

DEPARTAMENT DE FARMACOLOGIA

TABACO, ESTRÉS OXIDATIVO E INFLAMACIÓN EN VÍAS  
AÉREAS. PAPEL DEL AMP $\alpha$

DAVID IVARS I SANTACREU

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA  
Servei de Publicacions  
2011

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 21 de desembre de 2010 davant un tribunal format per:

- Dr. Francisco Pérez Vizcaíno
- Dr. Ángel Luis Cogolludo Torralba
- Dr. Ricardo Guijarro Jorge
- Dra. Virginia Motilva Sánchez
- Dr. Ezequiel Martí Bonmatí

Va ser dirigida per:  
Dr. Julio Cortijo Gimeno  
Dr. Manuel Mata Roig

©Copyright: Servei de Publicacions  
David Ivars i Santacreu

---

Dipòsit legal: V-4125-2011  
I.S.B.N.: 978-84-370-8076-5

Edita: Universitat de València  
Servei de Publicacions  
C/ Arts Gràfiques, 13 baix  
46010 València  
Spain  
Telèfon:(0034)963864115

# VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

**Departamento de Farmacología**



## **Tabaco, estrés oxidativo e inflamación en vías aéreas. Papel del AMPc**

**TESIS DOCTORAL**

**Presentada por:**

David Ivars i Santacreu

**Dirigida por:**

Dr. D. Julio Cortijo Gimeno

Dr. D. Manuel Mata Roig

**Valencia, 2010**





D. Julio Cortijo Gimeno, Catedrático Numerario de Universidad adscrito al Departamento de Farmacología de la Universidad de Valencia.

D. Manuel Mata Roig, Profesor asociado al Departamento de Patología de la Universidad de Valencia.

CERTIFICAN:

Que D. David Ivars i Santacreu, Licenciado en Bioquímica por la Universidad de Valencia, ha realizado bajo nuestra dirección la presente Tesis titulada:

**Tabaco, estrés oxidativo e inflamación en vías aéreas.  
Papel del AMPc**

para la obtención del título de Doctor.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmamos la presente certificación.

Valencia, Octubre de 2010.

Fdo. Dr. D. Julio Cortijo Gimeno      Fdo. Dr. D. Manuel Mata Roig



<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>9</b>
1. Vías aéreas humanas.....	11
2. Mucinas y MUC5AC .....	13
2.1. Mucinas .....	13
2.1.1. Glucoproteínas mucosas .....	16
2.1.2. Clasificación.....	17
2.1.3. Estructura proteica de las mucinas: Repeticiones en tándem.....	20
2.1.4. Glucosilación de mucinas .....	22
2.1.5. Expresión tisular y celular de mucinas .....	24
2.1.6. Mucinas en secreciones de las vías aéreas .....	25
2.2. Hiperproducción mucosa en enfermedades respiratorias crónicas.....	26
2.2.1. Hiperproducción de mucinas en EPOC.....	28
2.3. MUC5AC .....	30
2.3.1. Estructura .....	30
2.3.2. Regulación de la expresión de MUC5AC .....	31
3. Sistema NADPH oxidasa. Papel en estrés oxidativo .....	35
3.1. Introducción.....	35
3.2. Clasificación y función .....	37
3.3. Oxidasas duales .....	41
3.3.1. Estructura .....	41
3.3.2. Función.....	42
3.3.3. Regulación de la expresión de las oxidasas duales .....	44
3.4. Enzimas captadoras de radicales superóxido.....	45
4. Patologías que cursan con hipersecreción mucosa .....	46
5. EPOC.....	47
5.1. Descripción y factores de riesgo.....	47

<input type="checkbox"/> Tabaco.....	49
<input type="checkbox"/> Contaminación aérea.....	50
<input type="checkbox"/> Exposición laboral.....	50
<input type="checkbox"/> Deficiencia en $\alpha 1$ antitripsina.....	50
5.2. Farmacología.....	51
5.2.1. Teofilina.....	51
5.2.2. Corticosteroides orales.....	52
5.2.3. Mucolíticos.....	53
5.3. Nuevas aproximaciones terapéuticas.....	54
5.3.1. Broncodilatadores de larga duración.....	55
5.3.2. Anticolinérgicos.....	55
5.3.3. Tratamientos usados para enfermedades que conllevan morbilidad.....	56
5.3.4. Antiproteasas.....	57
5.3.5. Estrategias antiinflamatorias.....	57
<input type="checkbox"/> Uso de antagonistas de mediadores.....	58
<input type="checkbox"/> Inhibición de la fosfodiesterasas 4.....	58
<input type="checkbox"/> Inhibición del NF $\kappa$ B.....	60
<input type="checkbox"/> Inhibición de la MAP cinasa p38.....	60
<input type="checkbox"/> Inhibición del IP3.....	61
<input type="checkbox"/> Activación del RAPP.....	61
5.3.6. Estrategias frente al estrés oxidativo.....	61
<input type="checkbox"/> Fármacos asociados a la teofilina.....	63
<input type="checkbox"/> Antioxidantes.....	63
<input type="checkbox"/> Macrólidos.....	64
5.3.7. Nuevas perspectivas.....	64
<b>II. OBJETIVOS.....</b>	<b>67</b>
<b>III. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>71</b>

1.	Material .....	73
1.1.	Células .....	73
1.2.	Sondas TaqMan .....	73
1.3.	Fármacos, reactivos, kits y soluciones utilizadas .....	75
2.	Métodos .....	81
2.1.	Cultivo de células epiteliales .....	81
2.2.	Diseño experimental .....	83
2.3.	Estudios histológicos .....	86
2.3.1.	Procesamiento de las muestras .....	86
2.3.2.	Tinción con hematoxilina-eosina .....	87
2.4.	Obtención del condensado de humo de tabaco .....	87
2.5.	Estudio de la producción de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	89
2.6.	Determinación de la producción de AMPc .....	90
2.7.	Ensayo de la escisión y liberación de TGF $\alpha$ .....	92
2.8.	Detección de la liberación de citocinas .....	94
2.9.	Análisis de la expresión génica. RT-PCR .....	97
2.9.1.	Extracción de ARN total .....	97
2.9.2.	RT-PCR .....	99
<input type="checkbox"/>	Transcripción inversa (RT) .....	99
<input type="checkbox"/>	RT-PCR a tiempo real .....	101
<input type="checkbox"/>	Electroforesis en gel de agarosa .....	107
2.10.	Cálculos y análisis estadísticos .....	107
<b>IV.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>109</b>
1.	Caracterización del cultivo celular .....	111
2.	Sistema NADPH oxidasa y CSE .....	112
2.1.	Caracterización de las isoenzimas gp91phox .....	112
2.2.	Modificación de la expresión del sistema NADPH oxidasa .....	114

2.3. Modificación de la actividad del sistema NADPH oxidasa.....	115
3. Efecto de la activación del sistema NADPH oxidasa .....	119
3.1. Expresión génica de mucinas .....	119
3.2. Expresión génica y proteica de TNF $\alpha$ .....	121
4. Modulación del AMPc.....	125
4.1. Valoración de los niveles de AMPc.....	125
4.2. Expresión génica de las PDE4 .....	126
4.3. Efectos del piclamilast .....	131
5. Activación del EGFR y producción de mucinas .....	134
5.1. Expresión génica y proteica de TGF $\alpha$ .....	134
5.2. Papel del Tirfostín AG1478 en la síntesis de mucinas .....	138
<b>V. DISCUSIÓN .....</b>	<b>141</b>
<b>VI. CONCLUSIONES.....</b>	<b>153</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>157</b>
<b>VIII. ABREVIATURAS .....</b>	<b>181</b>

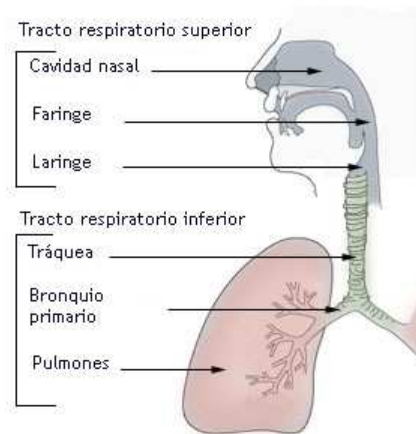
## I. INTRODUCCIÓN





## 1. Vías aéreas humanas

El aparato respiratorio humano, encargado de desplazar volúmenes de aire desde la atmósfera a los pulmones y viceversa, está constituido por las fosas nasales, la faringe, la laringe, la tráquea, los bronquios y los dos pulmones. El pulmón derecho tiene tres lóbulos y el izquierdo dos. Cada lóbulo pulmonar presenta centenares de lóbulos secundarios o lobulillos.



**Figura 1. Estructura del tracto respiratorio humano.**

Como se indica, la tráquea se divide en dos bronquios primarios, y cada uno de ellos sufre más divisiones. Es característica en el bronquio la aparición de placas de cartílago hialino, así como músculo liso y células secretoras de moco. El bronquio está revestido por un epitelio columnar ciliado pseudoestratificado, cuyos cilios tienen una longitud de 5-7  $\mu\text{m}$ , habiendo unos 200 por cada célula ciliada. Los cilios poseen un movimiento sincronizado a razón de

1000-1500 veces por minuto, desplazando moco a razón de 1-2 mm por minuto.

