



Revista Clínica Española

www.elsevier.es/rce



ORIGINAL BREVE

Catabolismo muscular en pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica

P. Montenegro Álvarez de Tejera^{a,*}, M.A. Cabanes-Mariscal^a, C. Gutiérrez-Ortega^a, J. Medina Font^a, M.C. Villa-Corbatón^b y J. Gómez de Terreros^b

^a Centro de instrucción de Medicina Aeroespacial-CIMA, Hospital Central de la Defensa Gómez Ulla, Madrid, España

^b Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid, Hospital Central de la Defensa Gómez Ulla, Madrid, España

Recibido el 9 de marzo de 2011; aceptado el 5 de junio de 2011

Disponible en Internet el 11 de octubre de 2011

PALABRAS CLAVE

Bronquitis crónica;
Enfermedad
pulmonar obstructiva
crónica;
HPLC;
Pseudouridina

Resumen

Antecedentes y objetivos: La enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) se acompaña de afectación muscular. La pseudouridina, catabolito del RNA, ha sido empleado en otras afecciones para evaluar el catabolismo muscular. Hemos examinado la excreción de pseudouridina en pacientes con diferentes estadios evolutivos de su EPOC.

Sujetos y métodos: En cuatro grupos de sujetos (controles sanos y enfermos con bronquitis crónica, EPOC emergente y EPOC avanzada) determinamos la excreción urinaria de pseudouridina (orina aleatoria) mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Resultados: La excreción de pseudouridina (cociente pseudouridina/creatinina [Psu/Crea]) en la población sana fue de (media \pm DE) $19,9 \pm 6,6 \mu\text{mol}/\text{mmol}$ y se halló muy incrementada en todos los enfermos con afección pulmonar: bronquitis crónica, $44,1 \pm 60,7 \mu\text{mol}/\text{mmol}$; EPOC emergente, $81,6 \pm 56,8 \mu\text{mol}/\text{mmol}$ y EPOC avanzada, $140,1 \pm 68,0 \mu\text{mol}/\text{mmol}$ ($p < 0,01$ para todas las comparaciones con los sujetos normales y entre los pacientes con afección pulmonar). La edad y el sexo no influyeron en la excreción de pseudouridina.

Conclusión: La excreción de pseudouridina está incrementada en pacientes con bronquitis crónica y EPOC. Se relaciona con el estadio de la enfermedad y su excreción es independiente de la edad y del sexo.

© 2011 Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

KEYWORDS

Chronic bronchitis;
Chronic obstructive
pulmonary disease;
HPLC;
Pseudouridine

Muscle catabolism in patients with chronic obstructive pulmonary disease

Abstract

Background and objectives: Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is accompanied by muscle involvement. Pseudouridine, a catabolite of RNA, has been used in other conditions to assess muscle catabolism. We have examined the excretion of pseudouridine in patients with different stages of COPDs evolution.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: pmonalv@oc.mde (P. Montenegro Álvarez de Tejera).

Subjects and methods: We have defined four population groups: control group (without disease), chronic bronchitis group, emerging COPD group, and advanced COPD group. Pseudouridine was determined by high performance liquid chromatography,

Results: Pseudouridine extraction (pseudouridine/creatinine ratio) was (mean \pm 19.9 (6.6) $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ in control group and was found to be very increased in all the patients with pulmonary condition: chronic bronchitis, 44.1 (60.75) $\mu\text{mol}/\text{mmol}$, 81.6 (56.8) $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ in emerging COPD group and 140.1 (68) $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ in advanced COPD for all the comparisons with normal subjects and among patients with lung disease). Age and gender did not affect pseudouridine excretion.

Conclusions: The urinary excretion of pseudouridine is increased in chronic bronchitis and COPD and is related to disease stage. Its excretion is independent of age and gender.

