutrófilos ($\rho=0.20$, $P<0.0001$) y con el número de monocitos ($\rho=0.16$, $P=0.0012$) aunque con coeficientes por debajo de 0.3 (**Figura 13**), pero no con el número de linfocitos, basófilos y eosinófilos.

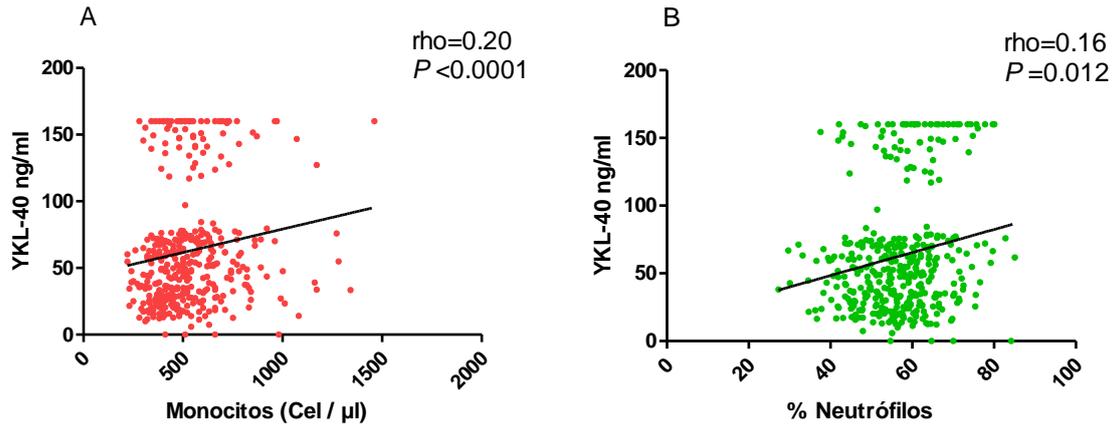


Figura 13. Gráfica de correlación de Spearman (ρ) entre YKL-40 y las células de sangre periférica. A) correlación YKL-40 y los monocitos, B): correlación YKL-40 y porcentaje de neutrófilos. Cel/ μ l = número absoluto de células/ μ l.

9.3.3 NGAL

Cuando se realizaron los análisis comparativos de los niveles de NGAL entre los grupos, se encontró que existían diferencias significativas en la concentración de NGAL entre pacientes con asma y ACO ($P=0.002$), entre pacientes con asma y EPOC ($P=0.000003$), pero no entre los pacientes con ACO y EPOC (**Figura 14**). NGAL también tuvo diferencias significativas entre los controles y los pacientes con asma ($P=0.003$) que estuvo dirigida por la disminución de los niveles de NGAL en los asmáticos. Cabe anotar que no hubo diferencias en los niveles de NGAL entre los controles sanos y los pacientes con ACO o EPOC.

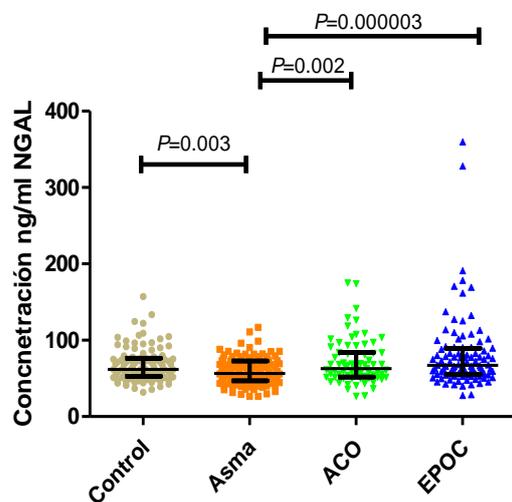


Figura 14. Comparación entre niveles de NGAL en pacientes con asma, ACO, EPOC y grupo control. **NGAL**; Lipocalina asociada a la gelatinasa del neutrófilo, **ACO**: Superposición EPOC/asma, **EPOC**: Enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

9.3.4 Correlación entre los niveles de NGAL y leucocitos en sangre.

Los niveles de NGAL se correlacionaron positivamente y de manera significativa con el número de neutrófilos ($\rho=0.26$, $P<0.0001$) y el número de monocitos ($\rho=0.27$, $P<0.0001$) pero no con el número de linfocitos, basófilos y eosinófilos (**Figura 15**).

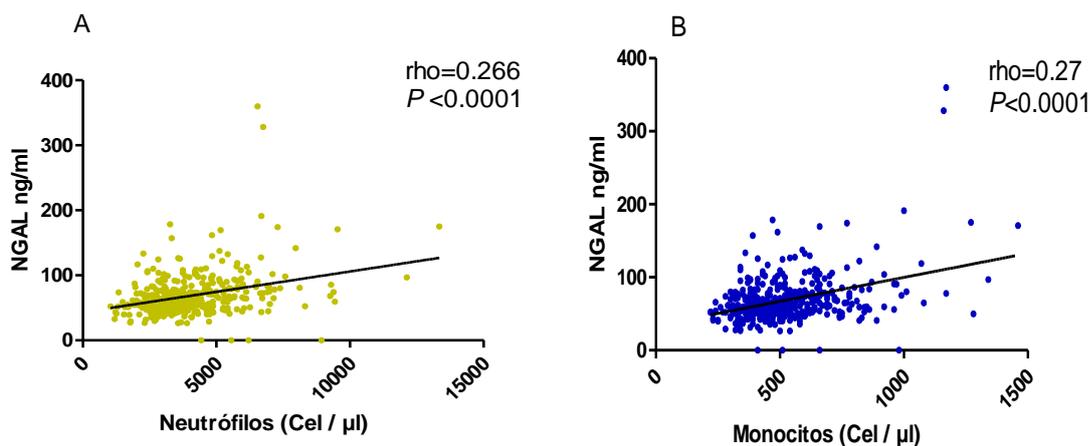


Figura 15. Gráfica de correlación de Spearman (rho) entre NGAL y células de sangre periférica. A) NGAL y los conteos de neutrófilos, B) NGAL y los conteos de monocitos.

9.4 Comparación de los niveles de leucocitos en sangre periférica entre los diferentes grupos

La comparación en el número de células de sangre periférica se muestra en la **Figura 16**. No hubo diferencias en el número de linfocitos entre los grupos (**Figura 16A**). Se encontraron diferencias significativas en el número de neutrófilos, dadas por el aumento de estas células en los pacientes con asma ($P=0.001$), EPOC ($P=0.000013$) y ACO ($P=0.000003$) comparado con los controles sanos (**Figura 16B**). El número total de monocitos mostró diferencias significativas entre el grupo de pacientes con asma y EPOC ($P=0.02$), asma y el grupo control ($P=0.003$), entre el grupo de ACO y control (0.001), también entre el grupo de EPOC y control ($P=0.000001$), pero no hubo diferencias cuando se compararon los grupos con asma y ACO, ni cuando se compararon los grupos de ACO y EPOC (**Figura 16C**). Cuando se analizó el NLR se encontró que este era más alto en los pacientes con asma ($P=0.00029$), EPOC ($P<0.0001$) y ACO ($P<0.0001$) comparado con los controles sanos. Sin embargo, mostró diferencias entre asma y ACO ($P=0.017$) y entre asma y EPOC ($P=0.021$) pero no mostró diferencia entre ACO y EPOC (**Figura 16D**).

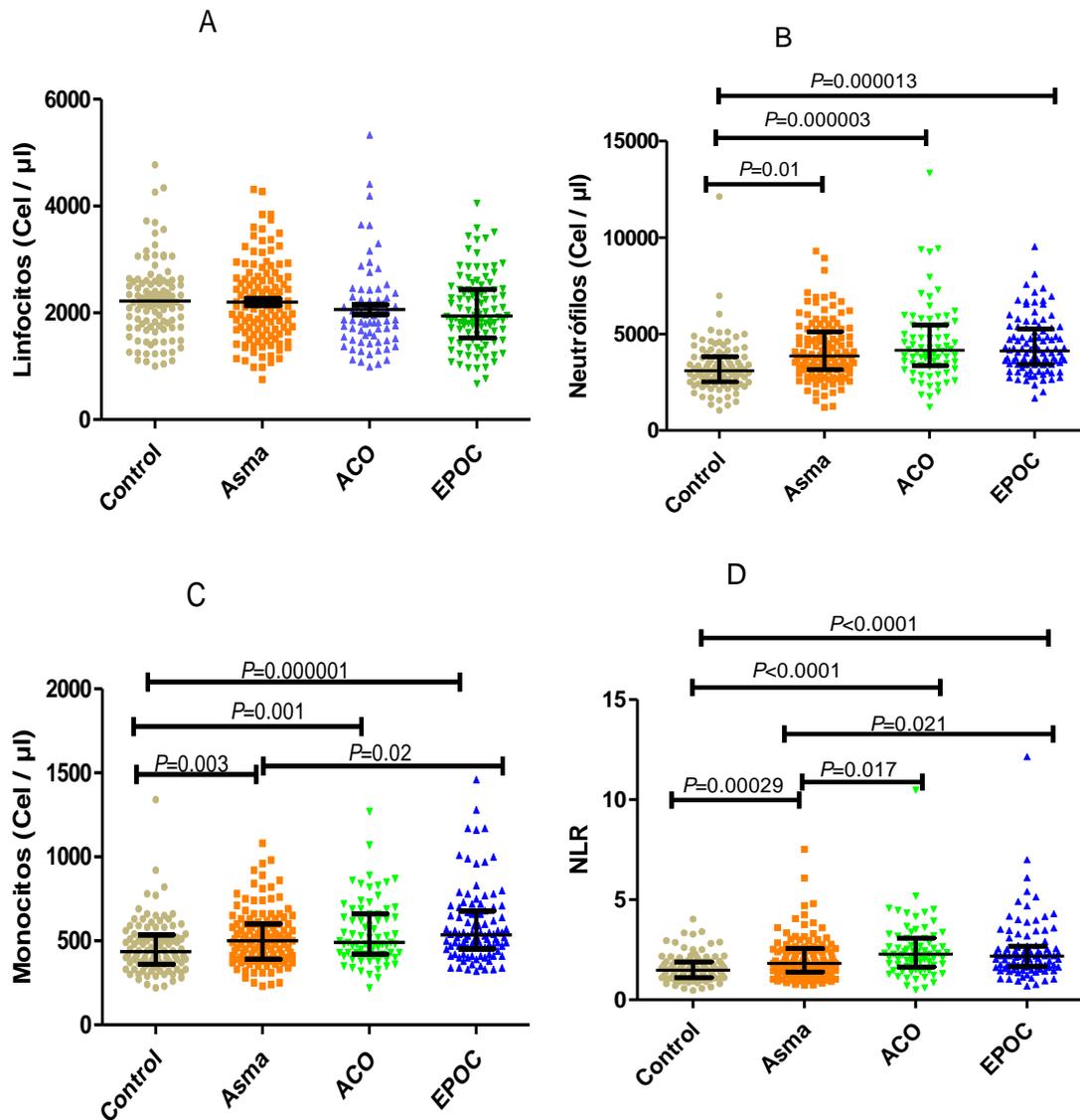


Figura 16. Se observan las gráficas comparativas de los niveles celulares en la población en estudio. A) recuento de linfocitos, B) recuento de neutrófilos, C) recuento de monocitos y D) NLR. **NLR:** cociente neutrófilos linfocitos, **ACO:** Superposición EPOC/asma, **EPOC:** Enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

9.5 Asociación de biomarcadores con variables clínicas y demográficas

Se llevó a cabo un análisis de correlación entre los niveles de las proteínas YKL-40 y NGAL con los parámetros de función pulmonar, células de sangre periférica, número de hospitalizaciones por año y número de visitas a urgencias (**Tabla 3**). También se analizó la correlación entre el número de leucocitos en sangre periférica con los parámetros de función pulmonar y los niveles de IgE total y específica (**Tabla 4**). Se encontró que YKL-40, NGAL, el número de neutrófilos, el número de monocitos y el NLR tuvieron una correlación negativa con los valores de función pulmonar. Además, el NLR tuvo una correlación positiva débil con los niveles de IgE total y específica. Aunque significativas la gran mayoría de esas correlaciones fueron débiles.

