



ORIGINAL

Análisis del catabolismo muscular en la enfermedad pulmonar obstructiva crónica

P. Montenegro Álvarez de Tejera^{a,*}, C. Gutiérrez Ortega^a, J. Gómez de Terreros^b, M.A. Cabanes Mariscal^a, P. Sánchez López^a y M. Hijosa Pedregosa^a

^aHospital Central de la Defensa Gómez Ulla, Madrid, España.

^bFacultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España.

Recibido el 25 de octubre de 2010; aceptado el 28 de febrero de 2011

PALABRAS CLAVE

Enfermedad pulmonar obstructiva crónica;
Catabolismo muscular;
Pseudouridina;
Creatinina;
Cromatografía líquida de alta resolución;
Curva ROC;
Punto de corte

Resumen

Introducción: La enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) es la cuarta causa de muerte en el mundo, en la que se aprecia afectación muscular, en estadios iniciales asintomáticos, producto del desequilibrio proteico que ha sido medido en otros procesos mediante la excreción urinaria de pseudouridina.

Objetivos: Investigar, mediante la excreción urinaria de pseudouridina, si el catabolismo muscular en EPOC está elevado, y en qué medida se relaciona con la edad y con el sexo.

Material y métodos: El estudio se basa en un análisis prospectivo y aleatorio de una población control y otra con EPOC. La determinación simultánea de pseudouridina y creatinina en orina se lleva a cabo por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Se realiza un estudio estadístico descriptivo de las variables edad, sexo, excreción de pseudouridina y, mediante curva ROC de la variable pseudouridina excretada, se determina el punto de corte con mayor sensibilidad y especificidad entre ambas poblaciones.

Resultados: No se observan diferencias estadísticamente significativas en la pseudouridina excretada, ni con respecto a la edad ni al sexo, en los grupos estudiados. La excreción de pseudouridina fue significativamente mayor en los pacientes con EPOC, 94,40 (87,64) $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ con respecto al grupo control, 19,90 (6,6) $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ Md (IQR) ($p < 0,001$). En el análisis mediante curva ROC, el punto de corte óptimo con mayor sensibilidad y especificidad para distinguir personas con un catabolismo muscular alterado es el correspondiente a una excreción de pseudouridina de 29,39 $\mu\text{mol}/\text{mmol}$.

Conclusiones: La medida de la pseudouridina excretada en orina, realizada con este método, puede ser utilizada como control del catabolismo muscular. En nuestro estudio, el área bajo la curva para la excreción urinaria de pseudouridina fue de 0,972 y el punto de corte obtenido, fue 29,39 $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ y corresponderá a individuos con un catabolismo incrementado debido a la EPOC.

*Autor para correspondencia.

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

KEYWORDS

Chronic obstructive pulmonary disease;
Muscle catabolism;
Pseudouridine;
Creatinine;
High-performance liquid chromatography;
ROC curve;
Cut point

Analysis of the muscle catabolism in chronic obstructive pulmonary disease**Abstract**

Introduction: Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is the fourth leading cause of death in the world, appreciating muscle involvement, asymptomatic in early stages, which is due to a protein imbalance that has been measured in other processes by the urinary excretion of pseudouridine.

Objectives: To research, using urinary excretion of pseudouridine, if muscle catabolism in COPD is high and until what extent is related to age and gender.

Material and methods: The study is based on an analysis of a prospective randomized control group and one with COPD. Simultaneous determination of pseudouridine and creatinine in urine was performed by high-performance liquid chromatography (HPLC). We performed a descriptive statistical study of the variables age, gender, excretion of pseudouridine, and a ROC curve of the variable pseudouridine excretion, determines the cut point with higher sensitivity and specificity between the two populations.