© 2011 Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción

La enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) es la causa de muerte de más rápido crecimiento en los países con economías desarrolladas¹. Desde el punto de vista económico se ha estimado que el coste anual en España de la EPOC es de unos 238 millones de euros, y ocasiona casi un 35% de las incapacidades laborales definitivas². La gravedad de la EPOC se valora clásicamente por la obstrucción al flujo aéreo (flujo espiratorio forzado en el primer segundo, FEV1)³. La EPOC se considera una enfermedad sistémica inflamatoria crónica⁴ que afecta a diferentes órganos y sistemas con importante repercusión en el estado nutricional⁵, composición corporal y función muscular^{6,7}. Estos hechos se aprecian en estadios tempranos de la enfermedad⁸ y son independientes de la función pulmonar y de la edad^{9,10}. La alteración de la función muscular se asocia a un mal pronóstico, con aumento de la morbilidad y peor calidad de vida, lo que acentúa el interés por su evaluación¹¹⁻¹³.

En la EPOC se produce un desequilibrio metabólico que favorece el catabolismo muscular¹⁴, con predominio de la destrucción sobre la síntesis por un incremento del *turnover* proteico total. Este desequilibrio se puede demostrar mediante la medición de 5-ribosyl uracilo o pseudouridina, un metabolito urinario estable del RNA, que ha venido siendo «utilizado como un índice de la destrucción de las proteínas celulares»¹⁵. La excreción de pseudouridina se ha utilizado en otras afecciones que cursan con una marcada inflamación sistémica¹⁵⁻¹⁹.

En este trabajo hemos examinado la posible relación entre el catabolismo muscular y los estadios evolutivos de la EPOC.

Sujetos y métodos

Este trabajo se fundamenta en un trabajo anterior²⁰. Es un estudio descriptivo, transversal, de cuatro grupos de sujetos. La variable principal es la excreción de pseudouridina. Se calculó el tamaño muestral *a posteriori* mediante el programa Granmo, versión 7. Se requería un número mínimo de 20 individuos por grupo. En todos los grupos se incluyó un número superior a 20.

El ámbito del estudio se circunscribió a la población del distrito de Argüelles de la Comunidad de Madrid. La selección de los individuos se realizó mediante muestreo

consecutivo no probabilística; es decir, los sujetos fueron seleccionados a medida que acudían a una consulta particular de neumología, si cumplían los criterios de inclusión eran asignados a los grupos de EPOC o de bronquitis crónica por criterios clínicos. Los voluntarios sanos se obtuvieron de los acompañantes de los enfermos que consultaron. En todos ellos se descartó afección respiratoria y muscular mediante un exhaustivo estudio clínico y analítico. La población estudiada se dividió en 4 grupos: sujetos sanos y pacientes con bronquitis crónica (BC), EPOC incipiente (estadios I y II de GOLD²¹ [Global Initiative for Chronic Pulmonary Disease]) y pacientes con EPOC avanzada (estadios III y IV de GOLD). Todos ellos se sometieron a un estudio clínico y analítico. Se recogió la historia de tabaquismo (cociente paquetes/año).

Criterios de inclusión

Se exigió para ser considerado sano no haber padecido enfermedad ni haberla sufrido en los seis meses anteriores al estudio. Para el grupo con BC, se requirió que cumplieran los criterios de tos y expectoración sostenida durante tres meses, al menos durante dos años, sin patrón espirométrico de obstrucción de la vía aérea. Los grupos 3 y 4 estuvieron integrados por pacientes con EPOC en situación estable durante los últimos 6 meses, sin tratamiento estable con corticoides orales, y que no hubiesen padecido una enfermedad muscular activa o de carácter caquetizante. Se excluyeron los pacientes con insuficiencia renal.

Criterios de exclusión

Se excluyeron los sujetos sanos que padeciesen alguna afección orgánica, psicológica, dental, toma de fármacos o que mostraran cualquier alteración analítica fuera de los rangos admitidos como normales.

Los pacientes fueron excluidos por presentar insuficiencia renal o miopatía o estar sometidos a pautas orales de corticoides de forma habitual.

La espirometría se efectuó según la normativa de la Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica (SEPAR), y los estadios de la EPOC se establecieron según criterios GOLD²¹. El FEV1 post-broncodilatación, FVC (capacidad vital forzada), FEV1/FVC se determinan utilizando un espirómetro MasterLab 9.20 (Jaeger, Würzburg, Alemania).