Tabla 4. Correlación YKL-40, NGAL y variables de función pulmonar y número de células en el grupo ACO.

	YKL-40 (ng/ml)	NGAL (ng/ml)
%FEV1 PRE	-.245*	
% FEV1 post BD	-.307**	
% FEV1/FVC post BD	-.252*	-.269*
% FEV1/FVC PRE		-.264*
Monocitos (Cel / μ l)	.227*	.347**
Neutrófilos (Cel / μ l)	.221*	.460**
NLR	.293*	.364**

0.61 a 1
0.31 a 0.60
0.1 a 0.30
-0.1 a -0.3
-0.31 a -0.61
-0.61 a -1

Nota: Volumen expiratorio forzado por segundo (FEV₁), Capacidad vital forzada (FVC), Broncodilatador (BD), Cociente neutrófilos-linfocitos (NLR). * significancia <0.05, ** significancia < 0.01, *** significancia <0.001

Tabla 5. Correlación entre células de sangre periférica y variables clínicas en el grupo con ACO.

	Neutrófilos (Cel / μ l)	Basófilos (Cel / μ l)	Monocitos (Cel / μ l)	NLR	Eosinófilos (Cel / μ l)
% FEV1 PRE	-.241 [†]			-.243 [†]	
% FEV1 post BD	-.277 [†]			-.258 [†]	
% FEV1/FVC post BD	-.326 ^{**}		-.263 [†]	-.312 ^{**}	.282 [†]
% FEV1/FVC PRE		-.234 [†]	-.246 [†]		
% reversibilidad post BD FEV1/FVC		.323 ^{**}			
% reversibilidad post BD FEV1					-.202
Índice paquete/año		.269 [†]			
Eosinófilos (Cel / μ l)	-.340 ^{**}			-.351 ^{**}	
Monocitos (Cel / μ l)	.580 ^{**}	.233 [†]			
Neutrófilos (Cel / μ l)				.684 ^{**}	
Linfocitos (Cel / μ l)			.251 [†]	-.690 ^{**}	
IgE Dp (KU/l)				.261 [†]	
IgE Bt (KU/l)				.326 ^{**}	
IgE Al (KU/l)				.334 ^{**}	
IgE Total (KU/l)				.286 [†]	

0.61 a 1
0.31 a 0.60
0.1 a 0.30
-0.1 a -0.3
-0.31 a -0.61
-0.61 a -1

Nota: Volumen expiratorio forzado por segundo (FEV₁), Capacidad vital forzada (FVC), Broncodilatador (BD), Cociente neutrófilos-linfocitos (NLR). Inmunoglobulina E (IgE), *Dermathophagoides pteronissinus* (Dp), *Blomia tropicalis* (Bt), *Ascaris lumbricoides* (Al) * significancia <0.05, ** significancia < 0.01, *** significancia <0.0001

9.5.1 Sub análisis de correlación entre los niveles de YKL-40 y el conteo de células de sangre periférica y el grupo ACO.

En el grupo de ACO los datos revelaron que el nivel de YKL-40 y el porcentaje de neutrófilos se correlacionaron significativamente y de manera positiva ($\rho=0.25$, $P=0.03$). Además, YKL-40 alcanzó una correlación positiva ($\rho=0.22$ con un valor de P no significativo ($P=0.051$) con el número de monocitos (**Figura 17**). No hubo correlación significativa con otros leucocitos circulantes.

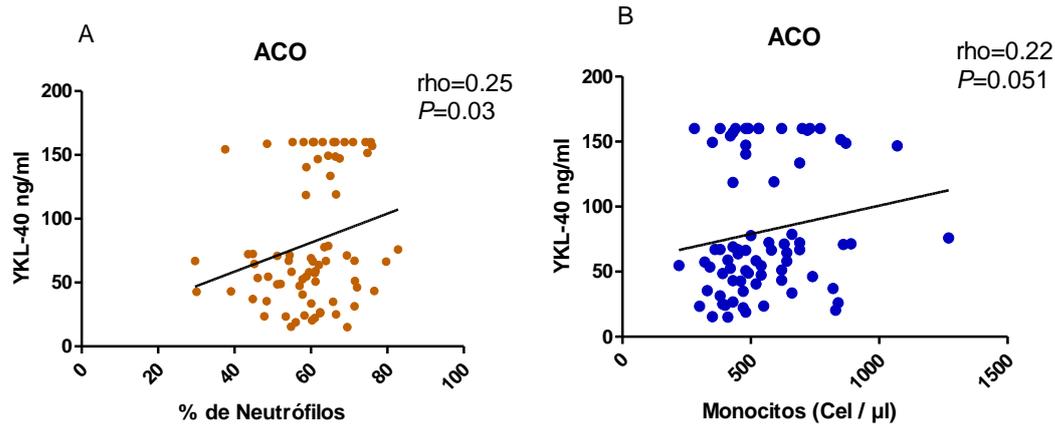


Figura 17. Gráfica de correlación de Spearman (ρ) entre YKL-40 y células de sangre periférica en el grupo con ACO. A) se puede observar la correlación entre YKL-40 y el porcentaje de neutrófilos. B) Correlación entre YKL-40 y el número de monocitos (Cel/ μ l).

9.5.2. Análisis de correlación entre YKL-40 y parámetros de función pulmonar en el grupo ACO.

Se realizaron análisis de correlación de Spearman (ρ) entre YKL-40 y parámetros de función pulmonar y los puntajes CAT, SGQR en el grupo de pacientes con ACO. Los niveles medios de YKL-40 tuvieron correlación negativa y significativa con los valores de %FEV₁/FVC post broncodilatador ($\rho= -0.25$, $P= 0.03$).

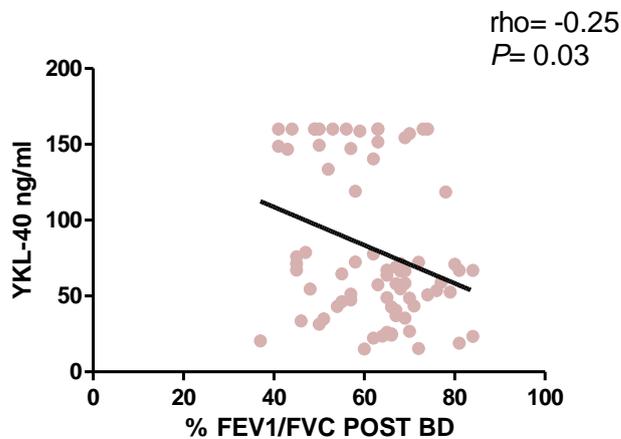


Figura 18. Grafico de dispersión se muestra la correlación de Spearman (ρ) entre YKL-40 y los valores de función pulmonar en el grupo de pacientes con ACO.

9.5.3 Sub analisis de asociación entre los niveles de NGAL y el conteo de células de sangre periférica en el grupo ACO.

Los niveles de NGAL se correlacionaron de manera positiva y significativa con el conteo de neutrófilos ($\rho=0.46$, $P<0.0001$) y monocitos ($\rho=0.34$, $P=0.0024$)

Figura 19. No hubo correlación significativa entre los niveles de NGAL y los linfocitos, eosinofilos y basófilos.

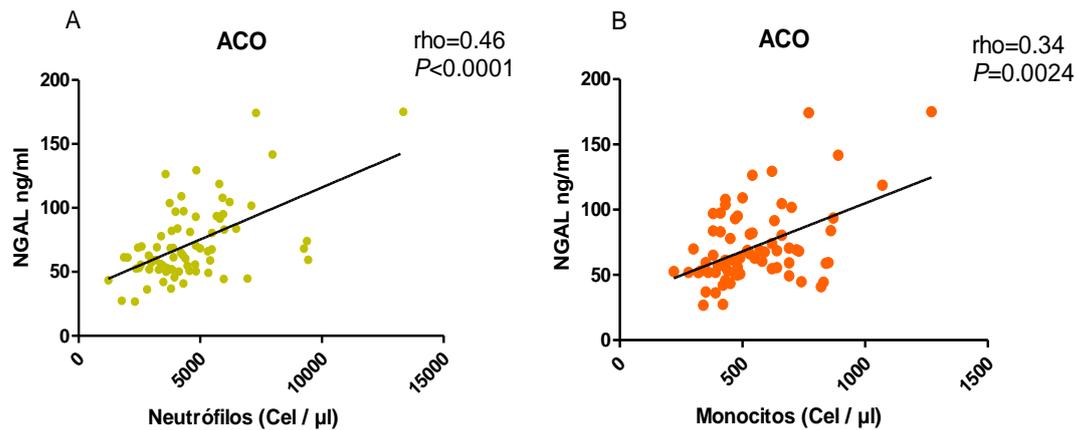


Figura 19. Gráfica de correlación de Spearman (rho) entre NGAL y células de sangre periférica en el grupo con ACO, A) correlación entre NGAL y el número de neutrófilos, B) correlación entre NGAL y el número de monocitos (Cel/ μ l).

9.5.4 Análisis de correlación entre NGAL y parámetros de función pulmonar en el grupo ACO.

NGAL tuvo correlación negativa y significativa con los valores de %FEV₁/FVC post broncodilatador ($\rho = -0.26$, $P = 0.02$). No se observó correlación significativa entre NGAL y las otras variables de función pulmonar ni los puntajes CAT, ni con SGQR en los pacientes con ACO. Así mismo el nivel de la proteína NGAL se correlacionó con la edad ($\rho = 0.378$; $P = 0.0042$) como observa en la **Figura 20**

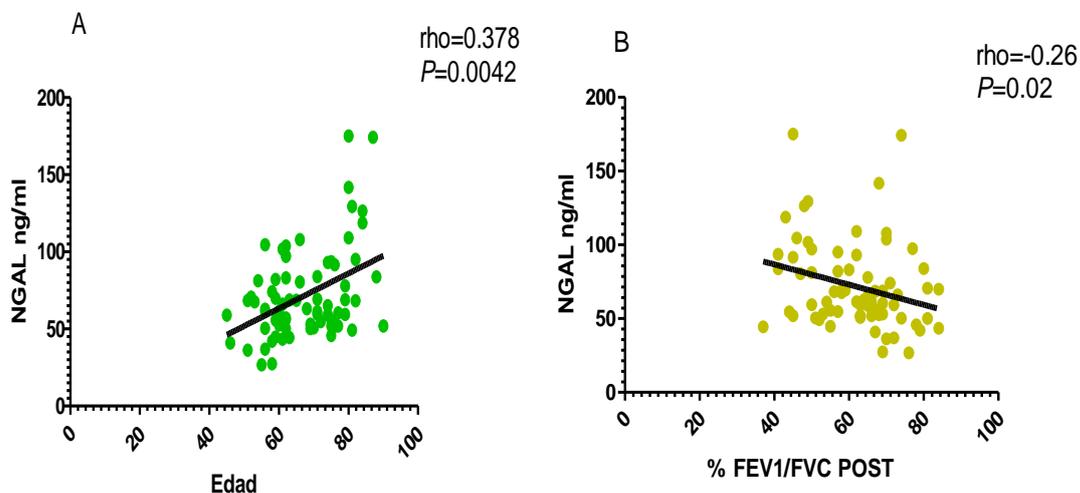


Figura 20. Gráfica de correlación de Spearman (rho) entre A) NGAL y la edad, B) NGAL y el %FEV₁/FVC post broncodilatador.