Results: No statistically significant differences were found in the pseudouridine excreted, with respect to age or gender, in the groups studied. Pseudouridine excretion was significantly higher in patients with COPD, 94.40 (87.64) $\mu\text{mol}/\text{mmol}$, with respect to the control group, 19.90 (6.6) $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ Md (IQR) ($p < 0.001$). In the ROC curves analysis, pseudouridine excretion had area under the curve 0.972 and the optime cut point for pseudouridine excretion in our trial was 29.39 $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ (Sensibility 93.1% and Specificity 100%) and can be used to distinguish people with altered muscle catabolism.

Conclusions: The measure of pseudouridine excreted in urine, performed by this method, can be used as a control of muscle breakdown. In our study, the cut point was 29.39 $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ which means, that people with a pseudouridine excretion 29.39 $\mu\text{mol}/\text{mmol}$, shall be individuals with an increased catabolism due to COPD.

Introducción

La enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) es la cuarta causa de muerte en el mundo¹ y son conocidos sus importantes compromisos sistémicos, entre los que se incluye la debilidad muscular². Esto constituye un problema mayor ya que contribuye a la intolerancia al ejercicio, influye en la calidad de vida y supone un factor predictor de mortalidad³. Esta debilidad afecta con primacía a los músculos esqueléticos periféricos con preferencia por los de las extremidades inferiores. La alteración muscular se aprecia incluso en estadios iniciales asintomáticos con actividad física normal⁴ y es independiente de las variables de función pulmonar y datos antropométricos^{5,6}.

Las pérdidas de fuerza y potencia muscular en la EPOC han sido atribuidas a múltiples factores, mecánicos, inflamatorios, de estrés oxidativo, alteraciones nutricionales, hipoxia e hipercapnia, determinados fármacos y a factores endocrinos⁷ que conducen a una alteración del equilibrio síntesis/catabolismo proteico en el músculo por predominio de este último⁸.

La EPOC afecta a un número de población cada vez mayor, de ahí la importancia de desarrollar estrategias para la detección precoz del deterioro de la función muscular y su prevención y de encontrar un marcador susceptible de aplicación en la clínica diaria.

El *body mass index* (B), *the degree of airflow obstruction* (O), *dyspnea* (D), *exercise capacity* (E) o índice BODE⁹ utilizado como evaluador pronóstico incluye, como elementos de medida que pueden estar en relación con la función muscular, los

metros recorridos en la prueba de la marcha de los seis minutos y la medida del índice de masa corporal (IMC). La prueba de la marcha de los seis minutos puede estar vinculada no solo a la insuficiencia en la eficiencia muscular sino a otros trastornos, como la insuficiencia respiratoria o cardiaca tantas veces presentes en la EPOC. El IMC es un valor fraudulento en cuanto a la realidad de la masa magra ya que es susceptible de ocultar franco déficit de ésta sin apartarse de los rangos de normalidad^{3,4}. Por tanto, estas pruebas constituyen aproximaciones excesivamente burdas y tardías en orden a detectar la afectación temprana de la función muscular en la EPOC.

Para ello se propone la utilización de la medida de 5-ribosil uracilo o pseudouridina, un metabolito urinario estable del RNA, que ha sido utilizado como un índice de la destrucción de proteínas musculares¹⁰.

La pseudouridina es un producto final del catabolismo de tRNA, no se ve afectada por la dieta, no se reutiliza ni se degrada posteriormente, por lo que es idóneo para ser utilizado como marcador en procesos que pueden afectar al catabolismo muscular, y su medida está contrastada por su utilización en otras enfermedades que cursan con elevada inflamación sistémica¹¹.

Se puede medir la pseudouridina en muestras de orina, recogidas al azar, siempre que la pseudouridina se estandarice con la concentración de creatinina ($\mu\text{mol}/\text{mmol}$ de creatinina) para evitar efectos de dilución, y por lo tanto la posibilidad de ser capaces de detectar en una sola muestra de orina el índice pseudouridina/creatinina (Psu/Crea) mediante cromatografía líquida nos puede permitir evaluar el comportamiento del catabolismo muscular en la población

con EPOC de una manera sencilla y económica, con una sola muestra de orina de 5 ml.