Todos los sujetos realizaron sus actividades habituales durante el día anterior. La muestra de orina aleatoria se obtuvo después de un período de reposo (5 mL), por micción espontánea.

¿Qué sabíamos antes de realizar este estudio?

La afectación muscular es frecuente en los pacientes con EPOC, pero no disponemos de un procedimiento clínico sencillo para su evaluación.

¿Qué hemos aprendido?

La determinación de pseudouridina en orina aleatoria se encontró muy elevada en pacientes con bronquitis crónica y en enfermos con EPOC. La gravedad de la EPOC se relacionó de forma directa con la excreción de pseudouridina.

Los editores

La determinación simultánea de pseudouridina (Psu) y de creatinina en orina se realizó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)²². El sistema cromatográfico es un modelo integrado de Beckman Coulter formado por una bomba modelo 126, autoinyector 508, detector espectro-fotométrico de diodos en mosaico modelo 508 y estación de control sobre IBM PC 300. La columna utilizada es una LiChrospher® 100 RP-18 (5 µm) LiChroCART® 250-4 (Merck) y precolumna LiChrospher® 100 RP-18 (5 µm) LiChroCART® 50-4 (Merck), utilizando como fase móvil tampón fosfato (pH 6,1) 0,01 M y ácido octanosulfónico 2,5 mM como agente de par iónico. Detección UV a 250 nm y velocidad de flujo de 1 ml/min. Se trabajó a temperatura ambiente.

La validación del método se realizó mediante análisis de series con concentraciones conocidas de pseudouridina y creatinina, realizando el cálculo de especificidad, linealidad, exactitud y precisión, según los requerimientos de la ICH (*International Conference of Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceutical for human use. Validation of analytical procedures*)²³; mostrando un índice de repetibilidad satisfactorio con coeficientes de variación de 0,67-2,39%, al igual que la precisión intermedia, con coeficientes de variación de 3,4-7,16%. En cuanto a la exactitud, las recuperaciones fueron superiores al 89,80%. La sensibilidad de la técnica, también había resultado

satisfactoria con unos límites de cuantificación (LOQ) inferiores a 0,0035 nmol para pseudouridina y a 0,1718 nmol para creatinina.

El presente estudio se adhiere a las recomendaciones de la Declaración de Helsinki sobre aspectos éticos en la investigación biomédica. La justificación ética del estudio está basada en la gran importancia de la afección a investigar. El comité ético del Hospital Central de la Defensa Gómez Ulla (Madrid-España) aprobó el estudio y todos los participantes efectuaron en presencia de un testigo y por escrito el consentimiento informado. La información recogida tiene carácter confidencial y es transmitida y almacenada según lo dictado en la Ley Orgánica 15/1999 de 13 de diciembre de Protección de Datos.

Tratamiento de datos. Análisis estadístico

Como índices de la tendencia central y de la dispersión de las variables cuantitativas de las distribuciones muestrales se emplearon la media aritmética y la desviación estándar o la mediana y el rango intercuartílico, dependiendo de la asunción o no, respectivamente del supuesto de la normalidad. Para las variables categóricas se emplearon las frecuencias absolutas y relativas porcentuales.

La medida de asociación entre una variable independiente poltómica y dependiente cuantitativa se estimó con el test *F* de Snedecor (ANOVA de una vía) o con el de Kruskal-Wallis, dependiendo del carácter gaussiano o no respectivamente, de dicha variable cuantitativa. Las comparaciones múltiples se efectuaron mediante el test de las medianas, previa corrección del nivel de significación estadística según el número de comparaciones.

Para determinar la relación entre dos variables cuantitativas se empleó el test de correlación de Spearman.

En todos los casos como grado de significación estadística, se empleó un valor de $p < 0,05$ y la aplicación estadística fue el paquete SPSS® versión 15 para Windows (Chicago, Illinois).

Resultados

El número de sujetos estudiado en cada grupo, la edad, el sexo, el índice de masa corporal y la excreción urinaria de pseudouridina se recogen en la [tabla 1](#).