El moco protege muchos de los epitelios que están en contacto con ambientes hostiles. Consiste en un gel viscoso que forma una barrera no sólo para proteger células epiteliales sino también para seleccionar sustancias de unión, interacciones y salida de estas células [1].

Cuando actúa alguno de estos agentes aumenta el número de células caliciformes y secretoras de moco, el cual, se acumula en las vías respiratorias, impidiendo el paso de aire y favoreciendo infecciones, como la bronquitis. Las células secretoras de moco en las vías aéreas centrales incluyen células caliciformes, que están embebidas en el epitelio, y glándulas submucosas, en conexión con el lumen del árbol respiratorio. [2]

A medida que va descendiendo el árbol bronquial, el epitelio cambia y llega a ser simple. Es un epitelio bastante frágil y se lesiona con facilidad (humo de tabaco, contaminación, etc.).

En ocasiones, la estructura y/o función del epitelio respiratorio se altera en desórdenes pulmonares, como asma, carcinoma broncogénico y Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC) [3]. También se puede transformar en otro más resistente como el de la piel (epitelio escamoso), llamándose metaplasia a este fenómeno de transformación, que favorece el asentamiento de carcinomas sobre este nuevo epitelio.

## **2. Mucinas y MUC5AC**

### **2.1. Mucinas**

La parte apical de las superficies epiteliales de los tractos respiratorio, gastrointestinal y reproductivo de mamíferos está recubierta de moco, una mezcla de agua, iones, glucoproteínas, proteínas y lípidos. Los componentes mucosos están secretados apicalmente por células caliciformes en epitelios polarizados y por células secretoras en las glándulas submucosas (SMG). El moco confiere una barrera protectora frente a patógenos y toxinas, y contribuye a la inmunidad innata en las mucosas [4]. Así pues, estas moléculas asumen distintas e importantes funciones fisiológicas como protección de microorganismos patogénicos, desecación, mantenimiento de pH ácidos o básicos, digestión de enzimas proteolíticas o daños mecánicos o químicos. [5].

Las glucoproteínas mucosas, o mucinas, son los principales componentes macromoleculares del epitelio mucoso y están presentes tanto en condiciones fisiológicas como fisiopatológicas. Históricamente, debido a su tamaño, a que están muy glicosiladas y a sus propiedades viscoelásticas, han sido difíciles de aislar y purificar[6]. La tecnología del ADN recombinante aplicada al campo de las mucinas ha conducido al clonaje de los genes de mucinas que codifican la estructura general de las proteínas mucosas. Esto amplía la definición de mucinas tanto a proteínas ancladas a membrana como secretadas.

El desarrollo de herramientas moleculares para identificar mucinas por su estructura principal ha permitido realizar estudios de la expresión y localización de los productos génicos en tejidos, células y secreciones. Actualmente, se están investigando mucinas específicas y sus implicaciones en enfermedades, defensa de mucosas, y reparación o remodelación epitelial. De este modo, se han estudiado las mucinas implicadas en cáncer, enfermedades gastrointestinales, mucinas expresadas en ojos y oídos, así como mucinas implicadas en enfermedades respiratorias [7, 8].

Las mucinas respiratorias son los principales componentes de la capa soluble y/o el gel viscoelástico que comprende la capa mucosa pulmonar en vías aéreas sanas y que contribuye al sistema de defensa mucociliar que protege a los pulmones frente a patógenos y toxinas ambientales[9]. La producción de mucinas engloba muchos procesos biológicos; así pues, incluso la biosíntesis de la mucina madura glicosilada más simple requiere la transcripción de un gen de mucina que codifica un ARNm de dicha mucina, y que, al ser traducido en una proteína de mucina es modificado postraduccionalmente por una o varias glicosiltransferasas. Las mucinas secretoras son almacenadas en gránulos secretorios y liberadas en la superficie apical en respuesta a agentes secretores, mientras, que las mucinas ancladas a membrana están integradas en la membrana celular (Figura 2).

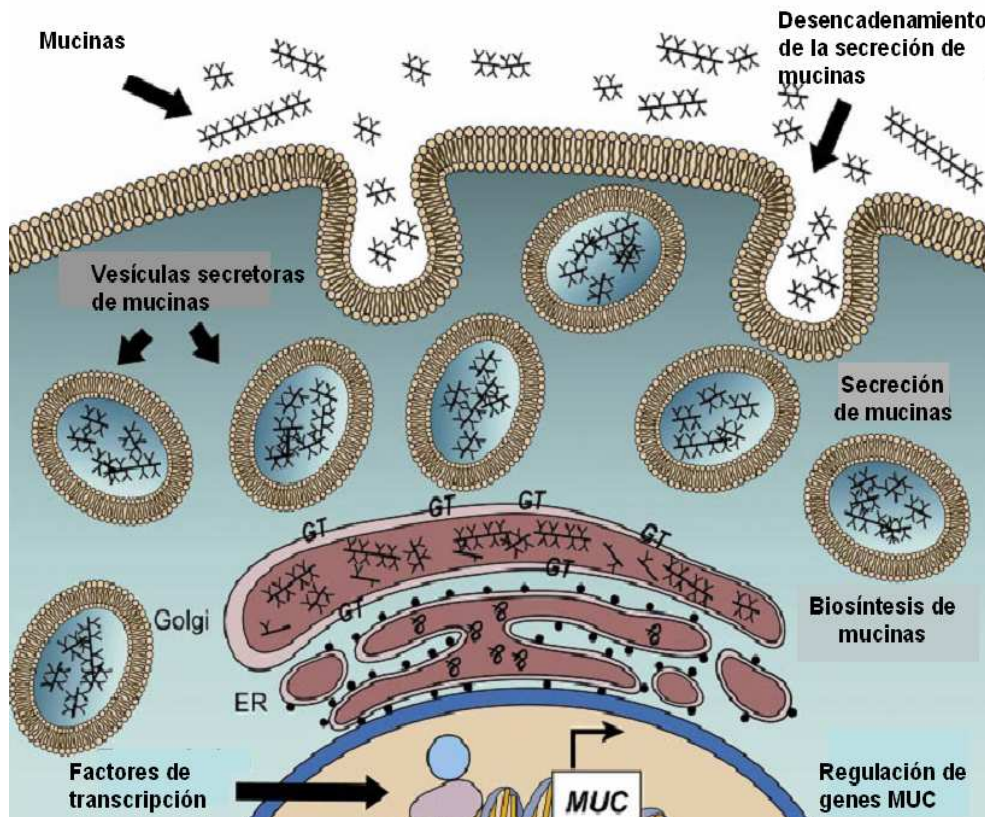


Figura 2. Modelo de biosíntesis y secreción de mucinas en una célula caliciforme o secretora de moco. Tomado con modificaciones de Rose et al 2006 [10].

Tanto las mucinas como el moco se sobreproducen en las vías respiratorias de pacientes con enfermedades crónicas de las vías aéreas, lo cual contribuye de forma importante a la obstrucción de las vías aéreas en pacientes con asma, EPOC o fibrosis quística [11-15]. Estas enfermedades están caracterizadas por una respuesta de mediadores inflamatorios e inmunológicos que se liberan en el tejido respiratorio y en los fluidos y secreciones. Muchos mediadores pueden regular la expresión y estabilidad de los genes de mucinas, así como la secreción de las mismas[16, 17].

La secreción de mucinas *in vivo* típicamente se inicia mediante un agente secretor de forma rápida, ocurriendo dicho proceso entre segundos o minutos [18, 19], en contraste con la regulación génica, que requiere de minutos a horas[20], mientras que la biosíntesis de mucinas requiere entre 6 y 24 horas para su desarrollo.

En ocasiones, el término hipersecreción mucosa se utiliza para englobar todos los procesos que contribuyen a la sobreproducción en enfermedades respiratorias crónicas[10].

### 2.1.1. Glucoproteínas mucosas

Las mucinas son glucoproteínas sintetizadas en células epiteliales y caracterizadas por un alto peso molecular (de 2 a  $20 \times 10^5$  Da), con alto contenido en carbohidratos (50-90% del peso), lo cual refleja un gran número de O-glucanos, y un extenso número de repeticiones en tándem en la estructura proteica, lo cual se refleja en la Figura 3.

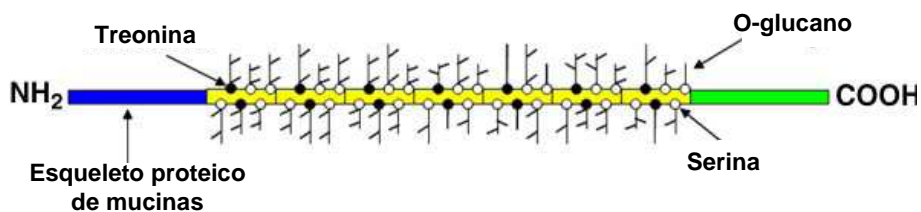


Figura 3. Esquema de una mucina glicoproteica de secreción que representa el esqueleto proteico y sus O-glucanos. Tomado con modificaciones de Rose et al 2006 [10].

Las repeticiones en tándem son la característica distintiva de las mucinas frente a otras glucoproteínas, especialmente de aquellas unidas a membrana o receptores que tienen regiones extracelulares con alta proporción en Ser, Thr y Pro, que pueden pertenecer a la superfamilia de las inmunoglobulinas.