Pretendemos analizar la cantidad de pseudouridina excretada en orina, como marcador de la situación del catabolismo muscular en una población con EPOC y analizar la posible influencia en dicho índice de la edad y el sexo.

Material y método

Este trabajo es un análisis prospectivo y aleatorio de un estudio de dos poblaciones reclutadas en distintas fuentes. Los sujetos controles fueron personas sanas provenientes de un centro de reconocimiento laboral, seleccionadas de forma aleatoria, que fueron sometidas a un exhaustivo estudio clínico y analítico para descartar comorbilidades. Se exigió la normalidad dentro de los parámetros analíticos referidos más adelante así como en el resultado de los estudios espirométricos, electrocardiográficos y electromiográficos.

La población enferma procede de una consulta ambulatoria de neumología y está compuesta de personas con diagnóstico de EPOC según los criterios establecidos por la *Global Initiative for Chronic Pulmonary Disease*¹². La edad en los dos grupos estaba comprendida entre los 31 y los 88 años. A todos ellos se les practicó estudio clínico y analítico. Se aplicaron los siguientes criterios:

1. Criterios de inclusión: para el grupo control, no padecer enfermedad.
2. Criterios de exclusión para el grupo control, ser fumador o exfumador, padecer alguna enfermedad orgánica, psicológica, dental, tomar fármacos o presentar cualquier alteración analítica fuera de los rangos admitidos como normales.

Se consideraron valores normales:

- presión arterial inferior a 140/90 mmHg en condiciones basales.
- El IMC debía estar comprendido entre 20 y 25 kg/m².
- Valores hemáticos y bioquímicos comprendidos entre los siguientes rangos: leucocitos: (4-10,8)10³/μl, hemáties: (3,6-5,4)10⁶/μl, hemoglobina: 11,5-16 g/dl, volumen corpuscular medio: 80-99 fl, glucosa: 76-110 mg/dl, ácido úrico: 2,3-8 mg/dl, urea: 17-60 mg/dl, creatinina: 0,5-1,4 mg/dl, triglicéridos: 50-180 mg/dl, colesterol: 110-220) mg/dl, HDL: 35-60 mg/dl, AST: 5-45, U/l, ALT: 5-43 U/l, GGT: 6-69 U/l.

1. Los criterios de inclusión para el grupo de pacientes diagnosticados de EPOC fueron: estar en situación estable, por lo menos los seis meses anteriores, en cualquiera de los estadios de la clasificación GOLD¹²; no estar sometidos a tratamiento permanente con corticoides orales ni padecer ninguna otra enfermedad activa miopática o de carácter caqueptizante.
2. Ninguno de estos pacientes padecía insuficiencia renal o miopatía ni estaba sometido a pautas orales de corticoides de forma habitual.

La espirometría se efectuó según normativa de la Sociedad Española de Aparato Respiratorio y Cirugía Torácica (SEPAR) y los estadios de la EPOC se establecieron según crite-

rios GOLD¹². El volumen espiratorio forzado en el primer segundo (FEV1) post-broncodilatación, capacidad vital forzada (FVC), FEV1/FVC se determinó utilizando un espirómetro MasterLab 9.20 (Jaegger, Würzburg, Alemania).

Se descartó miopatía (lesión muscular primaria) mediante un estudio neurofisiológico, en el que se efectuó electromiografía con electrodo coaxial de aguja en músculo cuadriceps, se cuantificaron al menos 20 potenciales de unidad motora (PUM), se determinó la duración de cada uno de dichos potenciales, así como la media de todos ellos y el porcentaje de PUM polifásicos. También se valoró la existencia de reclutamiento facilitado así como el trazado de máximo esfuerzo. Este estudio se realizó mediante un equipo de electromiografía modelo Synergy de Oxford S.A.

Se consideró como criterio diagnóstico de miopatía la existencia de una disminución de al menos un 20% de la duración media de 20 PUM aislados. También se consideró la presencia mayor de un 25% de polifasia entre los 20 PUM, la existencia de reclutamiento facilitado y de la amplitud media disminuida del registro de máximo esfuerzo. Los parámetros de normalidad que se han considerado fueron los de nuestro laboratorio.