Se estudiaron 23 personas sanas y 99 pacientes con afección respiratoria. La proporción de hombres/mujeres osciló

Tabla 1 Datos antropométricos y excreción urinaria de pseudouridina en sujetos sanos y en pacientes con enfermedades pulmonares

Población	Sana	Bronquitis crónica	Pacientes (GOLD I y II)	Pacientes (GOLD III y IV)	Valor de p
Número de sujetos	23	30	33	36	
Varones/mujeres	16/7	23/7	23/10	20/16	
Edad*	65,8 (14,5)	66,5 (10,2)	65,4 (8,1)	66,3 (9,3)	NS***
IMC*	27,9 (2,2)	27,6 (2,05)	27,9 (1,8)	27,5 (1,6)	NS***
Pseudouridina/creatinina** (µmol/mmol creatinina)	19,9 (6,6)	44,1 (60,7)	81,6 (56,8)	140,1 (68)	$p < 0,001$ ****

Los resultados se expresan como media (desviación estándar). GOLD: *Global Initiative for Chronic Pulmonary Disease*.

Media (desviación estándar); ** Mediana (índice intercuartílico); ***ANOVA de una vía (NS = no significativo); ****Kruskal-Wallis.

entre 2 y 3. Todos los grupos fueron homogéneos en cuanto a edad e índice de masa corporal (IMC) (tabla 1), sin diferencias significativas entre los cuatro grupos.

La excreción media de pseudouridina en el grupo control fue próxima a 20 $\mu\text{mol}/\text{mmol}$. La eliminación media de pseudouridina en los tres grupos de enfermos con afección pulmonar fue muy superior y progresivamente creciente en relación con la gravedad de la enfermedad respiratoria. La diferencia entre la excreción de pseudouridina de los enfermos y los sujetos controles resultó estadísticamente muy significativa ($p < 0,001$). Observamos diferencias estadísticamente significativas en la excreción urinaria de pseudouridina entre el grupo control y los enfermos con bronquitis crónica ($p < 0,001$). Así mismo, entre el grupo con bronquitis crónica y EPOC avanzada (estadios III y IV GOLD), y entre EPOC emergente y EPOC avanzada. También observamos una diferencia estadísticamente significativa entre el grupo con bronquitis crónica y EPOC emergente (estadios I y II GOLD) ($p < 0,05$).

No se observó una relación significativa entre la edad y la excreción de pseudouridina, ni en los controles ni en los grupos de pacientes ($p > 0,05$). Tampoco observamos diferencias significativas entre la excreción de pseudouridina de los hombres y de las mujeres, ni en los controles ni en los grupos de pacientes ($p > 0,05$).

Discusión

En este trabajo documentamos que los enfermos con bronquitis crónica y EPOC presentan una excreción urinaria de pseudouridina muy superior a la de sujetos normales. Además, la excreción urinaria media de pseudouridina fue aproximadamente el doble en pacientes con bronquitis crónica. La eliminación de pseudouridina se relacionó con el grado evolutivo de la EPOC. Estos hechos sugieren que la EPOC tiene una expresión sobre el catabolismo muscular incluso antes que las medidas de función respiratoria detecten parámetros de obstrucción de forma muy claramente significativa por lo que su determinación, no sólo es útil para determinar la alteración del catabolismo en un enfermo concreto, sino que también se relaciona con el grado evolutivo en que éste se encuentra.

El hallazgo de un aumento de la eliminación de pseudouridina en el grupo de bronquitis crónica, traduce que ya en esta etapa de la enfermedad pueden detectarse efectos sistémicos sobre el metabolismo muscular.