### **2.1.2. Clasificación**

Las mucinas se clasifican atendiendo a su estructura proteica, codificada por un gen MUC. Este tipo de genes se localizan en los cromosomas 1, 3, 4, 7, 11, 12 y 19, como podemos ver en la Tabla 1.

<b>Gen MUC</b>	<b>Locus Cromosómico</b>
MUC1	1q21-q24
MUC9	1p13
MUC13	3q13.3
MUC4	3q29
MUC20	3q29
MUC7	4q13.3
MUC3A	7q22
MUC3B	7q22
MUC11	7q22
MUC12	7q22
MUC17	7q22
MUC2	11p15.5
MUC5AC	11p15.5
MUC5B	11p15.5
MUC6	11p15.5
MUC15	11p14.3
MUC18	11p23.3
MUC19	12q12
MUC8	12q24.3
MUC16	19q13.2

**Tabla 1. Localización cromosómica de los genes de mucinas humanas.**

Los productos génicos de los genes MUC varían en tamaño, oscilando sus transcritos entre 1,1 hasta más de 15 kb, mientras que las proteínas MUC tienen desde 377 hasta más de 11000 aminoácidos en su estructura proteica.



Adicionalmente, la definición de lo que determina un gen de mucinas no siempre es consistente. Quizás las repeticiones en tándem ricas en Ser/Thr/Pro podrían definir una mucina, mientras que un aumento significativo de Ser y Thr y un gran número de O-glucósidos definiría una glucoproteína semejante a mucinas.

Además de las repeticiones en tándem, los motivos modulares adicionales están presentes en los extremos amino y carboxilo terminales de la estructura proteica. Podemos clasificar las mucinas como ancladas a membrana y secretoras, las cuales, se subdividen en ricas o pobres en Cys (Tabla 2)[10].

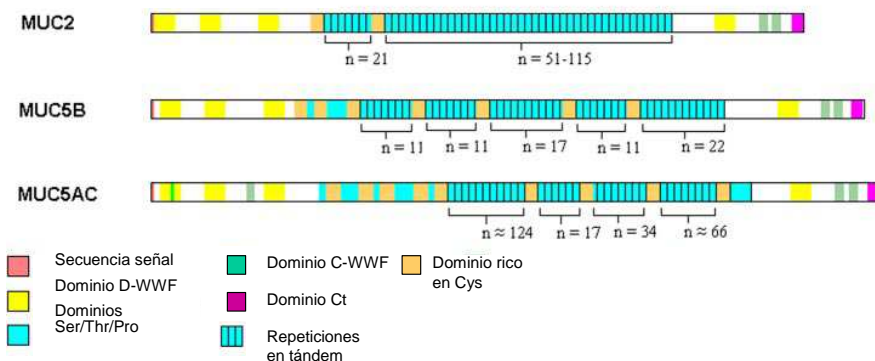
<b>Clasificación</b>	<b>Mucinas</b>
Ancladas a membrana con repeticiones en tándem	MUC1, MUC3A, MUC3B, MUC4, MUC11, MUC12, MUC13, MUC16, MUC17, MUC20
Secretoras, ricas en Cys y con repeticiones en tándem	MUC6, MUC2, MUC5AC, MUC5B, MUC19
Secretoras, pobres en Cys y con repeticiones en tándem	MUC7, MUC8, MUC9
Mucinas sin repeticiones en tándem	MUC14, MUC15, MUC18

**Tabla 2. Clasificación de las mucinas humanas por la estructura proteica.**

### **2.1.3. Estructura proteica de las mucinas: Repeticiones en tándem**

18 de los más de 20 genes codificantes de mucinas codifican repeticiones en tándem. Estas secuencias nucleotídicas están típicamente codificadas por un exón central en un gen MUC. Muchos de estos genes son polimórficos, con alelos con un número variable de repeticiones en tándem (VNTRs). Las variaciones adicionales se suceden con cambios menores en la longitud de la unidad repetitiva (longitud de los polimorfismos) y en la secuencia repetitiva (secuencia de los polimorfismos). Este tipo de variaciones pueden expresar diferentes formas del mismo producto génico de MUC. Además, los genes MUC pueden tener un *splicing* alternativo[21]. Se han visto casos de cambios en VNTRs en cáncer, colitis ulcerosa y enfermedades respiratorias[22].

Las repeticiones en tándem son únicas en secuencia y tamaño, siendo éstas las características distintivas de cada proteína MUC. Entre diferentes mucinas, las repeticiones en tándem varían en longitud (de 5 a 375 aminoácidos) y en número (de 5 a 395 repeticiones). Muchas proteínas MUC poseen dos dominios con diferentes secuencias repetidas en tándem, como MUC2, MUC3A, MUC3B, y MUC5AC. Las mucinas predominantes en vías aéreas, MUC5AC y MUC5B tienen dominios repetidos cuatro o cinco veces en su estructura proteica, respectivamente, y están separadas por dominios ricos en Cys. Cada repetición contiene Pro y es rica en Ser y/o Thr, los sitios de O- glucosilación. Estas repeticiones determinan el grado de glucosilación de la mucina (Figura 4).



**Figura 4. Motivos modulares de las mucinas secretoras ricas en Cys de las vías aéreas humanas. El número de repeticiones en tándem se expresa como n debido de cada MUC. Tomado con modificaciones de Rose et al (2006) [10].**

El número de repeticiones en una proteína MUC también determina el tamaño de la mucina, ya que alarga el esqueleto de la proteína y así aumenta la masa molecular de mucina. También contribuye a la diversidad estructural y funcional de mucinas en rutas que no se aprecian a nivel molecular o fisiológico. Por ejemplo, los dominios de repetición en MUC2 están ininterrumpidos por dominios ricos en Cys, en contraste con MUC5AC y MUC5B. Esto quizá refleja la necesidad de MUC5AC y MUC5B para acoplarse al sistema mucociliar de las vías aéreas, mientras que MUC2 puede que necesite estar más rígido para proteger el epitelio intestinal frente a un ataque proteolítico. De hecho, esta mucina se considera bioquímicamente insoluble[23].

Las repeticiones en tándem son los dominios primarios diana de la O-glucosilación, cuyo proceso puede alterar la conformación de las mucinas. Las mucinas respiratorias poseen estructuras filamentosas [24, 25], que en su agregación forman una

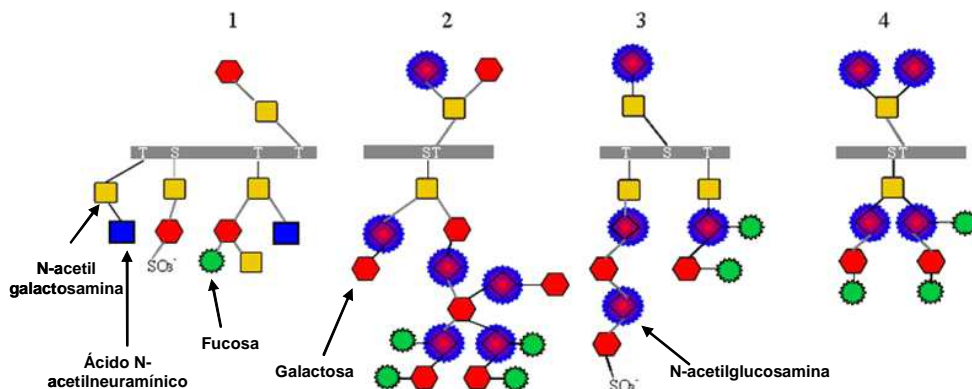
gran red entretejida[24, 25]. Así pues, las repeticiones y sus O-glucanos condicionan el tamaño, la forma y la masa de las mucinas, contribuyendo así a las propiedades biofísicas y biológicas del moco [10].

#### **2.1.4. Glucosilación de mucinas**

Al igual que las mucinas, muchas macromoléculas, incluyendo marcadores de adhesión celular y ligandos de selectinas, tienen O-glucanos unidos a residuos de Ser y Thr en su estructura proteica[9, 26]. Sin embargo, las mucinas en peso poseen entre un 50 y un 90% de carbohidratos, y tienen numerosos sitios de glucosilación (desde 12 hasta más de 100), lo cual se corresponde con el alto número de repeticiones en cada estructura proteica de MUC.

La O-glucosilación comprende una gran parte de la biosíntesis de mucinas y requiere una N- acetilgalactosamil peptidiltransferasa y una o más glucosiltransferasas dependiendo de la estructura del último O- glucano. El proceso se inicia en el Aparato de Golgi cuando la enzima mencionada transfiere una N-acetilgalactosamina a un residuo de Ser o Thr cuando una cadena polipeptídica MUC naciente atraviesa el mismo. Cada O-glucano es entonces elongado en el paso de adición de hexosas (galactosa, N-acetilglucosamina, fucosa) o ácido siálico por glucosiltransferasas específicas[27, 28]. Más de 30 glucosiltransferasas no han sido identificadas, de las cuales al menos una docena participan en la síntesis de O- glucanos de mucinas[10].

Se han identificado cuatro estructuras principales en O-glucanos aislados de mucinas (Figura 5).