En ninguno de los pacientes se evidenciaron indicios neurofisiológicos compatibles con miopatía.

La determinación simultánea de pseudouridina y creatinina en orina se realiza por un método de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)¹³. El sistema cromatográfico es un modelo integrado de Beckman Coulter formado por una bomba modelo 126, autoinyector 508, detector espectrofotométrico 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), como fase móvil se utilizó tampón fosfato (pH 6,1) 0,01 M, y ácido octanosulfónico 2,5 mM, como agente de par iónico. Detección UV a 250 nm. La velocidad de flujo es de 1 ml/min, se trabaja a temperatura ambiente.

Las muestras de orina fueron recogidas al azar, se almacenaron a -20 °C, para su análisis, se centrifugaron a 10.900 g durante 40 minutos, se filtraron a través de una membrana de 0,45 μm; 25 μl son diluidos al 10% y se inyectan 20 μl en el sistema cromatográfico. Las muestras fueron procesadas en un tiempo no superior a un mes desde su recogida.

La validación del método se realizó mediante análisis de series con concentraciones conocidas de pseudouridina y creatinina, el cálculo de especificidad, linealidad, exactitud y precisión se realizaron según los requerimientos de la *International Conference of Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceutical for human use* (ICH)¹⁴. Mostraron 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 un límite de cuantificación (LOQ) inferior a 0,0035 para pseudouridina y a 0,1718 para creatinina.

Todos los sujetos permanecieron en una actividad ordinaria el día anterior y la muestra se obtuvo después de un período de reposo.

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 enfermedad que se investiga. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital Central de la Defensa Gómez Ulla. Todos los participantes fueron informados en presencia de un testigo y dado que la información recogida tiene carácter confidencial, fue transmitida y almacenada según lo dictado en la Ley orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos.

Las variables cualitativas se presentan como frecuencias absolutas y relativas en porcentaje, media (desviación estándar) o mediana (rango intercuartílico) dependiendo de que la distribución fuera normal o no, respectivamente. Para explorar diferencias entre el grupo control y pacientes de EPOC, se realizó una prueba de Mann Whitney. Para analizar el índice Psu/Crea en los distintos grupos de edad se realizó una prueba de Kruskal Wallis. Las correlaciones se estimaron usando los coeficientes lineales bivariados de correlación de Pearson o de Spearman dependiendo de la distribución normal o no de las variables, respectivamente. Un valor de $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo para todos los análisis. El poder discriminatorio de las variables para el índice Psu/Crea, en relación a un catabolismo normal frente a otro alterado, se verificó mediante una curva ROC. Se calcularon igualmente la sensibilidad y especificidad para diversos puntos de corte. El análisis estadístico se realizó mediante el programa SPSS® para Windows (Chicago, Illinois).

Resultados

Ambos grupos son homogéneos en edad, sexo, talla y peso. En cuanto al tratamiento seguido por los pacientes con EPOC, el 71,8% de los pacientes del grupo EPOC estaba siendo tratado con anticolinérgicos inhalados y el 56,9% con corticoides inhalados. Al 15,5% se le administraron corticoides

Tabla 1 Estadística descriptiva. Datos

	Control n = 23	EPOC n = 97
Peso (kg): media (SD)	76,32 (13,92)	75,42 (16,31)
Talla (cm): media (SD)	164,36 (8,59)	167,52 (9,31)
% Hombres	52,20%	71,70%
% Mujeres	47,80%	28,30%
Edad: media (SD)	65,75 (14,50)	65,87 (9,22)
Índice Psu/Crea ($\mu\text{mol}/\text{mmol}$) Md (IQR)	19,90 (6,60)	94,40 (87,64)

EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica; Md (IQR): mediana (rango intercuartílico); SD: desviación estándar.

orales en cortos intervalos durante las exacerbaciones. El 42,42% recibía β_2 agonistas de acción prolongada.