9.5.5 Correlación entre leucocitos de sangre periférica y parámetros de función pulmonar en el grupo ACO

Se realizaron análisis de correlación entre los niveles de leucocitos de sangre periférica y parámetros como el CAT y el %FEV₁/FVC post broncodilatador (%FEV₁/FVC post BD) en el grupo de pacientes con ACO. Los datos mostraron que el puntaje CAT y los linfocitos tuvieron una correlación positiva significativa.

Los neutrófilos y monocitos tuvieron correlación negativa y significativa con el % FEV₁/FVC post BD como se observa en **figura 21**.

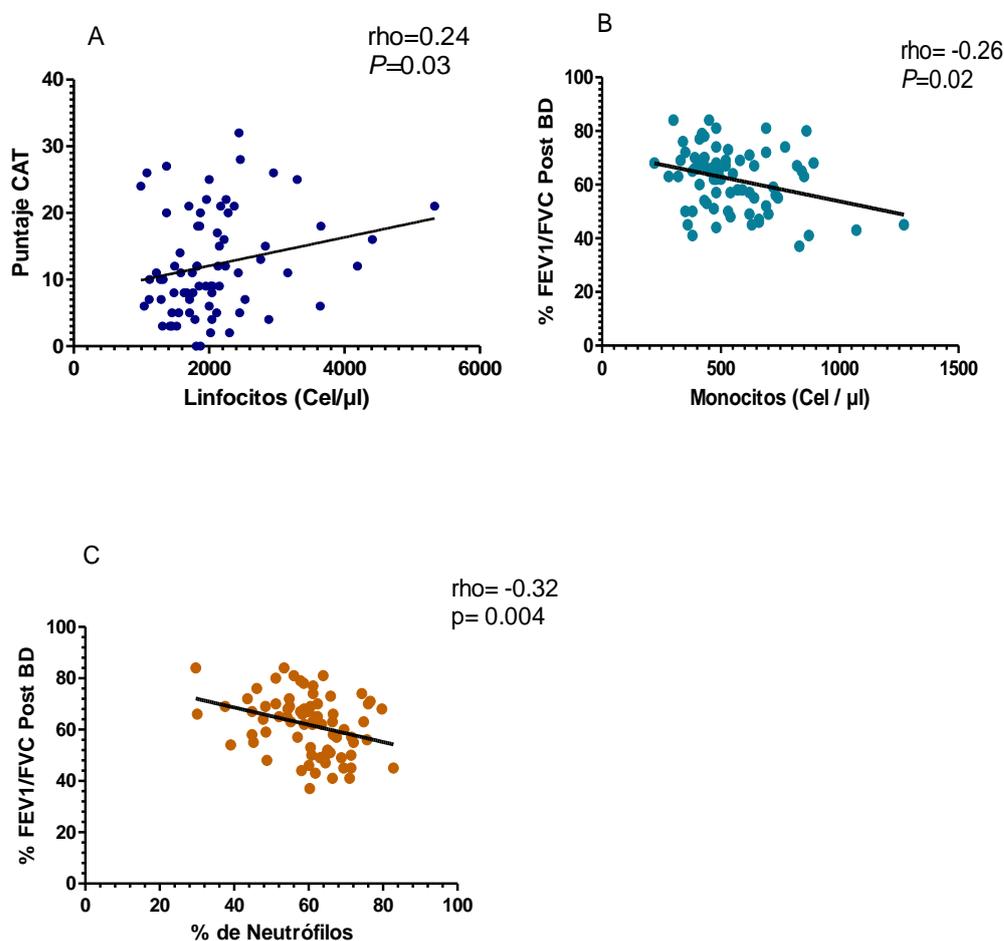


Figura 21. Gráfica que muestran la correlación de Spearman (rho) entre A) puntaje CAT vs linfocitos, B) %FEV₁/FVC post BD vs monocitos, C) %FEV₁/FVC post BD vs porcentaje de neutrófilos.

Los niveles de NGAL y YLK-40 no mostraron correlación con los niveles de IgE. Sin embargo, hubo una correlación significativa, aunque marginal entre el NLR los niveles de IgE total y específica. El NLR también mostró asociación negativa y significativa con los valores de % FEV₁/FVC post BD (rho= -0.31, P= 0.005) y correlación positiva con la edad (rho=0.24, P=0.03) (**Figura 22**).

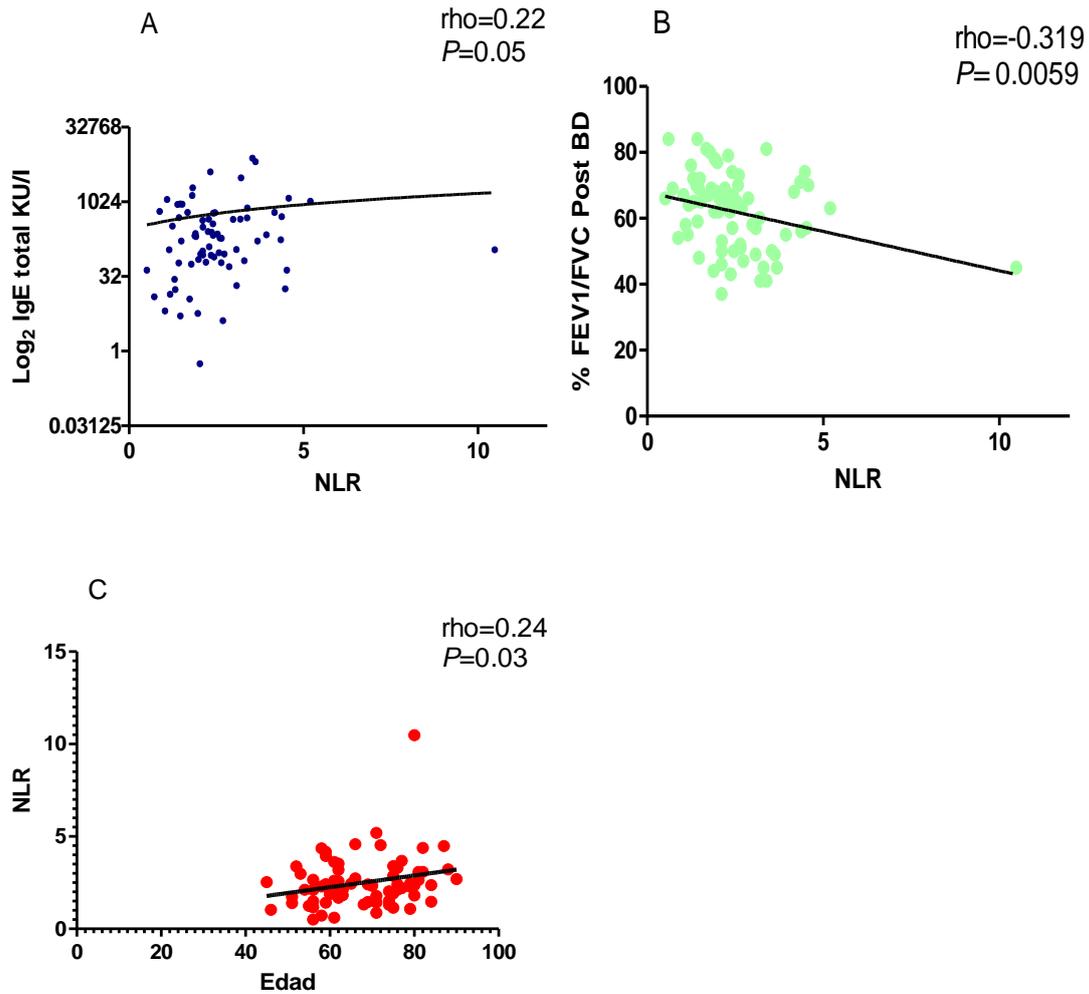


Figura 22. Gráficas de correlación de Spearman (rho) entre A) NLR y la IgE total, B) NLR y función pulmonar y C) NLR y la edad.

9.6 Análisis de regresión lineal

La proteína YKL-40 mostró asociación con el número de neutrófilos, el % FEV₁/FVC post BD y el NLR, pero no fue significativa luego de la corrección por edad y género. La proteína NGAL mostró asociación con el número de neutrófilos, el % FEV₁/FVC post BD y el NLR, así como con la presencia de enfermedad que se mantenía luego de la corrección por edad y género. Además, el NLR se asoció con el número de monocitos, el %FEV₁/FCV post BD y la presencia de enfermedad las cuales se mantenían luego de la corrección por edad y género (**Tabla 5**).

Tabla 6. Análisis de regresión lineal entre los biomarcadores.

Variable predictora	Variable predicha Beta , <i>P</i> valor crudo	Variable predicha Beta, <i>P</i> valor corregido por edad y género.	Asociación con la enfermedad (ACO) después de corregir por edad y género
YKL-40	Monocitos (Cel/μl) β= 0.164, <i>P</i> =0.1 Neutrófilos (Cel/μl) β=0.240, <i>P</i> =0.039 % FEV1/FCV post BD β=-0.283, <i>P</i> =0.014 NLR β= 0.240, <i>p</i> =0.039	Monocitos (Cel/μl) β=0.139, <i>P</i> = 0.3 Neutrófilos (Cel/μl) β=0.170, <i>P</i> =0.1 % FEV1/FCV post BD β=-0.179, <i>P</i> =0.1 NLR β=0.187, <i>p</i> =0.1	β=-0.066, <i>P</i> = 0.634
NGAL	Monocitos (Cel/μl) β=0.474, <i>P</i> =0.000020 Neutrófilos (Cel/μl) β=0.369, <i>P</i> =0.001 % FEV1/FCV post BD β= -0.265, <i>P</i> =0.023 NLR β=0.502, <i>P</i> =0.000005	Monocitos (Cel/μl) β=0.479, <i>P</i> =0.000078 Neutrófilos (Cel/μl) β=0.342, <i>P</i> =0.007 % FEV1/FCV post BD β=-0.132, <i>P</i> = 0.2 NLR β=0.500, <i>P</i> =0.000044	β=0.156, <i>P</i> =0.001
NLR	Monocitos (Cel/μl) β=0.451, <i>P</i> =0.000056 % FEV1/FCV post BD β=-0.296, <i>P</i> =0.010	Monocitos (Cel/μl) β=0.424, <i>P</i> =0.000167 % FEV1/FCV post BD β=-0.225, <i>P</i> =0.046	β=-0.113, <i>P</i> =0.02
Neutrófilos (Cel/μl)	Monocitos (Cel/μl) β=0.218, <i>P</i> =0.062 % FEV1/FCV post BD β=-0.345, <i>p</i> =0.006	Monocitos (Cel/μl) β=0.203, <i>P</i> =0.08 % FEV1/FCV post BD β=-0.260, <i>p</i> =0.021	β=-0.175, <i>P</i> =0.0004
Monocitos (Cel/μl)	% FEV1/FCV post BD β=-0.304, <i>P</i> =0.009	% FEV1/FCV post BD β=-0.233, <i>P</i> =0.041	β=-0.089, <i>P</i> = 0.06
Linfocitos (Cel/μl)	Puntaje CAT β=0.221, <i>P</i> = 0.059	Puntaje CAT β=0.232, <i>P</i> =0.049	β=-0.006, <i>P</i> =0.60

Nota: Valor beta estandarizado, **NLR:** Cociente neutrófilos linfocitos. Cel/μl: Células por microlitro, **CAT:** Test de evaluación de la EPOC.