**Figura 5. Principales estructuras básicas de los tipos de O-glucanos en mucinas. Tomado con modificaciones de Rose et al (2006) [10].**

El ácido siálico y los sulfatos en galactosa o la N-acetilglucosamina confieren cargas negativas a las mucinas, las cuales son responsables de los pl bajos, mientras que la fucosa confiere hidrofobicidad. Los azúcares terminales, debido a la hidrofobicidad de su carga, contribuyen o determinan las propiedades físicas o biológicas de las mucinas. Así pues, las alteraciones en la glucosilación terminal de las mucinas que ocurren en diferentes patologías, tienen el potencial de alterar las propiedades físicas de las mucinas y las propiedades reológicas del moco.

La glucosilación de mucinas, así como la expresión de los genes MUC, pueden tener restricciones de expresión celular o tisular,

así como tener alteradas las estructuras básicas de los O-glucanos[9].

### 2.1.5. Expresión tisular y celular de mucinas

Los genes de mucinas se expresan en diferentes tejidos[7, 29-37]:

<b>Mucina</b>	<b>Tejido</b>
MUC1	Diversos tejidos epiteliales, como tejidos hematopoyéticos, tracto respiratorio inferior
MUC2	Células caliciformes del epitelio intestinal, tracto respiratorio inferior
MUC4	Tracto respiratorio inferior
MUC5AC	Células caliciformes del tracto respiratorio, ojo y estómago
MUC5B	Células glandulares, tracto respiratorio inferior
MUC7	Tracto respiratorio inferior, células mucosas y serosas de glándulas salivares
MUC8	Tracto respiratorio inferior
MUC11	Tracto respiratorio inferior
MUC13	Tracto respiratorio inferior
MUC15	Tracto respiratorio inferior
MUC19	Células glandulares, tracto respiratorio inferior
MUC 20	Tracto respiratorio inferior

**Tabla 3. Localización tisular de las diferentes mucinas.**

### **2.1.6. Mucinas en secreciones de las vías aéreas**

Las mucinas MUC5AC y MUC5B están presentes en bajos niveles en el moco de vías aéreas sanas, lo cual ocurre en mayor proporción en el esputo de pacientes con asma, bronquitis crónica y fibrosis quística[38]. Por el contrario, en un estudio reciente en el que las mucinas se normalizan en peso, tanto los niveles de las mucinas anteriormente citadas disminuyen en los esputos de pacientes con fibrosis quística comparado con el control [39]. Los niveles de MUC5AC y MUC5B también han sido determinados en las secreciones de células normales de bronquio humano diferenciadas[40].

Por su parte, MUC2 se detecta sólo en baja proporción en muestras de individuos sanos así como en aquellos que tienen algún tipo de patología[38, 41], lo que resulta sorprendente, ya que dicho gen *in vitro* está sobrerregulado por mediadores inflamatorios presentes en las secreciones de pacientes con enfermedades pulmonares crónicas.

También están presentes otras mucinas en las secreciones respiratorias, por ejemplo, MUC7 está expresada en las secreciones de muchos pacientes asmáticos en pediatría, lo cual no se refleja en pacientes pediátricos no asmáticos[42].

## **2.2. Hiperproducción mucosa en enfermedades respiratorias crónicas**

Las mucinas funcionan como una parte del aclaramiento mucociliar normal y contribuyen a la inmunidad innata en el tracto respiratorio. Las toxinas ambientales, alérgenos o patógenos infecciosos producen cambios agudos que conducen a la activación de las respuestas inflamatorias e inmunomoduladoras en los pulmones. Muchos mediadores inician la hipersecreción mucosa mediante la activación de una cascada respiratoria que resulta en la rápida liberación, del orden de minutos, de mucinas desde gránulos secretores de las células caliciformes en la superficie del epitelio y/o las células secretoras de las glándulas submucosas. Esta hipersecreción mucosa contribuye al sistema de defensa innato de las mucosas mediante la protección del epitelio respiratorio en vías que no son todavía bien conocidas a nivel molecular. Las mucinas pueden atrapar partículas en el gel mucoso viscoelástico, y quizá actúen junto a las mucinas ancladas en la superficie apical de las células epiteliales[43], o bien se pueden unir a receptores de células inflamatorias mediante motivos en los dominios específicos de los O-glucanos de las MUC.

La hipersecreción requiere un incremento en la biosíntesis de mucinas para rellenar los gránulos secretores, los cuales necesitan una sobrerregulación de los genes MUC, así como un incremento en la actividad de las glucosiltransferasas o bien una sobrerregulación de sus genes. El estímulo para la sobrerregulación de los genes MUC en una infección aguda estará presumiblemente formado por mediadores de la respuesta inflamatoria o inmune, que



se liberan en respuesta a los patógenos o a las toxinas ambientales, así como los mediadores sobrerregulan dicha expresión *in vitro*. Se ha demostrado la capacidad de los mediadores inflamatorios en incrementar la expresión o la actividad de las glucosiltransferasas y de las sulfotransferasas, enzimas requeridos en la biosíntesis de mucinas, aunque esté poco estudiado. La hipersecreción mucosa y la sobreproducción revierten típicamente a los niveles basales con el paso de los días, presumiblemente como respuesta a los mecanismos antiinflamatorios que anulan los mediadores proinflamatorios y restablecen la homeostasis en el tracto respiratorio (Figura 6)[44].

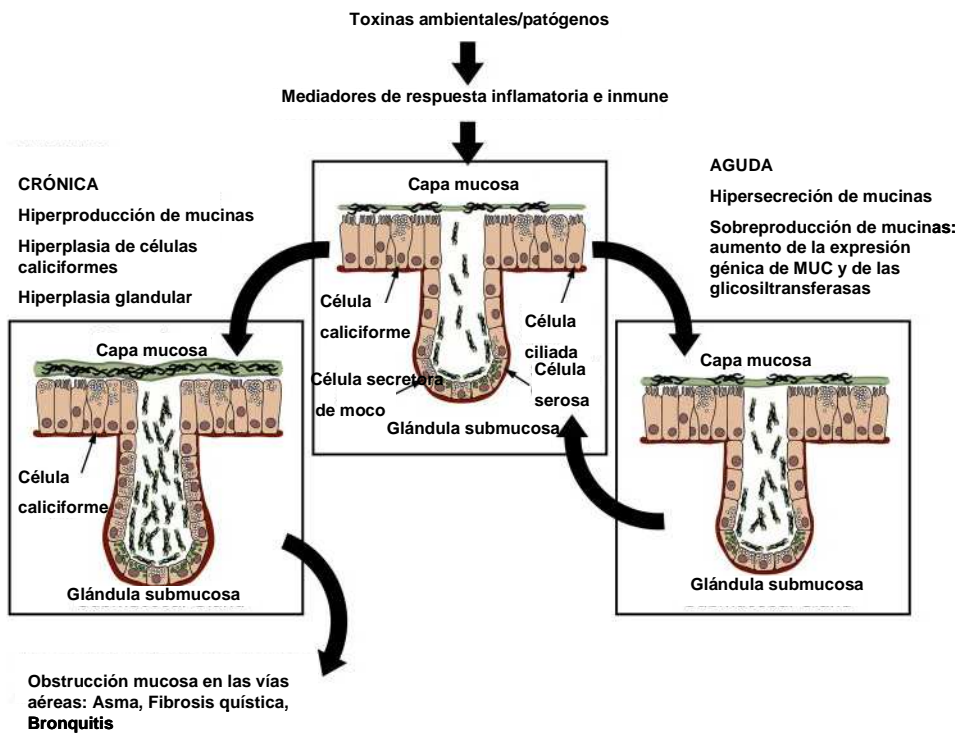


Figura 6. Respuesta de las células respiratorias secretoras frente a cambios agudos o crónicos. Tomada con modificaciones de Rose et al (2006) [10].

### **2.2.1. Hiperproducción de mucinas en EPOC**

El principal hecho característico de la bronquitis crónica es un incremento en las células secretoras debido a la hipertrofia de glándulas submucosas y células caliciformes, que se puede extender a las vías respiratorias periféricas. La hiperplasia de células secretoras es un requisito previo para la hipersecreción de moco y la sobreproducción de mucinas. Estos fenotipos son un componente significativo de la obstrucción respiratoria en bronquitis crónica y se correlacionan directamente con disminución de la función pulmonar[15].

Se ha visto que pacientes con EPOC tienen alteración de la localización celular e incremento de la expresión de mucinas. Además la expresión proteica de MUC5AC es significativamente mayor en el epitelio bronquiolar de pacientes con la patología [45].

Las mucinas de las vías aéreas de pacientes con bronquitis crónica son similares en tamaño y estructura al moco de personas sanas, aunque sean menos ácidas[46]. Sin embargo, los patrones de glucosilación varían durante las exacerbaciones agudas, así como las mucinas características en bronquitis crónica tienen un aumento de las estructuras sulfatadas y sializadas[47].

Las mucinas MUC5AC y MUC5B están altamente expresadas tanto en moco normal como de bronquitis crónica, y los niveles de MUC5AC están aumentados en el esputo de bronquitis crónica comparado con el moco de vías aéreas sanas[38].