No se observa una correlación estadísticamente significativa entre la edad y la pseudouridina excretada ni en los controles con una media de edad de 65,75 (14,50) ni en el grupo de EPOC, 65,87 (9,22); $p > 0,05$ (tabla 1).

Se observan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,001$) en la excreción de pseudouridina, entre el grupo control y el grupo con EPOC: Md(IQR): controles 19,9 (6,6) $\mu\text{mol}/\text{mmol}$; EPOC: 94,4 (87,64) $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ (fig. 1).

No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la excreción de pseudouridina con respecto al sexo, ni en el grupo control ni en el grupo con EPOC (tabla 2).

Si analizamos el comportamiento de la pseudouridina en tres grupos de edades: menores de 60 años, entre 60 y 69 años, y mayores de 69 años, observamos que, en el grupo control, la cuantía de la excreción de pseudouridina no varía en función de la edad, como tampoco lo hace en el grupo EPOC (tabla 2).

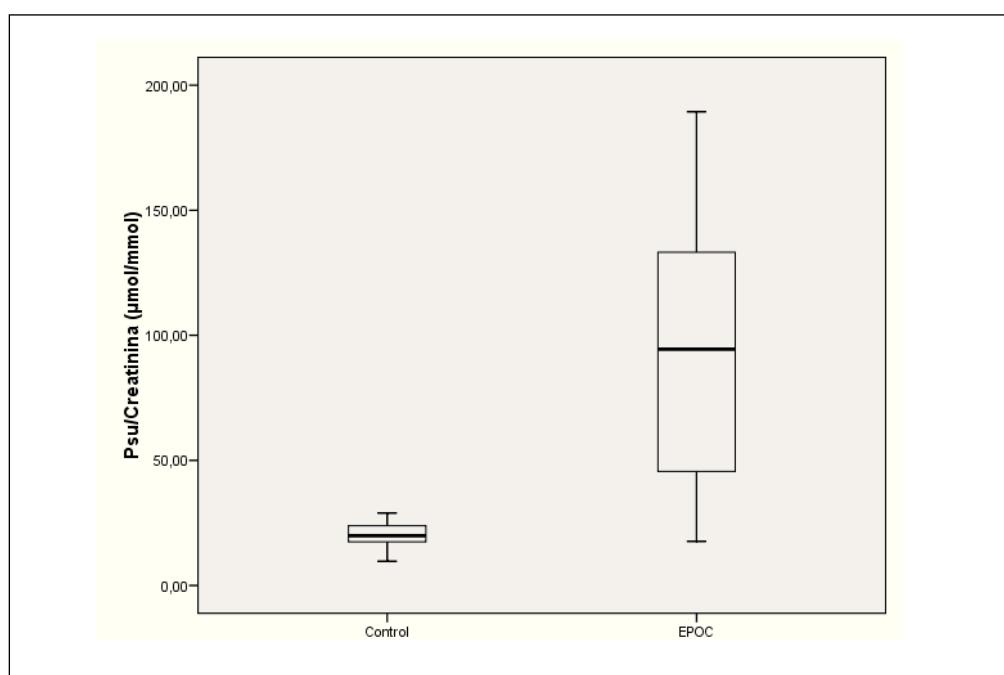


Tabla 2 Índice pseudouridina/creatinina según sexo y grupos etarios

	Frecuencias	Sanos		Enfermos		Total	
		Psu/CREA Md(IQR)	p	PSU/CREA Md(IQR)	p	PSU/CREA Md(IQR)	p
Edad ^a							
< 60 años	6(30%)	41,1(12,7)	0,866*	23(23,7%)	69,5(61,8)	0,331*	45,5(60,7)
60 a 69 años	4(20%)	34,3(30)		30(30,9%)	86,3(87,4)		62(72,8)
> 69 años	10(50%)	28,8(26,3)		44(45,4%)	95(84,5)		81,6(103)
Sexo							
Varones	12(52,2%)	41(25)	0,176**	71(71,7%)	92,2(88)	0,410**	
Mujeres	11(47,8%)	30(24,6)		28(28,3%)	101(97,2)		

^aSe desconoce la edad de tres personas del grupo control.