9.7 Análisis de área bajo la curva (AUC) para YKL-40, NGAL y los conteos de leucocitos.

Primero, se realizó un análisis de curva ROC para investigar si los biomarcadores NGAL, YKL-40, NLR, y las células en sangre periférica (neutrófilos, monocitos y linfocitos) podrían distinguir a los diferentes grupos de pacientes con los sujetos control. Cuando se realizó la curva ROC de los biomarcadores inflamatorio para diferenciar los grupos de pacientes con ACO de los sujetos control (**Figura 23**), se encontró que YKL-40, NLR, monocitos (Cel/μl) y de neutrófilos (Cel/μl) tenían un área bajo la curva >0.6 y con un valor de *P* <0.05, lo que demuestra que estos biomarcadores pudieran distinguir entre sujetos enfermos con ACO de los sujetos sanos.

CURVA ROC ACO VS CONTROL

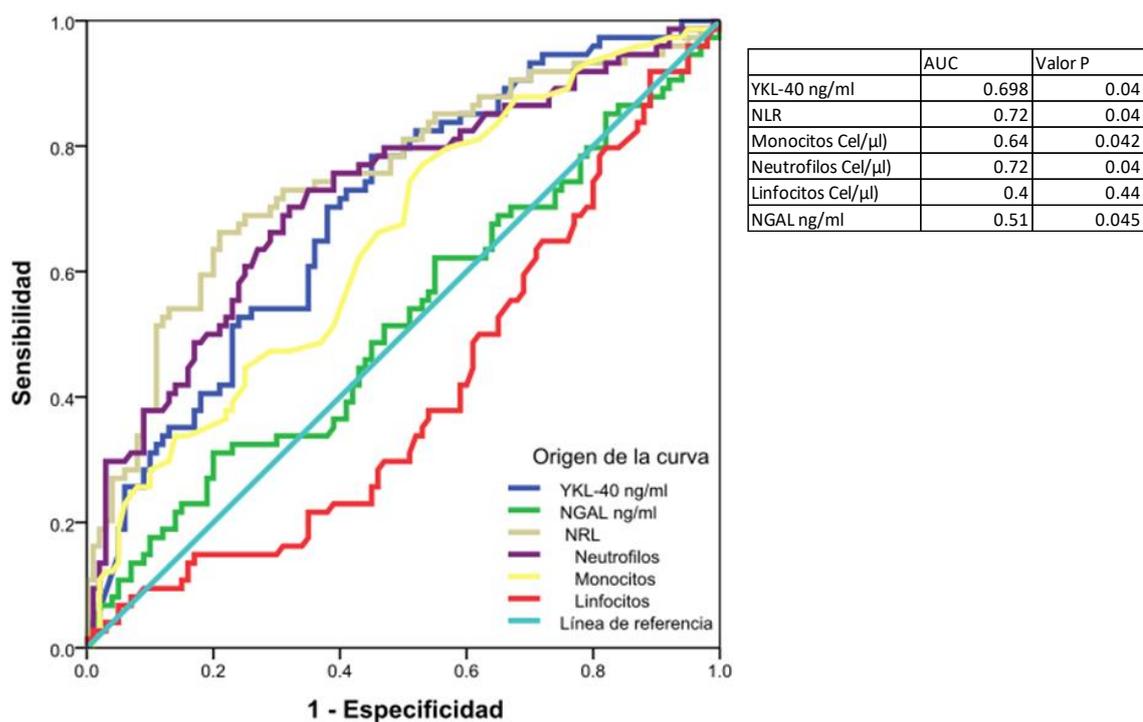
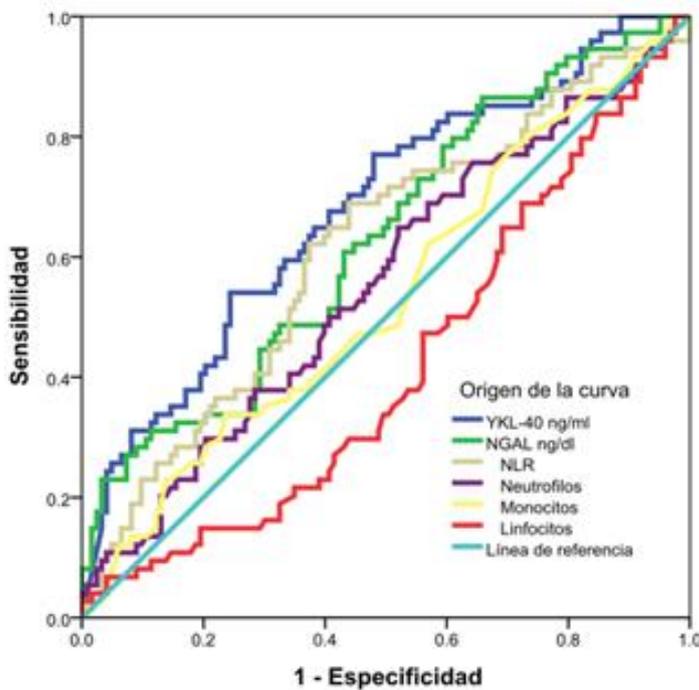


Figura 23. Curva característica operativa del receptor (ROC) con biomarcadores inflamatorios; YKL-40, NGAL, NLR, número de monocitos, número de neutrófilos y número de linfocitos para diferenciar ACO de los sujetos control.

Luego se realizaron análisis de curva ROC para determinar la sensibilidad y especificidad de los 6 biomarcadores en la diferenciación de los pacientes con ACO de aquellos con asma (**Figura 24**). Los datos estadísticos revelaron que YKL-40, NGAL y el NLR tuvieron un área bajo de curva >0.6 y valor de $P < 0.05$ y que estos pudieran llegar a diferenciar a los pacientes con ACO de los pacientes con asma.

CURVA ROC ACO VS ASMA

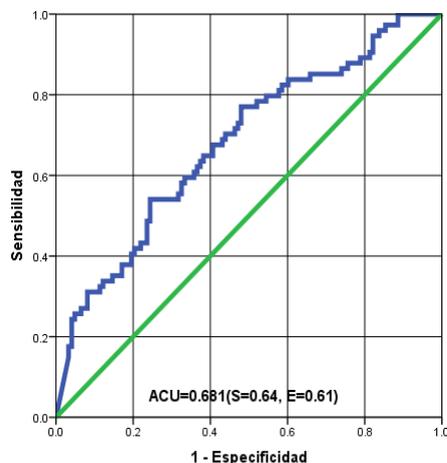


	AUC	Valor P
YKL-40 ng/ml	0.681	0.0001
NLR	0.63	0.017
Monocitos Cel/ μ l)	0.53	0.41
Neutrofilos Cel/ μ l)	0.55	0.18
Linfocitos Cel/ μ l)	0.42	0.06
NGAL ng/ml	0.63	0.002

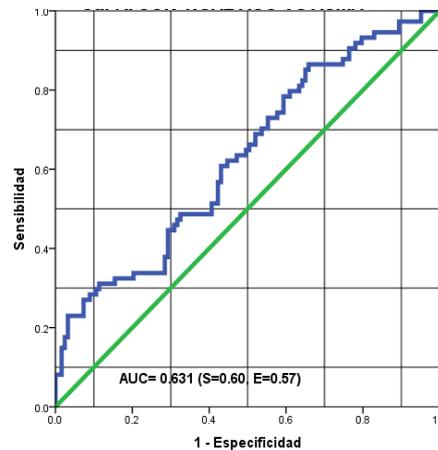
Figura 24. Curvas características operativas del receptor (ROC) con biomarcadores inflamatorios YKL-40, NGAL, NLR, número de monocitos, número de neutrófilos, número de linfocitos para diferenciar los pacientes con ACO de los pacientes con asma.

Después, se analizó la sensibilidad y especificidad de los biomarcadores que se presentaron con el área bajo la curva de >0.6 y con un valor de P significativo para diferenciar entre ACO y asma. Como se puede observar en la **Figura 25 A** el biomarcador YKL-40 mostró una sensibilidad del 64% y una especificidad de 61% para diferenciar a los pacientes con ACO de los pacientes con asma. NGAL mostró una sensibilidad de 60% y una especificidad de 57% para diferenciar a los pacientes con ACO de aquellos con asma (**Figura 25 B**) mientras que el NLR tuvo una sensibilidad de 63% y una especificidad de 60% (**Figura 25 C**).

A) YKL-40 ACO vs ASMA



B) NGAL ACO VS ASMA



C) NLR ACO VS ASMA

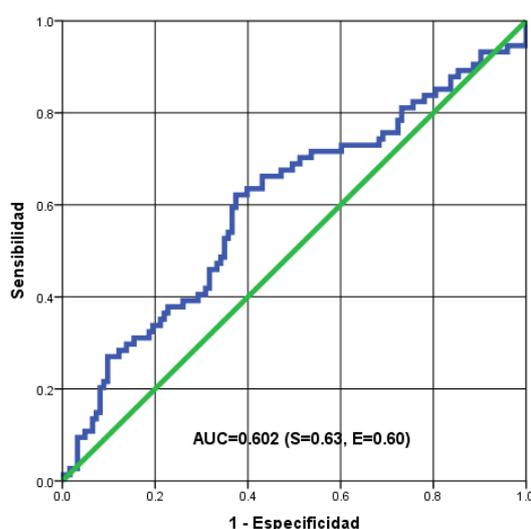
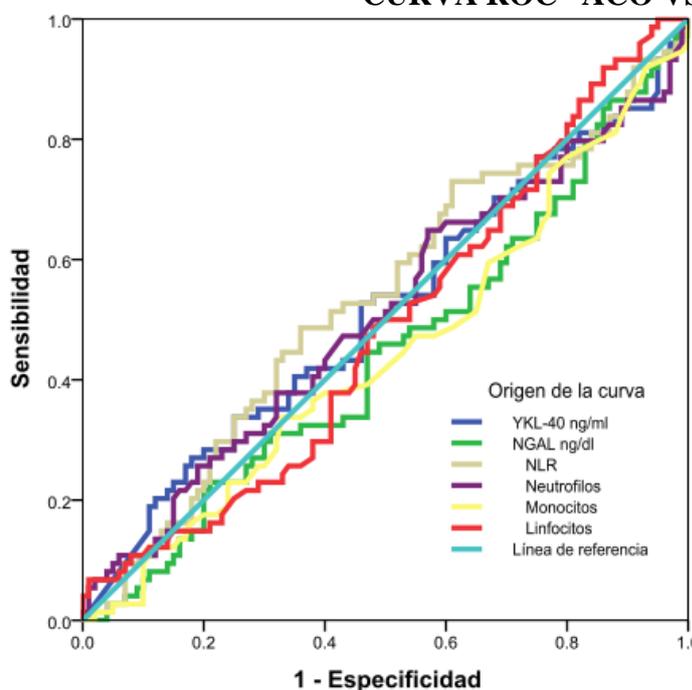


Figura 25. Curvas características operativas del receptor (ROC) con biomarcadores inflamatorios A: NGAL, B: YKL-40, C: NLR. Cada una de las gráficas detalla la sensibilidad y especificidad del biomarcador (percentiles de 50% para YKL-40 y NLR y de 25% para NGAL) para diferenciar ACO de asma.

También se realizó un análisis de curva ROC para dilucidar si los biomarcadores estudiados podrían diferenciar entre los pacientes con ACO y los pacientes con EPOC (**Figura 26**). En los análisis de curva ROC los datos revelaron que ni uno de los biomarcadores tiene un área bajo la curva de más de 0.6 ni significativo para diferenciar entre estos dos grupos.