Debido a que el humo de tabaco es el factor más común desencadenante de la bronquitis crónica, se han desarrollado muchos modelos *in vivo* para investigar el mecanismo de inflamación de vías aéreas y la metaplasia de células secretoras inducidas por el mismo. Por ejemplo, la acroleína, un compuesto aldehído del cigarrillo, induce la expresión del gen MUC5AC *in vivo* tanto en modelos de rata y ratón, concomitante con la metaplasia de las células secretoras [48, 49]. La contaminación atmosférica también induce metaplasia de células secretoras en modelos animales *in vivo*.

Por su parte, la endotoxina del lipopolisacárido (LPS) bacteriano, un componente de la pared celular de bacterias gramnegativas, aumenta el número de células caliciformes en epitelio nasal, tanto de rata como de ratón [50, 51].

Los mediadores inflamatorios expresados en las vías aéreas de esta patología con respecto al asma son diferentes, así pues, las citocinas TH1 predominan en EPOC, mientras que las TH2 son características del asma. Las infecciones virales, el humo de tabaco y la contaminación producen exacerbaciones en ambos tipos de pacientes, en los que destacamos una inflamación neutrofílica. La secreción mucosa juega un papel muy importante en la inmunidad innata. Así pues, teóricamente, es posible que tanto las citocinas TH1 como TH2 regulen la expresión de genes de mucinas y la metaplasia de células secretoras *in vivo*, y que éstas posean diferentes funciones en células epiteliales e inmunes. Es probable que algunos mediadores interactúen de forma sinérgica con los contaminantes,

agentes infecciosos y mediadores neutrofílicos para intensificar el remodelamiento que culmina en la hiperproducción de mucinas y la hipersecreción en estadios patológicos de las vías aéreas[10, 30].

## **2.3. MUC5AC**

### **2.3.1. Estructura**

Nuestro gen de interés, MUC5AC, debido a su gran tamaño, se describió inicialmente como dos genes. Dos grandes clones parciales (llamados entonces MUC5A y MUC5C) fueron subsecuentemente encontrados como partes del mismo gen [52-55].

MUC5AC, está localizado cromosómicamente en 11p15. Contiene un dominio de transrepresión de 24 pares de bases que codifica el péptido consenso TTSTTSAP.

En cuanto a su producto proteico, existe un dominio rico en Cys que comprende diez residuos de Cys en una secuencia de 130 aminoácidos, repetido varias veces en la proteína. La presencia de estos dominios ricos en Cys sugiere la presencia de puentes disulfuro implicados en la formación de oligómeros de mucina a partir de monómeros [56].

### 2.3.2. Regulación de la expresión de MUC5AC

Como hemos descrito anteriormente, en condiciones patológicas, como enfermedades inflamatorias crónicas de las vías respiratorias, por ejemplo, EPOC y asma, la hipersecreción mucosa es característica, contribuyendo a la morbilidad y mortalidad [7, 57], aumentando en estos casos la expresión de MUC5AC en pacientes asmáticos y con EPOC.

En estudios pioneros se demostró que lisados de bacterias gram negativas, incrementaban la expresión de MUC5AC. Esto es debido a que MUC5AC, al igual que MUC2, tienen diferentes elementos *cis* de NFκB en su promotor. *Pseudomonas aeruginosa* regula positivamente la expresión de MUC5AC siguiente a la activación de la vía MAPK p42/44 a través de una cascada de señalización que implica al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) [58].

*Haemophilus influenzae* también regula positivamente la transcripción de MUC5AC vía activación del NFκB, aunque en este caso se realiza vía proteínas citoplasmáticas termoestables en lugar de realizarse mediante oligosacáridos bacterianos. Además, este microorganismo activa muchas vías a través de proteínas citoplasmáticas que pueden regular positiva o negativamente la MAPK p38. A pesar de que *H. influenzae* fosforila directamente la p38, también activa reguladores negativos de p38, el IP3K y la Akt, una cinasa de Ser/Thr, siendo el resultado neto la regulación positiva de la expresión de MUC5AC[59].

El nucleótido de uracilo trifosfato (UTP) regula positivamente la expresión de los genes MUC5AC y MUC5B en cultivos diferenciados de epitelio normal de bronquio humano, siguiente a la activación de la vía de MAPK mediante un receptor acoplado a proteínas G específico de UTP[30].

De este modo, la expresión de dicho gen en respuesta a diferentes estímulos aparece regulada por la cascada del EGFR [60]. La activación dependiente de ligando del EGFR aumenta la transcripción de MUC5AC[60, 61]. A pesar de que es infrecuente en vías respiratorias de adultos humanos saludables, la expresión de EGFR está regulada positivamente por citocinas proinflamatorias en enfermedades respiratorias crónicas como el asma, sugiriendo que tiene un papel en la patogénesis de la hipersecreción mucosa en estas condiciones, aunque hay otras moléculas implicadas, como el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento transformante (TGF), el factor de necrosis tumoral (TNF), las metaloproteasas de matriz (MMP), así como el estrés oxidativo [57, 62], que realizan dicha regulación vía el factor de transcripción Sp1 consiguiente a la activación de las vías EFGR/Ras/RAF/ERK 1/2. Estudios funcionales han demostrado que la unión de Sp1 a los elementos *cis* de SP1 entre los promotores de los genes MUC2 y MUC5AC contribuyen a la capacidad de los mediadores anteriormente citados para regular la expresión génica de mucinas[10] (Figura 7).

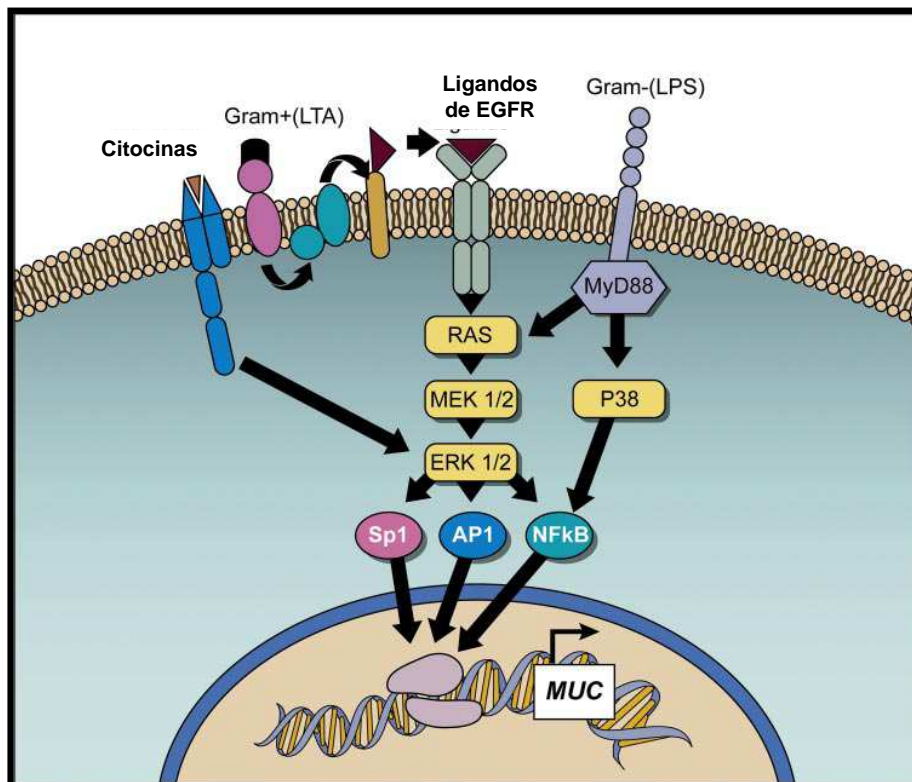


Figura 7. Esquema de las vías de transducción de la señal que regulan la transcripción de los genes de mucinas. Tomado con modificaciones de Rose et al (2006) [10].

La transcripción de MUC5AC está mediada a través de las vías c-Src y MAP cinasa cinasa. MUC5AC está transcripcionalmente activada por eventos mediados por PKC. Además, debido a que los efectos de IL9 están mediados por la vía de señalización JAK-STAT, esta citocina incrementa la expresión de MUC5AC, teniendo en esta vía otra posible alternativa de activación [63].

El AMPc es un segundo mensajero importante que determina algunos aspectos de la función celular a través de la activación de la proteína cinasa A (PKA). Este nucleótido cíclico está inactivado por fosfodiesterasas (PDEs). Se han descrito distintas formas de PDEs, pero la PDE4 aparece como la principal isoenzima implicada en la regulación del AMPc en inflamación de las vías aéreas y células estructurales [64].

Se ha visto que tanto las células sanas de epitelio respiratorio humano como de carcinoma de pulmón (por ej. A549) expresan predominantemente PDE4 con menor actividad de otras PDEs [65]. La actividad epitelial de PDE4 puede ser una diana importante para inhibidores selectivos de PDE en el control de mediadores inflamatorios producidos por estas células. Hay evidencias que indican que el funcionamiento de la vía AMPc/PKA está relacionada con la vía ERK/MAPK. De este modo, agentes que incrementen la concentración intracelular de AMPc (por ejemplo, los inhibidores PDE4), bloquearían la activación de ERK estimulado por factores de crecimiento en ciertos tipos celulares mediante la inhibición de la activación de proteínas Raf [66, 67].