*Prueba de Kruskal Wallis; **Prueba de Mann Whitney.

Md (IQR): mediana (rango intercuantílico); Psu/Crea: índice pseudouridina/creatinina.

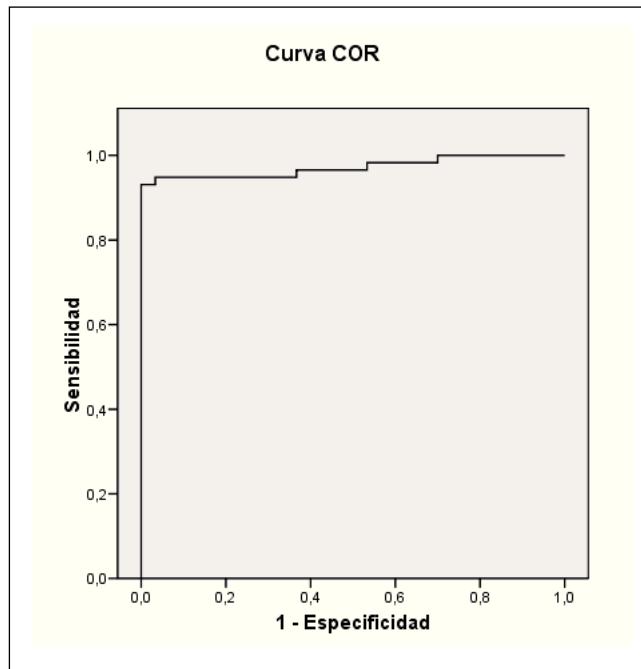


Figura 2 Curva operativa del receptor (COR) para el índice pseudouridina/creatinina.

Al realizar la curva ROC para el índice Psu/Crea ($\mu\text{mol}/\text{mmol}$) se obtuvo un punto de corte, que combina la mejor sensibilidad y especificidad, de 29,39 $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ (sensibilidad 93,1% y especificidad 100%) siendo el área bajo la curva 0,972 (IC 95%: 0,939-1,00) (fig. 2).

Discusión

Nos encontramos con un método analítico susceptible de darnos orientación sobre la situación del catabolismo proteico muscular, de fácil aplicabilidad clínica.

Está demostrado por algunos autores¹⁵ que la pseudouridina de orina de 8 h se correlaciona con la de 24 h. De cualquier modo es más sencillo recoger muestras al azar, en cuyo caso

es obligada su estandarización por la concentración de creatinina para corregir el efecto del posible factor de dilución (μmol de pseudouridina/ mmol de creatinina) y del ritmo circadiano, tal como refieren Seidel et al¹⁶. La primera conclusión que se desprende del estudio es su aplicabilidad en la práctica clínica para orientar sobre la situación del catabolismo muscular en un determinado momento.

Los valores medios de pseudouridina publicados muestran unas cifras medias de 20-27 $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ ¹⁷. Nuestros valores en la población control han sido de 19,9 (6,6) $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ inferiores a los descritos por Bolton et al¹⁷ y superiores a los referidos en otras publicaciones^{15,18}. Estas diferencias pueden obedecer a factores de raza y selección de la población estudiada. En nuestro caso, la población control fue exhaustivamente examinada por motivos laborales lo que permitió descartar cualquier factor contaminante.

En la población con EPOC en nuestro estudio, la excreción de pseudouridina se muestra claramente aumentada con respecto a la población control, lo que coincide con otros autores como Bolton et al¹⁷. El aumento de su valor en la EPOC se justifica en cuanto la EPOC viene definida como un proceso inflamatorio, en el que además se incluyen fenómenos de estrés, sedentarismo, fármacos, todos ellos capaces de producir afectación muscular, influyendo en el desequilibrio anabolismo/catabolismo con predominio de este último¹⁸⁻²⁰, sin que el tabaquismo influya en ello, pues ya en un anterior estudio demostramos la ausencia de relación entre tabaquismo y la cuantificación de pseudouridina en orina²¹.