CURVA ROC ACO VS EPOC



	AUC	Valor P
YKL-40 ng/ml	0.514	0.755
NLR	0.52	0.56
Monocitos Cel/ μ l	0.448	0.23
Neutrofilos Cel/ μ l	0.508	0.86
Linfocitos Cel/ μ l	0.48	0.72
NGAL ng/ml	0.446	0.22

Figura 26. Curvas características operativas del receptor (ROC) de biomarcadores inflamatorios YKL-40, NGAL, NLR, número de monocitos, número de neutrófilos, número de linfocitos para diferenciar los pacientes con ACO de pacientes con EPOC.

9.8 Análisis de Proteínas inflamatorias en el grupo ACO

Por medio de la metodología *proximity extension assay* (PEA) se cuantificaron un panel de 92 proteínas de las cuales se obtuvieron resultados de expresión para 67 proteínas. Se realizó un análisis de correlación de los valores de expresión de proteína normalizada (NPX) de todas las proteínas medidas por PEA y los biomarcadores del estudio en los pacientes del grupo con ACO y EPOC (YKL-40, NGAL, NLR y los leucocitos de sangre periférica). El análisis de correlación de Spearman mostró que la proteína YKL-40 tuvo asociación con los niveles de CCL20, CCL25, CCL3, CSF-1, CST5, CXCL9, HGF, IL-10RB, IL-17C, IL18, IL-18R1, IL6, LAP TGF-beta-1, MMP-10, OPG, OSM, PD-L1, TNF, VEGFA y correlación negativa con TRANCE (**Tabla 6**). Por su parte NGAL tuvo correlación significativa con CCL25, CSF-1, CST5, HGF, IL-10RB, IL18, IL-18R1, IL6, MMP-10, OSM, PD-L1, TNF, CASP-8, CCL23, CCL3, CD40, CX3CL1, EN-RAGE, SLAMF1, TGF-alpha, TNFRSF9, TNFSF14, uPA y correlación negativa con DNER. La correlación entre los leucocitos y las proteínas inflamatorias se presentan en el **Anexo 2**.

Tabla 7. Datos de correlación de Spearman (rho) entre YKL-40, NGAL y las proteínas inflamatorias en el grupo ACO.

	YKL-40 ng/ml	NGAL ng/ml	
CCL20	.249*		0.61 a 1
CCL25	.312**	.246*	0.31 a 0.60
CCL3	.341**		0.1 a 0.30
CSF-1	.321**	.261*	-0.1 a -0.3
CST5	.399**	.311**	-0.31 a -0.61
CXCL9	.250*		-0.61 a -1
HGF	.309**	.343**	
IL-10RB	.367**	.314**	
IL-17C	.232*		
IL18	.274*	.245*	
IL-18R1	.241*	.256*	
IL6	.314**	.362**	
LAP TGF-beta-1	.335**		
MMP-10	.340**	.314**	
NLR	.282*	.350**	
OPG	.487**		
OSM		.403**	
PD-L1	.247*	.384**	
TNF	.238*	.365**	
TRANCE	-.231*		
VEGFA	.365**		
CASP-8		.302**	
CCL23		.412**	
CCL3		.330**	
CD40		.266*	
CX3CL1		.276*	
DNER		-.337**	
EN-RAGE		.446**	
SLAMF1		.327**	
TGF-alpha		.493**	
TNFRSF9		.266*	
TNFSF14		.276*	
uPA		.254*	

Nota; * significancia <0.05, ** significancia < 0.01, *** significancia <0.0001

En el grupo con EPOC los niveles de YKL-40 se correlacionaron con los niveles de IL8, VEGFA, OPG, IL6, IL-17C, CCL11, FGF-21, PD-L1, IL-10RB, HGF, MMP-10, CD5, TNF, CD40, CX3CL1, CCL25, TNFRSF9, CCL20, TNFB, CSF-1.

Por su parte NGAL se correlaciono positivamente con VEGFA, LAP TGF-beta-1, IL-17C, CXCL9, CST5, OSM, SLAMF1, TGF-alpha, TNFSF14, MMP-1, PD-L1, IL-10RB, HGF, MMP-10, CCL23, CD5, TNF, CCL3, EN-RAGE, CD40, CX3CL1,

TNFRSF9, CSF-1 y presento correlación negativa con DNER. Los datos de correlación entre células y proteínas inflamatorias se presentan en el **Anexo 3**.

Tabla 8. Datos de correlación de Spearman (rho) entre YKL-40, NGAL y las proteínas inflamatorias en el grupo EPOC.

	YKL-40 ng/ml	NGAL ng/ml
CCL11	.236 ⁺	
CCL20	.252 ⁺	
CCL23		.320 ^{**}
CCL25	.257 ⁺	
CCL3		.293 ^{**}
CD40	.260 ^{**}	.350 ^{**}
CD5	.308 ^{**}	.239 ⁺
CSF-1	.310 ^{**}	.239 ⁺
CST5	.246 ⁺	.244 ⁺
CX3CL1	.273 ^{**}	.248 ⁺
CXCL9		.222 ⁺
DNER		-.204 ⁺
EN-RAGE		.282 ^{**}
FGF-21	.273 ^{**}	
HGF	.388 ^{**}	.325 ^{**}
IL-10RB	.345 ^{**}	.278 ^{**}
IL-17C	.282 ^{**}	.277 ^{**}
IL6	.205 ⁺	
IL8	.218 ⁺	
LAP TGF-beta-1		.235 ⁺
MMP-1		.248 ⁺
MMP-10	.236 ⁺	.275 ^{**}
OPG	.368 ^{**}	
OSM		.244 ⁺
PD-L1	.251 ⁺	.271 ^{**}
SLAMF1		.401 ^{**}
TGF-alpha		.371 ^{**}
TNF	.213 ⁺	.291 ^{**}
TNFB	.223 ⁺	
TNFRSF9	.364 ^{**}	.391 ^{**}
TNFSF14		.245 ⁺
VEGFA	.292 ^{**}	.300 ^{**}

	0.61 a 1
	0.31 a 0.60
	0.1 a 0.30
	-0.1 a -0.3
	-0.31 a -0.61
	-0.61 a -1

Nota: * significancia <0.05, ** significancia < 0.01, *** significancia <0.001

De un conjunto de 12 proteínas previamente asociadas con ACO se identificó que YKL-40 mantenía asociación con CCL25, CXCL9, OPG, TRANCE y OPG mientras que NGAL mantenía asociación con CCL23, CCL25, EN-RAGE e IL-6.

10. Discusión

En este estudio se investigó por primera vez los niveles de los biomarcadores YKL-40 y NGAL en una población de pacientes del trópico con los fenotipos de asma, EPOC y superposición EPOC/asma. En este trabajo se analizó si los niveles de YKL-40 y NGAL mostraban diferencias significativas entre los pacientes con ACO y aquellos pacientes con EPOC o con asma. También analizamos la correlación entre YKL-40 y NGAL con el número de leucocitos en sangre y otros 67 biomarcadores inflamatorios en plasma. Los resultados mostraron que los niveles de YKL-40 y NGAL no difieren entre los pacientes con ACO y los pacientes con EPOC (**Figura 12 y Figura 14**). Además, encontramos que, si bien NGAL mostró diferencias significativas en sus niveles entre los asmáticos y los pacientes con ACO, los análisis de área bajo la curva mostraron que NGAL no tiene la capacidad de diferenciar esos dos fenotipos con una AUC > 0.70. Otro hallazgo importante en este estudio fue la observación de que ninguno de los conteos de leucocitos circulantes ya sean linfocitos, neutrófilos o monocitos mostraron diferencias entre los pacientes con ACO y los pacientes con EPOC o con asma. Sin embargo, cuando se analizó el cociente neutrófilos linfocitos (NLR) se encontró que este era más alto en pacientes con ACO comparado con pacientes con asma y pudiera ser considerado dentro de los marcadores que pudieran ayudar a distinguir estos dos fenotipos.

Sobre la elevación de YLK-40 en pacientes con fenotipo ACO

YKL-40 es una proteína secretada en procesos inflamatorios y se ha descrito aumentada en enfermedades respiratorias como el asma¹⁰⁰ sin embargo también se ha relacionado con la inhibición de la lesión tisular causada por el proceso inflamatorio¹⁰¹. En este estudio, los niveles de YKL-40 se encontraron aumentados en pacientes con ACO cuando se compararon con los pacientes asmáticos y los controles sanos. Nosotros no observamos diferencias en los niveles de YLK-40 entre asmáticos y controles sanos, lo cual de alguna manera sugiere que este marcador está relacionado con la inflamación que ocurre en el contexto inflamatorio del ACO y del EPOC. Siendo posible también que la función protectora contra el daño y actividad antimicrobiana en las infecciones cuales son frecuentes en EPOC este influyendo en esta elevación de la YKL-40 en estos fenotipos. También evaluamos la correlación entre los niveles de YLK-40 con las diferentes poblaciones de leucocitos para obtener indicios sobre qué tipo celular pudiera estar relacionado con los niveles detectados en sangre y encontramos que en los pacientes con ACO esta proteína mostró relación positiva con el porcentaje de neutrófilos y monocitos lo que va conforme con lo descrito en la literatura sobre la excreción de YKL-40 por parte de células de sangre periférica y células epiteliales al ser estimuladas por el INF- γ e IL-6 y IL-13^{100,102}. Además, YKL-40 mostró correlación negativa con la % FEV₁/FVC post BD indicando que esta proteína pudiera alertar a la pérdida de la función pulmonar en los pacientes con ACO, pero la correlación no se mantuvo cuando se realizó el análisis de regresión corregido por edad y género.

La elevación de YKL-40 en EPOC y ACO en comparación con los pacientes con asma es contradictorio sobre lo que se sabe de YKL-40 como biomarcador elevado en asma¹⁰⁰. Cuando se analizó la asociación entre YKL-40 y neutrófilos, así como entre YKL-40 y el NRL en el grupo de asma, no se encontró correlación

significativa entre estas variables. En este grupo de pacientes con asma un total de 11 (8.9%) tenían valores de YKL-40 arriba de 100 ng/ml y no se observó elevación en el número de neutrófilos ni valores altos de NLR pero hacen falta más estudios para comprender si los valores altos de YKL-40 están asociadas a asma neutrofílica. Una alternativa es que los individuos con niveles elevados de YKL-40 estén bajo la influencia de un loci de rasgo cuantitativo (eQTL). YKL-40 también pudiera estar implicada en el fenotipo de asma de aparición tardía, con disminución de la atopia y el aumento de neutrófilos y monocitos en esputo¹⁰³. Nuestro análisis de correlación con proteínas inflamatorias también sugiere que es muy difícil realizar una clasificación de YKL-40 dentro de la respuesta tipo 2 o no tipo 2 ya que YKL-40 pudiera estar conectada con redes inflamatorias muchos más amplias que las ya descritas lo cual motiva a una investigación más detallada para evaluar estas redes

También es de destacar que la YKL-40 mostro un área bajo la curva de 0.69 con un valor de $P < 0.001$ para diferenciar a los controles sanos de los pacientes con ACO, al igual que para diferenciar a los pacientes con ACO de los pacientes con asma (AUC 0.68 y $P < 0.001$) con una sensibilidad del 64% y una especificidad del 61%, pero no puede diferenciar a los pacientes con ACO de aquellos con EPOC. También observamos una distribución bimodal (**Figura 11**) donde algunos individuos tienen niveles extraordinariamente altos de esta proteína comparados con el resto de la población lo que sugiere que polimorfismos o variantes genéticas están controlando estos niveles. De hecho, estudios previos en esta población señalan que hay polimorfismos en el gen *CHI3L1* que codifica esta quitinasa⁹⁰ que posiblemente pudieran funcionar como eQTL para el control de los niveles de esta proteína. Se ha descrito un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) rs4950928 ubicado en el promotor del gen *CHI3L1*¹⁰⁴. Es necesario implementar otros análisis estadísticos donde se puedan evaluar los niveles de esta proteína teniendo en cuenta esta distribución binomial y su asociación con fenotipos clínicos.