### **3. Sistema NADPH oxidasa. Papel en estrés oxidativo**

#### **3.1. Introducción**

El peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) está presente en exhalados respiratorios y secreciones de las vías aéreas[68-71], donde la lactoperoxidasa (LPO) está presente y activa, siendo una enzima que confiere un mecanismo de resistencia del huésped protegiendo las superficies epiteliales de la colonización e infección. Esta enzima usa el peróxido de hidrógeno para oxidar aniones tiocianato en hipotiocianito, un fuerte agente antimicrobiano. De este modo, la LPO requiere de  $H_2O_2$  para producir esta sustancia antimicrobiana en las secreciones respiratorias.

Los fagocitos tienen un sistema equivalente de defensa del huésped que utiliza  $H_2O_2$  para oxidar cloruro o tiocianato y así formar hipotiocianato. En estas células, la generación de especies reactivas de oxígeno es robusta, ya que niveles altos de las mismas participan en la lisis bacteriana [72]. Esta acción de defensa se realiza a través del sistema de la nicotinamida dinucleótido fosfato reducido (NADPH) oxidasa, un sistema de transporte electrónico formado por varias subunidades anclado a la membrana citoplasmática, donde su subunidad catalítica, gp91phox, reduce el oxígeno molecular en una reacción dependiente del NADPH a superóxido, el cual dismuta en  $H_2O_2$  [73, 74].

Se ha visto que las células no fagocíticas también generan especies reactivas de oxígeno, aunque a menor nivel [75]. En algunos casos, la generación de especies reactivas de oxígeno tiene propiedades reminiscentes de la oxidasa de fagocitos [76]. Se han identificado muchos homólogos de la subunidad gp91phox en fagocitos, y dichos genes forman la familia Nox[77]. En la escala evolutiva de esta familia génica, distinguimos tres subgrupos:

- a) Nox 1, Nox 2 (gp91phox), Nox 3, Nox 4: tienen una masa molecular similar, de alrededor de 65 kDa. La proteína Nox1, también llamada Mox1 o NOH-1 se expresa en células no fagocíticas, incluyendo el epitelio de colon y la musculatura vascular lisa[78], y funciona regulando el crecimiento y transformación celulares. El splicing alternativo de Nox1 genera una porción de un dominio de membrana que produce un canal de protones[79], con propiedades similares a los canales regulados por voltaje[72].
- b) Oxidasas duales, Duox 1 y Duox 2: los homólogos con mayor peso molecular, alrededor de 180 kDa, caracterizados por poseer un dominio peroxidasa N-terminal y dos dominios de unión a  $Ca^{++}$ .
- c) Nox 5: divergente de los otros miembros.

### 3.2. Clasificación y función

Además, se han propuesto diferentes funciones en las que las proteínas Nox participan en procesos biológicos como el control del crecimiento celular, remodelación ósea, control del tono vascular, regulación de la biosíntesis de la hormona tiroidea y secreción ácida. En detalle, podemos ver la distribución tisular y las funciones que desempeñan las diferentes NADPH oxidasas[80]:

a) Nox 1:

- Colon: es la oxidasa con expresión muy abundante en colon.[81, 82].
- Estómago: se expresa en cobaya, aunque no hay evidencias de que se exprese en ninguna otra especie.
- Útero y próstata: esta expresión es destacadamente más baja que en el colon, aunque sea detectable[81, 82].
- Expresión inducible: se induce en algunos tipos celulares, por ejemplo en músculo liso de aorta inducida por PDGF[82].

La función de esta oxidasa tan sólo es una hipótesis. Parece ser que tiene un sistema de defensa del huésped, con lisis bacteriana a través de especies reactivas de oxígeno. Además estimula la división celular a través de la activación de un mecanismo de señalización intracelular

sensible a especies redox. Así pues, la función depende del tipo celular en el que se exprese.

- b) Nox 2: es la subunidad gp91phox de la NADPH oxidasa fagocítica. Las células blancas de la línea mieloide son el sitio predominante de expresión de esta enzima, en particular los neutrófilos, monocitos/macrófagos y eosinófilos.

Sin lugar a duda, es una enzima que confiere defensa al huésped, lo cual se ha demostrado en pacientes con enfermedad granulomatosa crónica. Individuos con enfermedad congénita, deficientes en NOX2 o alguna de sus subunidades padecen infecciones severas. Como las especies reactivas de oxígeno poseen acciones microbicidas, la función de defensa de NOX2 se atribuye generalmente a una lisis directa de microorganismos por especies reactivas de oxígeno, o bien a la interacción de las especies reactivas de oxígeno con el sistema MPO. Hay evidencias de que Nox2 está implicada en una variedad de procesos patológicos, incluyendo el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, neurodegeneración y patogénesis del VIH.

- c) Nox 3: es la isoforma más restrictiva y especializada de tejido. De hecho, se encuentra exclusivamente en el oído

interno, donde, tiene una distribución ubicua. Se ha encontrado en el epitelio sensorial y ganglios, ambos situados en el auditorio del sistema vestibular.

Por lo que respecta a su función, en ratones deficientes en este gen se observan como fenotipos más obvios la pérdida de formación de otoconia y los consiguientes problemas con el equilibrio.

- d) Nox 4: fue llamada originariamente ReNox, debido a su abundante expresión en la corteza renal. Actualmente, parece probable que sea la isoforma más ampliamente expresada de todas ellas. Aunque tiene una distribución predominante en el riñón, también se ha descrito en células endoteliales, células musculares lisas, corazón, páncreas, placenta, músculo esquelético, ovario, testículos, osteoclastos, fibroblastos y astrocitos.

Funcionalmente, parece ser que tenga un papel como sensor de oxígeno en el córtex renal. También podría estar implicada en la regulación de la proliferación celular, aunque no haya suficiente evidencia para esta hipótesis.

- e) Nox 5: se encuentra exclusivamente en tejidos linfoides y testículos. Su ARNm es abundante en linfocitos tisulares pero no en circulantes. Esta isoforma está presente en zonas ricas en células B alrededor de los centros

germinales, aunque también está en zonas ricas en células T. En testículos se ha visto su presencia en espermatozoides en paquiteno. Este enriquecimiento en estadios tempranos de la espermatogénesis no excluye una función en células más maduras, ya que aunque el ARN se sintetiza en estadios tempranos de la espermatogénesis, la proteína se requiere en los estadios posteriores.

La función de esta isoenzima está implicada en la mediación de generación de especies reactivas dependiente de  $Ca^{++}$  en linfocitos tisulares y testículos. Parece ser que tenga mayor función biosintética que de protección.

- f) Oxidasas duales: Duox1 y Duox2. Ambas están expresadas en tiroides, por lo que también se han llamado tiroide oxidasas (Thox). Desde un punto de vista evolutivo, la aparición de este tipo de enzimas precede a la aparición de las glándulas tiroideas. Estas isoformas no están restringidas a este órgano, ya que DUOX1 tiene una expresión predominante en el epitelio respiratorio y DUOX2 en el epitelio glandular de la saliva y del recto[83].

En mamíferos, ambas isoformas están implicadas en la biosíntesis de la hormona tiroidea. Fuera de esta localización, la función no está estudiada en profundidad,

sin embargo, basándonos en la localización respiratoria, de nuestro particular interés, y en el epitelio gastrointestinal, se plantea como un sistema de defensa del huésped[83].

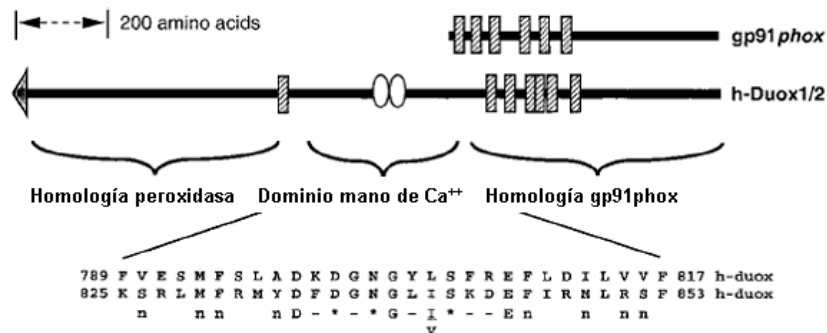
### **3.3. Oxidasas duales**

#### **3.3.1. Estructura**

Estudios previos han demostrado la presencia de Duox en el tracto respiratorio humano, viendo que tanto Duox 1 como Duox 2 son las principales NADPH oxidasas expresadas en el epitelio respiratorio[84].

Centrando el papel de las oxidasas duales, Duox1 y Duox2, a nivel respiratorio, se ha descrito su expresión en las superficies mucosas de la tráquea y el bronquio y en las células epiteliales de las vías aéreas [83-85], donde se ha sugerido que Duox1 es la isoforma responsable de la producción ácida y la secreción en vías aéreas[83] y juega un papel importante en la expresión de mucinas[86].

Edens et al [72], propusieron un modelo estructural para las oxidasas duales, basándose en su estructura primaria y en la analogía con datos conocidos de gp91phox. En la Figura 8 podemos ver la estructura propuesta.