La gran dispersión de valores en la población con EPOC en nuestro estudio se debe, a nuestro juicio, a que en ellas se incluyen pacientes en diferentes estadios evolutivos de la enfermedad así como a diferentes fenotipos de la misma.

Los caminos bioquímicos que conducen al desarrollo de la disfunción muscular no están completamente identificados y comprendidos pues existe una controversia en los resultados sobre el desequilibrio entre la actividad catabólica y de síntesis de las proteínas y enzimas musculares. Mientras algunos destacan que la causa es un defecto en la síntesis de proteína²²⁻²⁴ otros afirman que la causa es el predominio del catabolismo²⁵. La elevación de pseudouridina cuantifica el incremento del catabolismo en el caso de la población con EPOC.

El hallazgo de un punto de corte en la curva ROC para pseudouridina de 29,39 $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ (sensibilidad: 93,1%; especifici-

dad: 100%), tiene suficiente capacidad como para poder recomendar el uso de este índice en la práctica clínica para analizar la situación del catabolismo muscular en la población con EPOC y, en general, en otros procesos que cursen con un aumento de catabolismo, como han descrito otros autores^{15,17,19,20}.

Hemos comprobado la evolución de la excreción urinaria de pseudouridina con la edad. Es conocido que la edad influye en la masa muscular^{26,27}. La pérdida de masa muscular en relación con la edad es casi el doble en los hombres que en las mujeres y su pérdida natural puede verse incrementada por una inadecuada nutrición, inactividad, cambios hormonales, fármacos, estrés y procesos inflamatorios, entre otros.

El mantenimiento de la excreción urinaria de pseudouridina, con independencia de la edad en el grupo control, contrasta con el hecho de que en los más ancianos hay una importante disminución de la masa muscular y de su síntesis proteica^{27,28}. Es decir, a pesar de que en el curso de los años disminuye la masa muscular y la síntesis proteica, se mantiene sin variación el índice catabólico. En la «cuenta muscular» baja el «haber» y se mantiene el «debe».

En conclusión, la medida de la excreción urinaria de pseudouridina es útil para cuantificar el comportamiento del catabolismo muscular, y puede ser utilizada como control del mismo en la EPOC, haciendo posible su detección temprana. En nuestro estudio, el punto de corte obtenido para una sensibilidad 93,1% y una especificidad del 100%, siendo el área bajo la curva de 0,972 (IC95%: 0,939-100) es 29,39 μ mol/mmol y corresponderá a individuos que presenten un incremento del catabolismo en la EPOC.

Por otra parte, en la población estudiada, el grado de afectación del catabolismo muscular en la EPOC es independiente de la edad y del sexo.