Disponer de una variable que determine la función muscular de forma sencilla, fiable y económicamente aceptable, puede ser de gran relevancia por cuanto su afectación constituye un importante índice pronóstico de mortalidad^{24,25}. Esta disfunción muscular debe determinarse desde las primeras etapas de la enfermedad, cuando se encuentra en una fase asintomática e incluso cuando aún no está catalogada como tal, al no apreciarse obstrucción de la vía aérea, como es el caso de la bronquitis crónica. La evaluación de la función muscular se ha realizado en este trabajo determinando el catabolismo proteico muscular con la excreción urinaria de pseudouridina, en una muestra de orina aleatoria

de 5 mL recogida al azar²⁶. La excreción de pseudouridina se estandarizó según la concentración de creatinina.

En nuestro laboratorio este método fue sometido a un estudio riguroso de validación, de acuerdo a los requerimientos de la ICH²², y ha resultado reproducible y fiable²¹. Las cifras obtenidas para nuestra población sana (tabla 1) se sitúan en el rango intermedio de los descritos por otros autores^{14,26-29}.

En este estudio no hemos apreciado una influencia significativa de la edad y del sexo en la excreción de pseudouridina. Estos resultados concuerdan con estudios previos^{10,20}.

Existe una controversia sobre el desequilibrio entre la actividad catabólica y de síntesis de las proteínas y enzimas musculares en la población con EPOC. Mientras algunos destacan que la causa es un defecto en la síntesis de proteínas³⁰⁻³², otros afirman que la causa es el predominio del catabolismo³³. El incremento del índice Psu/Crea pone de manifiesto, a nuestro juicio, el predominio del catabolismo muscular con respecto al anabolismo en la población con EPOC.

También se ha recurrido a este índice para cuantificar el efecto de fármacos sobre la función muscular en procesos oncológicos o caquetizantes^{34,35}. De todo lo expuesto podemos concluir que la excreción urinaria de pseudouridina, expresada en $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ de creatinina, y obtenida en una sola muestra de orina aleatoria por micción espontánea, puede ser un indicador relevante del catabolismo muscular, ya que se encuentra incrementada en la EPOC y se relaciona con el estadio de la enfermedad. Además, esta variable metabólica se encuentra aumentado en los enfermos con bronquitis crónica en los cuáles no se detectan patrones obstructivos respiratorios según los criterios convencionales. Por tanto, los resultados de este estudio indican que la excreción urinaria de pseudouridina puede constituir un instrumento valorable para examinar la función muscular en pacientes con bronquitis crónica y EPOC, de fácil utilización en clínica habitual. Además, esta determinación puede contribuir a mejorar la evaluación de los enfermos con EPOC³⁶, a mejorar su calidad de vida³⁷.

Los resultados sugieren nuevas vías de investigación. Debido a las limitaciones del estudio en el número de pacientes otros estudios deberán comparar los valores de pseudouridina con la presencia de mediadores inflamatorios, su posible correlación con FEV1 y con el cálculo de peso magro e IMC. Sería muy interesante disponer de los resultados de un estudio longitudinal con casos y controles para determinar el valor pronóstico de la excreción urinaria de pseudouridina, en enfermos con EPOC que además presenten o no comorbilidades como diabetes mellitus³⁸⁻⁴⁰.

Financiación

Trabajo financiado por Neumomadrid.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Los autores contribuyen en igual medida en la realización del trabajo.