**Figura 8. Estructura propuesta para las oxidasas duales.** Las secuencias señal de péptidos secretorios se indican con un triángulo gris, mientras que las  $\alpha$ -hélices transmembrana predichas se indican con rectángulos. Los óvalos representan las regiones que muestran homología con los sitios de unión de los dominios en mano de calcio. **Tomado con modificaciones de Edens et al (2001) [72].**

### 3.3.2. Función

A partir de las regiones homólogas de las oxidasas duales, se predijo su función. Gp91phox está asociada de forma integral con la membrana plasmática. El extremo carboxilo terminal de esta proteína es homólogo a las proteínas FAD[87-89], y contiene un sitio de unión a NADPH. Esta región probablemente se pliegue en un dominio intracelular de flavoproteína. Gp91phox también contiene un dominio hidrofóbico en el extremo amino terminal, que comprende prácticamente la mitad de la molécula. Se predice de su región correspondiente en Duox que atraviesa la membrana 6 veces, colocando tanto los extremos amino como carboxilo en la cara citosólica.

Los dominios de homología gp91phox en Duox 1 y Duox 2 muestran el mismo perfil de hidropatía y de las hélices



transmembrana que en gp91phox. Edens et al asumieron que el modelo transmembrana de gp91phox también se aplicaría a la región carboxilo terminal de las proteínas Duox. La presencia de una secuencia peptídica como señal de secreción en el extremo amino terminal y la presencia de una secuencia transmembrana hidrofóbica predicha que interviene entre el dominio en mano de  $\text{Ca}^{++}$  y el de homología con peroxidasa predice que el dominio peroxidasa residirá en el exterior, como podemos ver en la Figura 9.

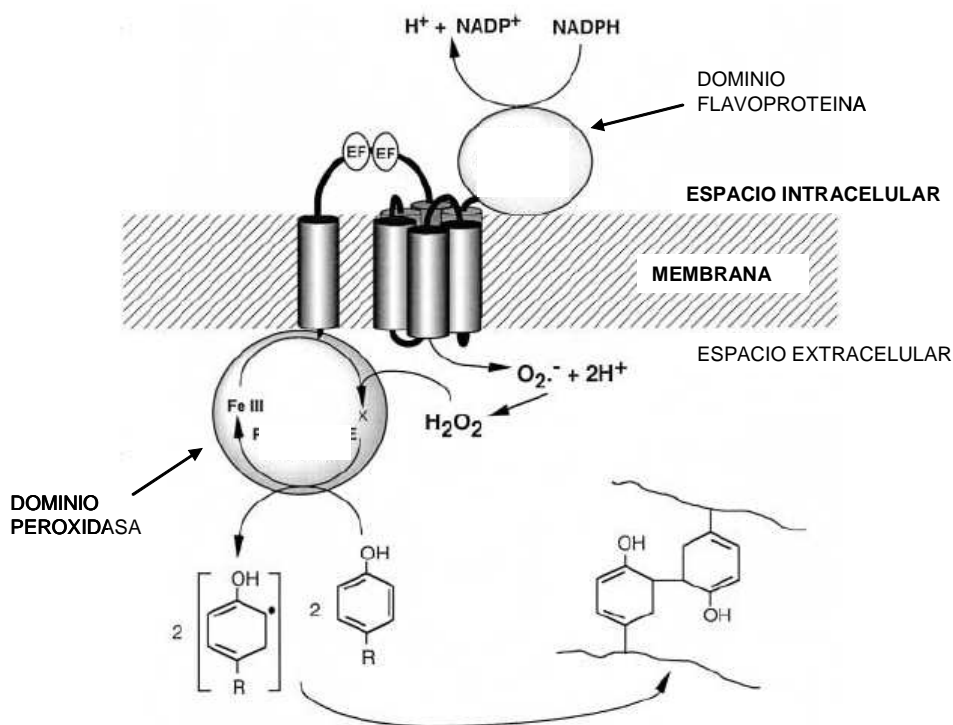


Figura 9. Modelo topológico propuesto para Duox. Tomado con modificaciones de Edens et al (2001) [72].

La NADPH oxidasa fagocítica sirve como modelo para la función del dominio de homología con gp91phox en Duox. Esta

subunidad genera especies reactivas de oxígeno fuera de la célula o en el fagosoma (que es topológicamente extracelular). El NADPH reduce al FAD en el dominio flavoproteína, y entonces el FAD pasa electrones a través de los grupos hemo localizados en el extremo N terminal transmembrana de gp91phox, reduciendo oxígeno para formar superóxido fuera de la célula con la producción de  $H_2O_2$  por dismutación. Tal función ha sido demostrada para Duox 2 (p138<sup>Tox</sup>) [90].

### 3.3.3. Regulación de la expresión de las oxidasas duales

La expresión de DUOX 1 está modestamente inducida por las citocinas específicas de TH2 IL4 e IL13, mientras que la expresión de DUOX2 está destacadamente inducida por el IFN $\gamma$ , citocina específica de TH1. En paralelo, la producción apical de  $H_2O_2$  está incrementada por estas citocinas[91].

El estrés oxidativo juega un papel importante en muchos estadios fisiopatológicos crónicos, como enfermedad inflamatoria de las vías aéreas (EPOC, bronquiectasia y fibrosis quística)[92-95]. Estas enfermedades están caracterizadas por la acumulación de neutrófilos activados, que causan un daño oxidativo al ADN, conduciendo a la destrucción de las células epiteliales de las vías aéreas, cuya última consecuencia es el daño pulmonar[96-98]. A pesar de que el estrés oxidativo tiene efectos citotóxicos, los estudios también han indicado que las especies reactivas de oxígeno median ciertas respuestas biológicas adaptativas[99, 100]. El estrés oxidativo

derivado de la exposición de  $H_2O_2$ , puede inducir apoptosis en células epiteliales de vías aéreas bovinas, pero también modula la expresión de una variedad de genes que están implicados en respuestas inflamatorias e inmunomoduladoras[101]. La regulación de la expresión génica por el estrés oxidativo implica muchas vías de señalización incluyendo la MAPK desencadenada por receptores tirosin cinasas como el receptor del factor de crecimiento derivado de PDGFR, y el EGFR [102, 103]. De este modo, la exposición crónica a altos niveles de especies reactivas de oxígeno puede causar crecimiento celular anómalo y diferenciación[61].

### **3.4. Enzimas captadoras de radicales superóxido**

Las enzimas superóxido dismutasas (SODs) son las únicas enzimas captadoras de radicales superóxido presentes en las células de los mamíferos[104, 105]. Probablemente sean un punto clave en la regulación contra el estrés oxidativo inducido por el humo del cigarrillo. Hay tres SOD, la SOD de Cu/Zn (SOD Cu/Zn), la SOD de Mn (SOD Mn) y la SOD extracelular (SOD EC). La SOD Cu/Zn, también llamada SOD citosólica o SOD1, se cree que funciona como el principal captador de radicales superóxido en el citosol de la célula y el núcleo. Sus niveles son elevados en la mayoría de las células, y estudios con animales transgénicos en este gen han llevado a la conclusión de que la protección ofrecida por la SOD Cu/Zn[106], es suficiente en las condiciones fisiopatológicas, ya que un aumento de la expresión de la misma no produce variaciones en cuanto a captación de radicales superóxido.

Por su parte, la SOD Mn o SOD2 es una enzima mitocondrial conocida porqué juega un papel esencial en la resistencia a oxidantes en varios órganos vitales [10]. La sobreexpresión de SOD Mn protege al epitelio alveolar contra el estrés oxidativo; una deficiencia de SOD Mn es letal, ya que ratones knockout en este gen mueren entre las semanas 1 y 2 posteriores al nacimiento [107].

Finalmente, SOD EC (SOD3) es una proteína secretora tetramérica que contiene dos dímeros de Cu y Zn. En ratones, la pérdida de SOD EC puede ser lo suficientemente equilibrada por otros antioxidantes, y ratones knockout para este gen tienen un desarrollo normal, a menos que los animales estén muy estresados. En estos animales knockout, SOD EC ha demostrado estar fuertemente involucrada en la protección del pulmón en los estados inflamatorios[108].

#### **4. Patologías que cursan con hipersecreción mucosa**

Existen muchas patologías que cursan con hipersecreción mucosa, destacando la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC), asma y fibrosis quística. De todas ellas, EPOC es la enfermedad que conlleva hipersecreción mucosa, debida principalmente, al humo de tabaco, aunque estén descritos diferentes factores que también la originan. Es por ello, que el papel de esta

tesis se ha centrado en los mecanismos que inducen la hipersecreción mucosa en esta patología.

## **5. EPOC**

### **5.1. Descripción y factores de riesgo**

La Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC) está caracterizada por una obstrucción de las vías respiratorias. Esta obstrucción es progresiva, no reversible completamente y no cambia a lo largo de varios meses. Muchos estudios avalan que la causa predominante de la enfermedad es el tabaco (UK National Institute for Clinical Excellence, 2004).

Aunque el asma esté asociado con la obstrucción respiratoria, está considerado como una entidad clínica diferenciada. Debido a la alta prevalencia de asma y EPOC, estas condiciones coexisten en muchos pacientes, imposibilitando un diagnóstico certero. Otras condiciones también asociadas con la obstrucción respiratoria pobremente reversible incluyen fibrosis quística, bronquiectasia y bronquiolitis obliterante, así como hipertensión pulmonar [109]. La hipersecreción mucosa también es una característica distintiva de la EPOC [110].

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, mas de 200 millones de personas en todo el mundo padecen EPOC de moderada a severa. En 2005, unos tres millones de personas

fallecieron a causa de la patología, lo que representa aproximadamente un 5% de todas las causas de mortalidad globales. [111].