Bibliografía

1. World Health Organization. World Health Report. Geneva: WHO; 2000.
2. Gea J, Barreiro E. Actualización en los mecanismos de disfunción muscular en la EPOC. *Arch Bronconeumol*. 2008;44(6):328-37.
3. 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.
4. 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 cuadriceps y el test de la marcha de 6 minutos en pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica. *Rev Patol Resp*. 2009;12:159-64.
5. 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.
6. Maltais F, Leblanc P, Jobin J, Casaburi R. Peripheral muscle dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease. *Clinics in Chest Medicine*. 2000;21:665-77.
7. Laghi F, Andiguzel N, Tobin MJ. Endocrinological derangements in COPD. *Eur Respir J*. 2009;34: 975-96.
8. Engelen MJ, Deutz NE, Mostert R, Wouters EF, Schols AM. Response of whole-body protein and urea turnover to exercise differs between patients with chronic obstructive pulmonary disease with and without emphysema. *Am J Clin Nutr*. 2003;77:868-74.
9. Celli B, Cote CG, Marin JM, Montes de Oca M, Casanova C, Méndez R. The COPD staging system combining 6mwd, fev1, dyspnea and BMI is a better predical of mortality than FEV1. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;163:A504.
10. Boreck EC, Kerr SJ. Atypical transfer RNAs and their origin in neoplastic cells. *Adv Cancer Res*. 1972;15:163-90.
11. Ionescu AA, Nixon SL, Luzio S, Lewis Jenkins V, Evans WD, Stone HD et al. Pulmonary function, body composition and protein catabolism in adults with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000; 165:495-500.
12. 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. Disponible en: URL <http://www.goldcopd.com>.
13. Cabanes Mariscal MA, Montenegro Álvarez de Tejera P, Chamorro Merino G, Sánchez López P, Álvarez Herranz P, Prats Oliván 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 (Espec Congr):3-251.
14. ICH. International Conference of Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceutical for human use. Validation of analytical procedures: methodology. 6 Noviembre 1996.
15. Sjolin KE. Correlations of pseudouridine in 8-hour and 24-hour urinary samples determined by high-performance liquid chromatography. *Urol Res*. 1982;10:245-8.
16. 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.
17. Bolton CE, Broeckhuizen R, Ionescu AA, Nixon LS, Wouters EF, Shale DJ, et al. Cellular protein breakdown and systemic inflammation are unaffected by pulmonary rehabilitation in COPD. *Thorax*. 2007;62:109-14.
18. Debigare R, Marquis K, Cuote CH, Tremblay R, Michaud A, Le Blanc P, et al. Catabolic/anabolic balance and muscle wasting in patients with COPD. *Chest*. 2003;124:83-9.
19. Salvatore F, Russo T, Colonna A, Cinnio L, Masaka G, Cimino F. Pseudouridine determination in blood serum as tumour marker. *Cancer Detect Prev*. 1983;6:831-6.
20. Intriere M, Calzogno G, Oriani G, Pane F, Zarrilli F, Cataldo PT, et al. Pseudouridine and 1-Ribosylpiridin-4-One-3-Carboxamide (PCNR) serum concentrations in human immunodeficiency virus type 1-infected patients are independent predictors for AIDS progression. *J Infect Dis*. 1996;174:199-203.
21. Montenegro Álvarez de Tejera MP, Cabanes Mariscal MA, Sánchez López P, Gómez de Terreros Caro FJ, Caro de Miguel C, Medina Font J. Influencia del tabaco en el índice pseudouridina/creatinina. Estudio piloto. *Rev Patol Respir*. 2009;12(Supl1): 119.
22. Man W, Kemp P, Moxham J, Polkey M. Skeletal muscle dysfunction in COPD: clinical and laboratory observations. *Clin Sci*. 2009;117:261-4.
23. Doucet M, Russell AP, Leger B, Debigaré R, Joannis DR, Caron M, et al. Muscle atrophy and hypertrophy signalling in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Resp Crit Care Med*. 2007;176:261-9.
24. Cepelack I, Dodig S, Romic D, Ruljancic N, Popovic-Grle S, Malic A. Enzyme catalytic activities in chronic obstructive pulmonary disease. *Arch Med Res*. 2006;37:624-9.
25. Engelen MJ, Deutz NE, Wouters EF, Schools AM. Enhanced levels of whole-body protein turnover in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000; 162:1488-92.
26. Tolep K, Kelsen S. Effect of aging on respiratory skeletal muscles. *Clinic Chest Med*. 1993;14:363-78.
27. Gallagher D, Visser M, Meersman RE, Sepúlveda D, Baumgartner RN, Pierson RN, et al. Appendicular skeletal muscle mass: effects of age, gender and ethnicity. *J Appl Physiol*. 1997;83:229-39.
28. Dorrens J, Rennie J. Effects of ageing and human whole body and muscle protein turnover. *Scand J Med Sci*. 2003;13:26-33.