Bibliografía

1. National Heart, Lung, and Blood Institute. 2004 NHLBI morbidity and mortality chartbook on cardiovascular, lung and blood diseases [Internet]. Bethesda, MD: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health. [consultado 30 Mayo 2011]. Disponible en: <http://www.nhlbi.nih.gov/resources/docs/cht-book.htm>.
2. de Miguel Díaz J, Gómez García T, Pedraza Serrano F. La EPOC, hacia una nueva visión de la enfermedad en el siglo XXI. *Rev Patol Respir*. 2009;12:183-9.
3. Rabe KF, Hurd S, Anzueto A, Barnes PJ, Buist SA, Calverley P, et al. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007;176:532-55. Epub 2007 May 16 [consultado 30 Mayo 2011]. Disponible en: <http://www.goldcopd.org>.
4. Gómez de Terreros Sánchez FJ, Gutiérrez Ortega C, Medina Font J, Montenegro Álvarez de Tejera P, Ariñez Fernández C, Villa Corbatón C, et al. Leucocitos, tabaquismo y enfermedad pulmonar obstructiva crónica. *Sanid Mil*. 2009;65:216-20.
5. Laghi F, Adiguzel N, Tobin MJ. Endocrinological derangements in COPD. *Eur Respir J*. 2009;34:975-96.
6. Kobayashi A, Yoneda T, Yoshikawa M, Ikuno M, Takenaka H, Fukuoka A, et al. The relation of fat-free mass to maximum exercise performance in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Lung*. 2000;178:119-27.
7. Gea J, Barreiro E. Actualización en los mecanismos de disfunción muscular en la EPOC. *Arch Bronconeumol*. 2008;44:328-37.
8. Celli BR, Cote CG, Marin JM, Montes de Oca M, Casanova C, Méndez RA, et al. The Body-mass index, airflow obstruction, exercise capacity index in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med*. 2004;350:1005-12.
9. Bourdin A, Burgel P-R, Chanez P, García G, Perez T, Roche N. Recent advances in COPD: pathophysiology, respiratory physiology and clinical aspects, including comorbidities. *Eur Respir Rev*. 2009;18:198-212.
10. Caro de Miguel MC, Gómez de Terreros Caro FJ, Gutiérrez Ortega C, Callol Sánchez L, Gómez de Terreros Sánchez FJ, Montenegro Álvarez de Tejera P. Relación entre la masa libre de grasa, la masa muscular, la fuerza de contracción voluntaria máxima del cuádriceps y el test de la marcha de 6 minutos en pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica. *Rev Patol Resp*. 2009;12:159-64.
11. Sanjaume M, Almagro P, Rodríguez-Carballeira M, Barreiro B, Heredia JL, Garau J. Mortalidad posthospitalaria en pacientes reingresados por EPOC. Utilidad del índice BODE. *Rev Clin Esp*. 2009;209:364-70.
12. Palop Cervera M, de Diego Damiá A, León Fábregas M, Bravo Gutiérrez FJ, Compte Torregro L. Factores predictores de mortalidad en pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica y exacerbaciones frecuentes. *Rev Clin Esp*. 2010;210:323-31.
13. Pratico D, Basili S, Vieri M, Cordova C, Violi F, Fitzgerald G. Chronic obstructive pulmonary disease is associated with an increase in urinary levels of Isoprostane F2-III, an index of Oxidant Stress. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998;158:1709-14.
14. Bolton CE, Ionescu AA, Shiels KM, Pettit RJ, Edwards PH, Stone MD, et al. Associated loss of fat-free mass and bone mineral density in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004;170:1286-93.
15. Bolton CE, Broekhuizen R, Ionescu AA, Nixon LS, Wouters EFM, Shale DJ, et al. Cellular protein breakdown and systemic inflammation unaffected by pulmonary rehabilitation in COPD. *Thorax*. 2007;62:109-14.
16. Boreck EC, Kerr SJ. Atypical transfer RNA_s and their origin in neoplastic cells. *Adv cancer Res*. 1972;15:163-90.
17. Yongtian Li, Soasen W, Ning Z. Simultaneous determination of pseudouridine and creatinine in urine of normal children and patients with leukaemia by high performance liquid chromatography. *Biomedical Chromatography*. 1992;6:191-3.
18. Ionescu AA, Nixon SL, Luzio S, Lewis Jenkins V, Evans WD, Stone MD, et al. Pulmonary function, body composition and protein catabolism in adults with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;165:495-500.
19. Seidel A, Brummer S, Seidel P, Fritz GI, Herbarth O. Modified nucleosides: an accurate tumour marker for clinical diagnosis of cancer, early detection and therapy control. *Brit J Cancer*. 2006;94:1726-33.
20. Montenegro Álvarez de Tejera P, Gutiérrez Ortega C, Gómez de Terreros J, Cabanes Mariscal MA, Sánchez López P, Callol Sánchez L. Análisis del catabolismo muscular en la enfermedad pulmonar obstructiva Crónica. *Rev Patol Resp*. 2011;14:159-64.
21. Global Initiative for Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Global strategy for the diagnosis, management and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. NHLBI/WHO workshop report, 2001. [consultado 30 Mayo 2011]. Disponible en: <http://www.goldcopd.com>.
22. Cabanes MA, Montenegro P, Chamorro G, Sánchez P, Álvarez P, Prats P. Desarrollo y validación de un método de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para la determinación de pseudouridina en orina. Posible marcador en el diagnóstico precoz y control de la terapia en la enfermedad pulmonar obstructiva crónica. *Farm Hosp*. 2008;32:251.
23. ICH. International Conference of Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceutical for human use. Validation of analytical procedures: methodology. 6 noviembre 1996.
24. Coronell C, Orozco-Levi M, Méndez R, Ramírez-Sarmiento A, Gladis JB, Gea G. Relevance of assessing quadriceps endurance in patients with COPD. *Eur Respir J*. 2004;24:129-36.
25. Maltais F, Leblanc P, Jobin J, Casaburi R. Peripheral muscle dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Chest Med*. 2000;21:665-77.
26. Sjolín KE. Correlations of pseudouridine in 8-hour and 24-hour urinary samples, determined by high-performance liquid chromatography. *Urol Res*. 1982;10:245-8.
27. Liebich HM, Di Stefano C, Wixforth A, Schmid HR. Quantitation of urinary nucleosides by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A*. 1997;763:193-7.
28. Pane F, Orimi G, Kuo K, Gehke CH, Salvatore F, Sacchetti L. Reference intervals for eight modified nucleosides in serum in healthy population from Italy and the United States. *Clin Chem*. 1992;38:671-7.
29. Tamura S, Fujii J, Nakano T, Hada T, Higashino K. Urinary pseudouridine as a tumour marker in patients with small cell lung cancer. *Clin Chim Acta*. 1986;154:125-32.
30. Man W, Kemp P, Moxham J, Polkey M. Skeletal muscle dysfunction in COPD: clinical and laboratory observations. *Clin Sci*. 2009;117:261-4.
31. Doucet M, Russell AP, Leger B, Debigaré R, Joanisse DR, Caron M, et al. Muscle atrophy and hypertrophy signalling in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007;176:261-9.
32. Cepelack I, Dodig S, Romic D, Ruljancic N, Popovic-Grle S, Malic A. Enzyme catalytic activities in chronic obstructive pulmonary disease. *Arch Med Research*. 2006;37:624-9.
33. Engelen MPKJ, Deutz NERP, Wouters EFM, Schools AMWJ. Enhanced levels of whole-body protein turnover in patients with Chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;162:1488-92.