Sobre la elevación de NGAL en pacientes con fenotipo ACO

La proteína NGAL es una proteína antimicrobiana secretada por los neutrófilos activados junto con la metaloproteínasa 9⁷⁴. En este estudio se encontró que NGAL no tuvo diferencias en la media de concentración en el grupo de pacientes con ACO contra los pacientes con EPOC, pero sí tuvo diferencias significativas entre ACO y asma, así como en asma y controles (**Figura 14**). NGAL mostró una asociación positiva y significativa con el número de neutrófilos y monocitos de sangre periférica en el grupo con ACO (**Figura 19**).

Cuando se llevó a cabo el análisis de asociación de NGAL y las enfermedades respiratorias de asma, ACO y EPOC se mantuvo la asociación significativa después de corregir por edad y género $P=0.00092$ (**tabla 5**). Así mismo en este estudio también se encontró una asociación negativa con el % FEV₁/FVC post BD $\rho = -0.026$, $P = 0.02$ (**Figura 18**) sugiriendo una participación de esta proteína en la alteración de la función pulmonar ya sea como resultado de la inflamación o como mediador en el proceso inflamatorio. Estos hallazgos se mantienen en concordancia con estudios ya descritos acerca de la asociación negativa entre la proteína NGAL con los parámetros de función pulmonar¹⁰⁵. La proteína NGAL mostró un área bajo la curva de 0.63, con una sensibilidad de

60% y especificidad de 57% para diferenciar a los pacientes con asma de los pacientes con ACO. Así mismo un área bajo la curva de 0.4 para diferenciar a los pacientes con ACO de los pacientes con EPOC, confirmando así su baja capacidad como biomarcador individual para diferenciar el ACO de las otras enfermedades respiratorias. Algunos estudios han sugerido que este biomarcador puede servir para diferenciar ACO de asma y EPOC cuando se combina con biomarcadores como la YKL-40⁸. Faltarían más estudios que usen de manera combinada este biomarcador con otros como la YKL-40 para la diferenciación y diagnóstico de pacientes con ACO.

Algo interesante en nuestro estudio es el comportamiento de la proteína NGAL es la disminución de sus niveles en los pacientes con asma comparados con los sujetos sanos. Este dato entra en concordancia con reportes que indican que los valores de NGAL se disminuyen en pacientes con asma en comparación con el ACO y la EPOC⁸. Incluso cuando los niveles de neutrófilos en el grupo de asma están más elevados que en el grupo de sanos. El porqué de esta disminución aún no está clara pero varias lipocalinas se han descrito como alérgenos y es posible considerar que la reducción de esta proteína se da por procesos involucrados a la respuesta tipo 2 contra lipocalinas exógenas que afecten a las lipocalinas endógenas¹⁰⁶.

Los análisis de correlación entre los biomarcadores YKL-40 y NGAL con la exposición al humo del tabaco no mostró correlación significativa en ninguno de los grupos. Por otro lado, cuando se analizó la correlación entre la exposición al humo de leña con estos dos biomarcadores se observó que YKL-40 tenía una asociación con el humo de leña en el grupo de pacientes con ACO. Además, varias proteínas previamente asociadas a ACO se encontraron correlacionadas a YLK-40 entre ellas CCL25, CXCL9, OPG, TRANCE, OPG y también con el biomarcador NGAL que mantuvo correlación con CCL23, CCL25, EN-RAGE e IL-6 en el grupo ACO. Queda por evaluar más a detalle la asociación de los niveles de estas proteínas con los niveles de exposición al humo de cigarrillo y al humo de leña.

Sobre la elevación de las células de sangre periférica en pacientes con fenotipo ACO

El cociente neutrófilos/linfocitos (NLR) un marcador inflamatorio de bajo coste que está siendo utilizado ampliamente como biomarcador en muchas enfermedades¹⁰⁷ pero su uso en las enfermedades respiratorias crónicas no está del todo claro¹⁰⁸. En este estudio se analizó el NLR en población con asma, ACO y EPOC, así como en controles sanos y se observó que este marcador tuvo valores medios más altos con diferencias significativas en el grupo con ACO ($x=2.47$, d.s ± 1.42) de aquellos con asma ($x=2.06$, d.s ± 1.05) y también que los sujetos sanos ($x=1.59$, d.s ± 0.67). Cuando se compararon las medias de NLR entre ACO y EPOC ($x=2.45$, d.s ± 1.4) se observó que en el grupo con ACO el NLR tenía una media levemente mayor que en el grupo con EPOC pero no se encontraron diferencias significativas confirmando el importante componente neutrofílico característico en los pacientes con EPOC y que también se manifestaría en los pacientes con ACO. También, NLR mostró asociación

negativa con los valores de función pulmonar y por último se vio una correlación de este marcador con el aumento de la edad. En el análisis de la curva ROC el NLR mostró un área bajo la curva de 0.71 para diferenciar ACO de los controles y un área bajo la curva de 0.60 con una sensibilidad del 63% y una especificidad del 60% para diferenciar ACO de asma. En el análisis de curvas ROC para diferenciar ACO de EPOC mostró un área bajo la curva de <0.6 y no significativa. Demostrando así que no es ideal como un biomarcador único que se pueda emplear para la diferenciación entre ACO de los pacientes con asma y EPOC, pero dado su importante uso en la práctica clínica por su facilidad y bajo coste, no se descarta que se pueda usar en combinación con otros biomarcadores como YKL-40 y/o NGAL.

Los monocitos y los neutrófilos tuvieron diferencias entre los controles y los enfermos, pero no entre los pacientes con ACO de los enfermos con asma y EPOC. Ambos biomarcadores mostraron asociación negativa con los marcadores de la función pulmonar y se mantenía luego de la corrección por género y edad. En el análisis de curva ROC los neutrófilos y los monocitos tenían un área bajo la curva > 0.6 para diferenciar pacientes con ACO de los sujetos control, pero el área bajo la curva en la diferenciación de ACO y asma, así como ACO y EPOC fueron <0.6 indicando su baja capacidad de diferenciar entre enfermedades. Los linfocitos no tuvieron diferencias entre los grupos. Se sabe que estas células son predominantes en las enfermedades inflamatorias respiratorias. Un hallazgo interesante fue que, aunque se sabe que estas células están aumentadas en fenotipos inflamatorios no tipo 2, la correlación con las proteínas secretadas no fue fuerte, sugiriendo que otras fuentes celulares u órganos pudieran estar influenciando esta asociación y la concentración de las proteínas.

En conclusión, aunque se observaron diferencias en los niveles de los marcadores analizados en este estudio especialmente entre el grupo de ACO con los controles sanos y los pacientes con asma, se necesitan más análisis para encontrar las combinaciones apropiadas que puedan aumentar el valor individual que cada uno. En términos de lo que se puede detectar en sangre, el fenotipo ACO es distinguible del asma, pero no es distinguible de la EPOC y por tanto nuestros datos sugieren que el ACO pudiera ser una forma de EPOC y no una entidad clínica en sí misma. Este estudio también confirma el aumento significativo de YKL-40 y de NGAL en pacientes con EPOC comparado con controles sanos sugiriendo que esas proteínas pudieran estar involucradas en su fisiopatología.

11. Agradecimientos

Agradezco a la doctora Nathalie Acevedo por apoyarme en mis 2 años de estudios en el instituto, compartir su conocimiento y colaborar a mi aprendizaje y mi crecimiento académico. Gracias por su disciplina y su incondicional apoyo para llevarme a culminar esta meta.

A Jonathan Ramírez, José Miguel Escamilla, María Mónica de Vivero y a Ronald Regino, quienes me asistieron en varios aspectos clave en la realización de los experimentos, así como de mi proceso diario en Colombia.

A todas las personas involucradas en el estudio, pacientes y colaboradores de salud, principalmente a los médicos encargados del reclutamiento de pacientes, también a los profesionales encargados de la toma de muestras en las ciudades de Bogotá y Cartagena.

A docentes del Instituto, en especial al doctor Javier Marrugo y la doctora Josefina Zakzuk y a mis compañeros Alejandra Puerto, Ernesto Mondol, Jonathan Montoya, Jonathan Rodríguez y Kevin Llinás por su amistad.

Al Ministerio de Ciencias de la República de Colombia (Minciencias) por el apoyo financiero para este proyecto (contrato 756-2017) y por el apoyo a la formación de estudiantes maestría por medio del contrato 229-2020.

Al gobierno de Honduras y el programa becas 20/20 por apoyar con mi proceso de formación académico al brindar parte de los fondos de la beca de estudiantes posgrado en el extranjero.

12. Referencias

1. Baptista, E. A., Dey, S. & Pal, S. Chronic respiratory disease mortality and its associated factors in selected Asian countries: evidence from panel error correction model. *BMC Public Health* **21**, (2021).
2. Executive Committee and Planning Group meeting. Global Alliance Against Chronic Respiratory Diseases (GARD). *World Health Organization* (2017).
3. Soriano, J. B. *et al.* Global, regional, and national deaths, prevalence, disability-adjusted life years, and years lived with disability for chronic obstructive pulmonary disease and asthma, 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet Respir. Med.* **5**, 691–706 (2017).
4. Karampitsakos, T. & Gourgoulianis, K. I. ACOS syndrome: Single disease entity or not? Could exhaled nitric oxide be a useful biomarker for the differentiation of ACOS, asthma and COPD? *Med. Hypotheses* **91**, 20–23 (2016).
5. Izuhara, K. & Barnes, P. J. Can We Define Asthma-COPD Overlap (ACO) by Biomarkers? *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.* **7**, 146–147 (2019).
6. Gava, G. *et al.* Analysis of Blood Biomarkers in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) and with Asthma-COPD Overlap (ACO). *COPD J. Chronic Obstr. Pulm. Dis.* **17**, 306–310 (2020).
7. Gao, J. *et al.* Characterization of sputum biomarkers for asthma-COPD overlap syndrome. *Int. J. COPD* **11**, 2457–2465 (2016).
8. Wang, J. *et al.* Plasma YKL-40 and NGAL are useful in distinguishing ACO from asthma and COPD. *Respir. Res.* **19**, 47 (2018).
9. Bousquet, J., Dahl, R. & Khaltaev, N. Global Alliance against Chronic Respiratory Diseases. *World Heal. Organ.* **62**, 216–223 (2007).
10. Stern, J., Pier, J. & Litonjua, A. A. Asthma epidemiology and risk factors. *Semin. Immunopathol.* **42**, 5–15 (2020).
11. Forum international Respiratory Societies. *The Global Impact of Respiratory Disease – Second Edition Forum of International Respiratory Societies. Sheffield, European Respiratory Society, 2017. IMAGE* (2017). doi:10.1016/j.exphemflusci.2015.12.005
12. Tan, K. Sen *et al.* Respiratory Viral Infections in Exacerbation of Chronic Airway Inflammatory Diseases: Novel Mechanisms and Insights From the Upper Airway Epithelium. *Front. Cell Dev. Biol.* **8**, 99 (2020).
13. Vázquez-García, J. C. *et al.* Estrategia de telesalud para mejorar el diagnostico de EPOC