34. Tamura S, Fujii J, Nakano T, Hada T, Higashino K. Urinary pseudouridine as a tumor marker in patients with small cell lung cancer. *Clin Chim Acta*. 1986;154:125–32.
35. Motyl T, Traczyk Z, Ciesluk S, Daniewska-Michalska D, Kukulsa W, Kaluzny Z, et al. Blood plasma pseudouridine in patients with malignant proliferative diseases. *Eur J Clin Chem Clin Biochem*. 1993;31:765–71.
36. Martín-Escudero JC. Conducta a seguir ante la EPOC desde medicina interna. *Rev Clin Esp*. 2010;210:171–7.
37. Martín-Escudero JC. Calidad de vida y EPOC. *Rev Clin Esp*. 2009;209:59–60.
38. Almagro P, López-García F, Cabrera FJ, Montero L, Morchón D, Díez J, et al. Estudio de las comorbilidades en pacientes hospitalizados por descompensación de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica atendidos en los Servicios de Medicina Interna. *Estudio ECCO Rev Clin Esp*. 2010;210:101–8.
39. Álvarez Sala R. La enfermedad pulmonar obstructiva crónica. Más allá de los pulmones. *Rev Clin Esp*. 2010;210:124–6.
40. Gómez-Huelgas R, Buonaiuto V, Medina P, de San Román CM. EPOC y diabetes. ¿Algo más que una simple coincidencia? *Rev Clin Esp*. 2010;210:533–4.