- y asma en Mexico en el primer nivel de atención. *Neumol. y Cir. Torax(Mexico)* **80**, 11–18 (2021).
14. Zhou, X. L. & Zhao, L. Y. Comparison of clinical features and outcomes for asthma-COPD overlap syndrome vs. COPD patients: A systematic review and meta-analysis. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **25**, 1495–1510 (2021).
 15. Miravittles, M. *et al.* Algorithm for identification of asthma - COPD overlap: Consensus between the Spanish COPD and asthma guidelines. *Eur. Respir. J.* **49**, 10–12 (2017).
 16. GOLD-GINA. Diagnosis of Diseases of Chronic Airflow Limitation: Asthma. COPD and Asthma-COPD Overlap Syndrome (ACOS). *Glob. Initiat. asthma Glob. Initiat. chronic Obstr. lung Dis.* 189–193 (2015). doi:10.1007/978-3-662-47178-4_13
 17. Marsh, S. E. *et al.* Proportional classifications of COPD phenotypes. *Thorax* **63**, 761–767 (2008).
 18. Alshabanat, A., Zafari, Z., Albanyan, O., Dairi, M. & FitzGerald, J. M. Asthma and COPD overlap syndrome (ACOS): A systematic review and meta analysis. *PLoS One* **10**, (2015).
 19. Miravittles, M. *et al.* Characterisation of the overlap COPD-asthma phenotype. Focus on physical activity and health status. *Respir. Med.* **107**, 1053–1060 (2013).
 20. Plaza, V. *et al.* Consenso sobre el solapamiento de asma y EPOC (ACO) entre la Guía española de la EPOC (GesEPOC) y la Guía Española para el Manejo del Asma (GEMA). *Arch. Bronconeumol.* **53**, 443–449 (2017).
 21. Yanagisawa, S. & Ichinose, M. Definition and diagnosis of asthma e COPD overlap (ACO). *Allergol. Int.* **67**, 172–178 (2018).
 22. Gelb, A. F., Christenson, S. A. & Nadel, J. A. Understanding the pathophysiology of the asthma-chronic obstructive pulmonary disease overlap syndrome. *Curr. Opin. Pulm. Med.* **22**, 100–105 (2016).
 23. Hardin, M. *et al.* The clinical and genetic features of COPD-asthma overlap syndrome. *Eur. Respir. J.* **44**, 341–350 (2014).
 24. Rhee, C. K. Phenotype of asthma-chronic obstructive pulmonary disease overlap syndrome. *Korean Journal of Internal Medicine* **30**, 443–449 (2015).
 25. National Institute of Health/ National Institute of cancer. Available at: <https://www.nih.gov/about-nih/what-we-do/nih-almanac/national-cancer-institute-nci>.
 26. Lee, H., Van Tho, N., Nakano, Y., Lee, B. J. & Park, H. Y. A diagnostic approach and natural course of a patient with asthma-COPD overlap syndrome. *Respirol. Case Reports* **3**, 119–121 (2015).
 27. Maselli, D. J. & Hanania, N. A. Management of asthma COPD overlap. *Ann. Allergy, Asthma Immunol.* **123**, 335–344 (2019).
 28. Silva O., R., Montes, J. F., García-Valero, J. & Olloquequi, J. Cellular effectors of the inflammatory response in chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Rev. Med. Chil.* **143**, 1162–1171 (2015).
 29. Athanazio, R. Airway disease: Similarities and differences between asthma, COPD and bronchiectasis. *Clinics* **67**, 1335–1343 (2012).
 30. Huang, X. *et al.* Differential DAMP release was observed in the sputum of COPD, asthma

and asthma-COPD overlap (ACO) patients. *Scientific Reports* **9**, (2019).

31. Reséndiz-Hernández, J. M., Camarena, Á., Pérez-Rubio, G. & Falfán-Valencia, R. Mecanismos inmunológicos de la respuesta inflamatoria en EPOC. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias* **69**, 210–217 (2010).
32. Cosío, B. G. EPOC. *Arch Bronconeumol.* **43**, 15–23 (2007).
33. Pazmiño, F. A. & Navarrete-Jiménez, M. L. Immunologic mechanisms involved in the pathology of allergic asthma. *Revista Facultad de Medicina* **62**, 639–647 (2014).
34. Núñez-Naveira, L., Montero-Martínez, C. & Ramos-Barbón, D. Oxidación, inflamación y modificaciones estructurales. *Arch. Bronconeumol.* **43**, 18–29 (2007).
35. Fu, J. J., McDonald, V. M., Gibson, P. G. & Simpson, J. L. Systemic inflammation in older adults with asthma-COPD overlap syndrome. *Allergy, Asthma Immunol. Res.* **6**, 316–324 (2014).
36. Aksoy, E. *et al.* Neutrophil to lymphocyte ratio is a better indicator of COPD exacerbation severity in neutrophilic endotypes than eosinophilic endotypes. *Int. J. COPD* **13**, 2721–2730 (2018).
37. Saitoh, T. *et al.* Neutrophil extracellular traps mediate a host defense response to human immunodeficiency virus-1. *Cell Host Microbe* **12**, 109–116 (2012).
38. Abadie, V. *et al.* Neutrophils rapidly migrate via lymphatics after Mycobacterium bovis BCG intradermal vaccination and shuttle live bacilli to the draining lymph nodes. *Blood* **106**, 1843–1850 (2005).
39. Puga, I. *et al.* B cell-helper neutrophils stimulate the diversification and production of immunoglobulin in the marginal zone of the spleen. *Nat. Immunol.* **13**, 170–180 (2012).
40. Jaeger, B. N. *et al.* Neutrophil depletion impairs natural killer cell maturation, function, and homeostasis. *J. Exp. Med.* **209**, 565–580 (2012).
41. Borregaard, N., Sørensen, O. E. & Theilgaard-Mönch, K. Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins. *Trends Immunol.* **28**, 340–345 (2007).
42. Németh, T., Sperandio, M. & Mócsai, A. Neutrophils as emerging therapeutic targets. *Nat. Rev. Drug Discov.* **19**, 253–275 (2020).
43. Talukdar, S. *et al.* Neutrophils mediate insulin resistance in mice fed a high-fat diet through secreted elastase. *Nat. Med.* **18**, 1407–1412 (2012).
44. Drechsler, M., Megens, R. T. A., Van Zandvoort, M., Weber, C. & Soehnlein, O. Hyperlipidemia-triggered neutrophilia promotes early atherosclerosis. *Circulation* **122**, 1837–1845 (2010).
45. fridlenber 2009.pdf.
46. Jönsson, F. *et al.* Mouse and human neutrophils induce anaphylaxis. *J. Clin. Invest.* **121**, 1484–1496 (2011).
47. Wei, Q. *et al.* Relationship between Th17-mediated immunity and airway inflammation in childhood neutrophilic asthma. *Allergy, Asthma Clin. Immunol.* **17**, 1–12 (2021).
48. Panettieri, R. A. Neutrophilic and Pauci-immune Phenotypes in Severe Asthma. *Immunol. Allergy Clin. North Am.* **36**, 569–579 (2016).

49. Panettieri, R. A. The Role of Neutrophils in Asthma. *Immunol. Allergy Clin. North Am.* **38**, 629–638 (2018).
50. Shilovskiy, I. P., Nikolskii, A. A., Kurbacheva, O. M. & Khaitov, M. R. Modern View of Neutrophilic Asthma Molecular Mechanisms and Therapy. *Biochem.* **85**, 854–868 (2020).
51. David, B., Bafadhel, M., Koenderman, L. & Soyza, A. De. Eosinophilic inflammation in COPD : from an inflammatory marker to a treatable trait. *Trorax* **76**, 188–195 (2021).
52. Benjamin, J. T. *et al.* Neutrophilic inflammation during lung development disrupts elastin assembly and predisposes adult mice to COPD. *J. Clin. Invest.* **131**, 1–16 (2021).
53. Proboszcz, M. & Paplińska, M. Phenotypic Variations of Mild-to-Moderate Obstructive Pulmonary Diseases According to Airway Inflammation and Clinical Features. *Jornal Inflamm. Res.* **14**, 2793–2806 (2021).
54. Jasper, A. E., Mciver, W. J., Sapey, E. & Walton, G. M. Understanding the role of neutrophils in chronic inflammatory airway disease [version 1 ; peer review : 2 approved]. *F1000Research* **8**, 557 (2019).
55. Iwamoto, H. *et al.* Differences in plasma and sputum biomarkers between COPD and COPD-asthma overlap. *Eur. Respir. J.* **43**, 421–429 (2014).
56. Coillard, A. & Segura, E. In vivo differentiation of human monocytes. *Front. Immunol.* **10**, (2019).
57. Korotkaya, E., Iakovleva, Y., Feoktistov, I. & Sazonov, A. with bronchial asthma. **464**, 1314–1320 (2016).
58. Cosío, B. G. EPOC. *Arch. Bronconeumol.* **43**, 15–23 (2007).
59. Fan Wang, Jiayan Nie, H. W. Characteristics of peripheral Lymphocyte Subset Alteration in COVID-19 Pneumonia. *J. Infectious Diseases* **221**, 1762–1769 (2020).
60. Parra-Ortega, I. *et al.* Detection and quantification of T-cell subpopulations and NK cells in peripheral blood from healthy individuals. *Bol. Med. Hosp. Infant. Mex.* **76**, 66–78 (2019).
61. Luo, X. H., Zhu, Y., Mao, J. & Du, R. C. T cell immunobiology and cytokine storm of COVID-19. *Scandinavian Journal of Immunology* **93**, (2021).
62. Silva O, R., Montes, J. F., García-Valero, J. & Olloquequi, J. Efectores celulares de la respuesta inflamatoria en la enfermedad pulmonar obstructiva crónica. *Rev. Med. Chil.* **143**, 1162–1171 (2015).
63. Jimenez-Alvarez Luis , Joaquin Zuniga Ramos, G. R.-M. Mecanismos Moleculares y Respuesta Inmune En El Pulmón. *Rev. Inst. Nac. Enfermedades Respir.* **22**, 304–315 (2010).
64. Guthrie, G. J. K. *et al.* The systemic inflammation-based neutrophil-lymphocyte ratio: Experience in patients with cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* **88**, 218–230 (2013).
65. Yuan, L. *et al.* The correlational study about neutrophil-to-lymphocyte ratio and exercise tolerance of chronic obstructive pulmonary disease patients. *Medicine (Baltimore)*. **99**, e21550 (2020).
66. Urrejola, G. I. *et al.* Un índice neutrófilo/linfocito elevado se asocia a peor pronóstico

- en. *Rev. Med. Chil.* **141**, 602–608 (2013).
67. Zahorec, R. Ratio of neutrophil to lymphocyte counts--rapid and simple parameter of systemic inflammation and stress in critically ill. *Bratisl. Lek. Listy* **102**, 5–14 (2001).
 68. Lee, S. J. *et al.* Usefulness of neutrophil to lymphocyte ratio in patients with chronic obstructive pulmonary disease: A prospective observational study. *Korean J. Intern. Med.* **31**, 891–898 (2016).
 69. Juusela, M. *et al.* Bronchial hyperresponsiveness in an adult population in Helsinki: Decreased FEV1, the main determinant. *Clin. Respir. J.* **7**, 34–44 (2013).
 70. Chis, A. F. & Pop, C. M. Correlations between neutrophil to lymphocyte ratio, blood eosinophils and clinical characteristics in chronic obstructive pulmonary disease. *Med. Pharm. Reports* **93**, (2019).
 71. Forget, P. *et al.* What is the normal value of the neutrophil-to-lymphocyte ratio? *BMC Res. Notes* **10**, 1–4 (2017).
 72. Kjeldsen, L., Johnsen, A. H., Sengelov, H. & Borregaard, N. Isolation and primary structure of NGAL, a novel protein associated with human neutrophil gelatinase. *J. Biol. Chem.* **268**, 10425–10432 (1993).
 73. Flower, D. R., North, A. C. T. & Sansom, C. E. The lipocalin protein family: Structural and sequence overview. *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology* **1482**, 9–24 (2000).
 74. Goetz, D. H. *et al.* The neutrophil lipocalin NGAL is a bacteriostatic agent that interferes with siderophore-mediated iron acquisition. *Mol. Cell* **10**, 1033–1043 (2002).
 75. Cowland, J. B., Sørensen, O. E., Sehested, M. & Borregaard, N. Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin Is Up-Regulated in Human Epithelial Cells by IL-1 β , but Not by TNF- α . *J. Immunol.* **171**, 6630–6639 (2003).
 76. Chakraborty, S., Kaur, S., Guha, S. & Batra, S. K. The multifaceted roles of neutrophil gelatinase associated lipocalin (NGAL) in inflammation and cancer. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer* **1826**, 129–169 (2012).
 77. Marti-Macia, C. *et al.* Análisis de la lipocalina asociada a la gelatinasa de neutrófilos en el paciente crítico. *Med. Intensiva* **38**, 146–153 (2014).
 78. Guo, Y., Zhai, J., Zhang, J. & Zhou, H. NGAL protects in nasopharyngeal carcinoma by inducing apoptosis and blocking epithelial-mesenchymal transition. *Oncol. Lett.* **19**, 3711–3718 (2020).
 79. Latoch, E. *et al.* Urine NGAL and KIM-1: tubular injury markers in acute lymphoblastic leukemia survivors. *Cancer Chemother. Pharmacol.* (2020). doi:10.1007/s00280-020-04164-3
 80. Maleki-Sadeghi, N., Rahmani, P., Aghsaeifard, Z. & Heidari, G. Effects of aminophylline on the levels of neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) in asphyxiated term neonates. *Arch. Physiol. Biochem.* (2020). doi:10.1080/13813455.2020.1752259
 81. Eagan, T. M. *et al.* Neutrophil gelatinase-associated lipocalin: A biomarker in COPD. *Chest* **138**, 888–895 (2010).
 82. Jo, Y. S., Kwon, S. O., Kim, J. & Kim, W. J. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a complementary biomarker for the asthma-chronic obstructive pulmonary disease

- overlap. *J. Thorac. Dis.* **10**, 5047–5056 (2018).
83. Mukherjee, S. P., Bottini, M. & Fadeel, B. Graphene and the immune system: A romance of many dimensions. *Front. Immunol.* **8**, 1–11 (2017).
 84. Guerra, S. *et al.* The relation of circulating YKL-40 to levels and decline of lung function in adult life. *Respir. Med.* **107**, 1923–1930 (2013).
 85. Rehli, M. *et al.* Transcriptional Regulation of CHI3L1, a Marker Gene for Late Stages of Macrophage Differentiation. *J. Biol. Chem.* **278**, 44058–44067 (2003).
 86. Kazakova, M. H. & Sarafian, V. S. YKL-40--a novel biomarker in clinical practice? *Folia Med. (Plovdiv)*. **51**, 5–14 (2009).
 87. Østergaard, C., Johansen, J. S., Benfield, T., Price, P. A. & Lundgren, J. D. YKL-40 is elevated in cerebrospinal fluid from patients with purulent meningitis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **9**, 598–604 (2002).
 88. Lee, C. G. *et al.* Role of chitin and chitinase/chitinase-like proteins in inflammation, tissue remodeling, and injury. *Annu. Rev. Physiol.* **73**, 479–501 (2011).
 89. Guerra, S. *et al.* Genetic and epigenetic regulation of YKL-40 in childhood. *J. Allergy Clin. Immunol.* **141**, 1105–1114 (2018).
 90. Acevedo, N. *et al.* Genetic variants in chia and chi3l1 are associated with the ige response to the ascaris resistance marker aba-1 and the birch pollen allergen bet v 1. *PLoS One* **11**, 1–20 (2016).
 91. Libreros, S. & Iragavarapu-Charyulu, V. YKL-40/CHI3L1 drives inflammation on the road of tumor progression. *J. Leukoc. Biol.* **98**, 931–936 (2015).
 92. Konradsen, J. R. *et al.* The chitinase-like protein YKL-40: A possible biomarker of inflammation and airway remodeling in severe pediatric asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* **132**, (2013).
 93. Otsuka, K. *et al.* Sputum YKL-40 levels and pathophysiology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Respiration* **83**, 507–519 (2012).
 94. Bara, I. *et al.* Role of YKL-40 in bronchial smooth muscle remodeling in asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **185**, 715–722 (2012).
 95. James, A. J. *et al.* Increased YKL-40 and chitotriosidase in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **193**, 131–142 (2016).
 96. Tong, X. *et al.* The YKL-40 protein is a potential biomarker for COPD: A meta-analysis and systematic review. *Int. J. COPD* **13**, 409–418 (2018).
 97. Shirai, T. *et al.* Combined Assessment of Serum Periostin and YKL-40 May Identify Asthma-COPD Overlap. *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.* **7**, 134-145.e1 (2019).
 98. Miravittles, M. *et al.* Guía española de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (GesEPOC) 2017. Tratamiento farmacológico en fase estable. *Arch. Bronconeumol.* **53**, 324–335 (2017).
 99. Global Initiative for Asthma. *GINA poket. Manejo y Prevencion del asma para adultos y niños mayores de 5 años.* (2019).
 100. Zhu, Z., Zheng, T., Homer, R. J. & Kim, Y. Acidic Mammalian Chitinase in Asthmatic Th2 Inflammation and IL-13 Pathway Activation. *Science (80-.).* **304**, 1678–1682 (2004).

101. Charles S. Dela Cruz^{1,*}, Wei Liu¹, Chuan Hua He¹, Adam Jacoby¹, Alex Gornitzky¹, BingMa¹, Richard Flavell^{2, 3}, Chun Geun Lee¹, and J. A. E. Chitinase 3-like-1 Promotes *Streptococcus pneumoniae* Killing and Augments Host Tolerance to Lung Antibacterial Responses. *Cell Host Microbe* **12**, 34–46 (2012).
102. Komi, D. E. A., Kazemi, T. & Bussink, A. P. New Insights Into the Relationship Between Chitinase-3-Like-1 and Asthma. *Current Allergy and Asthma Reports* **16**, (2016).
103. Kanazawa, J. *et al.* A cis-eQTL allele regulating reduced expression of CHI3L1 is associated with late-onset adult asthma in Japanese cohorts. *BMC Medical Genetics* **20**, (2019).
104. Jinlian Shao, Xuexi Yang, Dunqiang Ren, Y. L. & W. L. A genetic variation in CHI3L1 is associated with bronchial asthma. *Arch. Physiol. Biochem.* **127**, (2021).
105. Kawagoe, J. *et al.* Serum Neutrophil Gelatinase-associated Lipocalin (NGAL) Is Elevated in Patients with Asthma and Airway Obstruction. *Curr. Med. Sci.* **41**, 323–328 (2021).
106. Franziska Roth-Walter, Luis F. Pacios, Cristina Gomez-Casado, Gerlinde Hofstetter, Georg A. Roth, Josef Singer, Araceli Diaz-Perales, E. J.-J. The Major Cow Milk Allergen Bos d 5 Manipulates T-Helper Cells Depending on Its Load with Siderophore-Bound Iron. *PLoS One* **9**, 1–8 (2014).
107. Jimeno, S. *et al.* Prognostic implications of neutrophil-lymphocyte ratio in COVID-19. *European Journal of Clinical Investigation* **51**, (2021).
108. Günay, E. *et al.* Neutrophil-to-lymphocyte ratio in chronic obstructive pulmonary disease: A retrospective study. *Inflammation* **37**, 374–380 (2014).

13. Anexos

Anexo 1. Resolución de permiso del comité de etica.



416972017

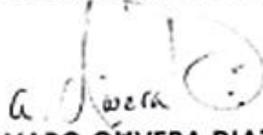
EL PRESIDENTE DEL COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIONES DE LA UNIVERSIDAD DE CARTAGENA

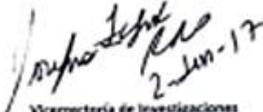
HACE CONSTAR

Que, el proyecto titulado "Identificación de biomarcadores del síndrome de superposición EPOC/Asma", presentado por Nathalle Acevedo, docente de la Facultad de Instituto de investigaciones inmunológicas de la Universidad de Cartagena, se ajusta a los requerimientos de los referentes éticos contemplados en la resolución 8430 de 1993 del Ministerio de Salud y por no tratarse de un proyecto relacionado con ensayos clínicos, se omite el requerimiento contemplado en la resolución 2378 de 2008.

El presente proyecto requiere de Consentimiento Informado, de acuerdo al riesgo mínimo inherente, según la interpretación del artículo 11 de la resolución 08430 de 1993, tal como consta en el Acta N° 97 del Comité de Ética en Investigaciones con fecha 02/06/2017.

Para constancia se firma en la ciudad de Cartagena, el dos (02) de junio del año dos mil diecisiete [2017].


ALVARO OLIVERA DIAZ
Presidente


2 Jun -17

Vicerrectoría de Investigaciones

Centro - Cra. 4 No. 38-80, Clustro de la Merced Telefax: 6642643

E-mail: investigaciones@unicartagena.edu.co

web: www.unicartagena.edu.co

Cartagena de Indias, D.T. y C. - Colombia



Anexo 2. Tabla de correlación de Spearman (rho) entre leucocitos de sangre periférica y proteínas inflamatorias en el grupo de ACO

	Neutrófilos (Cel/ μ l)	Basófilos (Cel/ μ l)	Monocitos (Cel/ μ l)	NLR	Eosinófilos (Cel/ μ l)	Linfocitos (Cel/ μ l)
4E-BP1	.268*				.249*	
CASP-8	.370**		.307**	.257*		
CCL11	.238*		.292*			
CCL20	.278*			.245*		
CCL23	.251*			.269*		
CCL4	.254*			.283*		
EN-RAGE	.577**		.435**	.432**		
Flt3L	-.334**			-.267*		
IL10	.302**					
IL-12B	-.243*					
IL-17C	.389**			.275*		
IL6	.375**			.288*		
MCP-3	.234*					
NGAL ng/ml	.483**					
OSM	.379**			.312**		
TGF-alpha	.332**			.329**		
TNFB	-.252*		.250*			
ADA		-.285*				
CXCL6		-.264*				
DNER		-.317**				
MCP-4		.267*				
CCL25			.265*	.252*		
CXCL11			.310**			
MCP-4			.265*			
SIRT2			.271*			
STAMBP			.287*			
LIF-R				.243*		
VEGFA				.262*		
CCL19				.384**		
TWEAK				-.271*		
IL8						-.295*
CCL23						-.295*

Anexo 3. Tabla de correlación de Spearman (rho) entre leucocitos de sangre periférica y las proteínas inflamatorias en el grupo EPOC

	Neutrófilos (Cel / μ l)	Basófilos (Cel / μ l)	Monocitos (Cel / μ l)	NRL	Eosinófilos (Cel / μ l)	Linfocitos (Cel / μ l)
ADA	.249*		.252*			
CASP-8	.302**		.218*			
CCL11		.217*		.254*		
CCL23		.229*				
CD6	.227*		.200*	-.275**		
CSF-1		.269**		.262**		
CX3CL1				.376**		
CXCL9				.216*		
EN-RAGE		.273**	.234*	.215*		
FGF-19				.202*		
IL10				.217*		
IL-17C				.287**		
IL6		.338**	.212*	.227*		
LIF-R		.259**		.351**		
MCP-4			.199*			
OSM	.258*	.244*	.229*			
PD-L1				.266**		
SCF			-.230*			
SLAMF1	.231*					
TGF-alpha		.303**	.202*	.305**		
TNFSF14	.213*	.218*	.238*			
uPA	.253*					
VEGFA		.226*				