Tan sólo en Inglaterra y Gales unas 900.000 personas están diagnosticadas de EPOC, aunque el diagnóstico se considera infravalorado, por lo que el verdadero número de casos diagnosticados estaría alrededor de 1,5 millones. La edad media de diagnóstico de la enfermedad en el Reino Unido es de 67 años, aumentando la prevalencia con la edad, y siendo más común en hombres que en mujeres y asociado con la privación socioeconómica, aunque la prevalencia de la EPOC diagnosticada en mujeres está aumentando (0,8% en 1990 frente a 1,4% en 1997), mientras que en hombres parece que haya alcanzado una meseta desde mediados de los años 90. En los EEUU se han descrito tendencias similares. Estas tendencias de prevalencia probablemente reflejen diferencias sexuales en el hábito de fumar cigarros desde los años 70.

La EPOC es la cuarta causa de muerte tanto en EEUU como en Europa, aunque la Organización Mundial de la Salud predice que en 2030 será la tercera causa de muerte [111]. La morbilidad y los costos económicos asociados a la EPOC son altos, en gran parte no reconocidos, y más del doble que en el caso del asma. El impacto en calidad de vida es particularmente elevado en pacientes con exacerbaciones frecuentes, y a menudo pacientes con EPOC leve tienen una calidad de vida afectada [111].

Destacamos los siguientes factores de riesgo: tabaco, contaminación aérea, exposición laboral y deficiencia en  $\alpha$ 1-antitripsina.

- *Tabaco*

El humo de tabaco es claramente el factor de riesgo más importante en el desarrollo de la EPOC [112]. El hecho de fumar está también asociado con un aumento del riesgo de mortalidad. Cualquier modalidad de fumar tabaco aumenta significativamente el incremento de morbilidad y mortalidad en EPOC, aunque el riesgo sea menor que con los cigarrillos. Alrededor de la mitad de fumadores de cigarrillos desarrollan alguna obstrucción respiratoria, y sobre un 10-20% desarrollan una EPOC clínicamente significativa.

Alrededor de un 20% de casos de EPOC que afectan hombres no están atribuidos al tabaco, indicando que, a pesar de que el tabaco es el factor de riesgo más importante, no es la única causa que desencadena esta patología [110].

Una cuestión más contenciosa es la posible relación entre los factores ambientales del humo del tabaco y el desarrollo de la EPOC. Un ejemplo de esto sería el aumento de la tendencia en la aparición de la enfermedad en fumadores pasivos. Sin embargo, los efectos adversos de la función respiratoria de madres fumadoras en la infancia está clara; fumar durante y después del embarazo está asociado con la función respiratoria en la infancia y en adultos. Más estudios han mostrado que los efectos del tabaco prenatal son

mayores en magnitud, y de forma independiente que los efectos de la exposición postnatal [110].

- *Contaminación aérea*

La contaminación aérea puede afectar el desarrollo de la función pulmonar, y consecuentemente, ser un factor de riesgo en EPOC. Altas concentraciones de contaminación del aire atmosférico, exposición a partículas y dióxido de nitrógeno, así como la contaminación doméstica por fuel (usado para cocinar y calentar) en países en desarrollo son algunos de estos factores de riesgo [110].

- *Exposición laboral*

Una exposición prolongada intensa a polvos y sustancias químicas puede causar EPOC. La exposición a gases nocivos y partículas como isocianatos, cadmio, carbón, otros polvos minerales y humos de soldadura son algunos de estos factores de riesgo [113].

- *Deficiencia en  $\alpha 1$  antitripsina*

El factor de riesgo mejor documentado para EPOC es esta deficiencia, la cual es rara (sólo está presente entre 1-2% de pacientes con EPOC). Es una glucoproteína responsable de muchas de las actividades antiproteasas en el suero. Su gen es altamente polimórfico, pero muchos genotipos están asociados con bajas concentraciones en suero (alrededor de 10-20% de lo normal). Deficiencias severas en  $\alpha 1$  antitripsina están asociadas con un desarrollo prematuro y acelerado de EPOC en fumadores y no fumadores, aunque la tasa del declive en función pulmonar está mucho más acelerada en aquellos que fuman [110].



## **5.2. Farmacología**

Los fármacos más comúnmente utilizados en el tratamiento de la EPOC son: teofilina, corticosteroides orales y mucolíticos.

### **5.2.1. Teofilina**

Es uno de los tratamientos más clásicos utilizados para la EPOC. Este fármaco es un inhibidor de fosfodiesterasa no selectivo, y causa un incremento en la concentración intracelular de adenosina monofosfato cíclica (AMPc) en algunos tipos celulares y órganos, como el pulmón. El aumento de AMPc conduce a una inhibición de células inflamatorias e inmunomoduladoras, provocando la relajación del músculo liso y dilatación de las vías respiratorias, además de producir reducción de la fatiga del músculo diafragmático, incremento en el aclaramiento mucociliar, estimulación del centro respiratorio, inhibición de la inflamación neutrofílica, supresión de genes inflamatorios mediante la activación de histona desacetilasas, inhibición de citocinas y otros mediadores de inflamación celular, potenciación de efectos antiinflamatorios de corticosteroides inhalados, y potenciación de los efectos broncodilatadores de agonistas  $\beta_2$  [114].

Diferentes estudios han mostrado que la teofilina generalmente confiere beneficios modestos en función pulmonar cuando se combina con diferentes clases de broncodilatadores inhalados (anticolinérgicos y agonistas  $\beta_2$ ) [114].

El bajo *onset* de acción de la teofilina combinada con la necesidad de valorar la dosis y lograr valores adecuados en plasma sugieren que muchos beneficios no son observados hasta algunas semanas siguientes [114].

La teofilina posee muchos efectos adversos como: taquicardia, arritmias cardiacas, náuseas y vómitos, dolor abdominal, diarrea, dolor de cabeza, irritabilidad, insomnio e hipocalcemia. Es por ello que estos efectos son el principal factor limitante a la hora de prescribir este tipo de tratamientos.

### **5.2.2. Corticosteroides orales**

Sólo poseen un papel limitante en el manejo de EPOC estable, y pocos datos sugieren si deriva en beneficios a largo término en los pacientes. El tratamiento prolongado con prednisolona puede ser evitado generalmente, a pesar de que hay directrices para reconocer que algunos pacientes gravemente afectados con obstrucción respiratoria avanzada tienen dificultad en suprimir los corticosteroides después de una exacerbación [114].

Los corticosteroides orales producen efectos adversos neuropsicológicos (depresión, euforia, paranoia, insomnio, dependencia psicológica), musculoesqueléticos (osteoporosis, miopatía proximal, ruptura de tendones), endocrinos y metabólicos (hiperglicemia, hipocalcemia, retención de agua y sales, supresión

adrenal, ganancia de peso, desarreglos menstruales, aumento del apetito), piel (estrías purpúreas, acné, hirsutismo, piel fina y facilidad de magullarse), gastrointestinales (ulceración peptídica, dispepsia, pancreatitis), oftálmicos (cataratas, glaucoma, papiloedema) y otros (inmunosupresión, hipertensión, neutrofilia).

Los corticosteroides orales inhalados, a menudo en altas dosis, fallan en la supresión de la inflamación de pulmones y vías aéreas en EPOC, y esto puede conducir a un mecanismo de resistencia activo asociado a la reducción en la expresión de la histona deacetilasa (HDAC) 2 [115, 116].

### **5.2.3. Mucolíticos**

La sobreproducción de esputo es común en pacientes con EPOC. Los mucolíticos orales sirven para reducir la viscosidad del esputo en las vías respiratorias y ayuda a la expectoración en pacientes. A pesar de que estos fármacos no tienen efecto en la función pulmonar, algunos estudios han descrito que su uso regular reduce la frecuencia de exacerbaciones en EPOC y está asociado con la reducción de los días de enfermedad [114].

Los fármacos más comúnmente utilizados son carboxicisteína e hidrocloreuro de metilcisteína, generalmente bien tolerados. Un incremento del estrés oxidativo está implicado en la respuesta inflamatoria de la EPOC, y la N- acetil cisteína [117], otro

mucolítico, puede conferir algunos beneficios debido a sus propiedades antioxidantes [114, 118].

### **5.3. Nuevas aproximaciones terapéuticas**

Aunque los tratamientos actuales son buenos, no se ha podido poner fin a la incesante disminución en la función pulmonar que conduce a aumentar los síntomas, discapacidad y exacerbaciones. Esto ha estimulado la búsqueda de vías más efectivas para controlar los procesos subyacentes de la enfermedad.

La terapia racional depende de la elucidación de los mecanismos celulares y moleculares implicados en la inflamación de pacientes con EPOC, y sólo recientemente se ha investigado a este respecto para identificar nuevas dianas terapéuticas. La inflamación vista en pacientes con EPOC es diferente de la observada en pacientes asmáticos, con diferentes células y mediadores en la inflamación, indicando que se necesitan diferentes tratamientos [111, 119-121].

El pilar en la terapia farmacológica de EPOC consiste en broncodilatadores de larga duración, agonistas  $\beta_2$  (salmeterol y formoterol) y anticolinérgicos (tiotropio), así como combinaciones de fármacos.

### **5.3.1. Broncodilatadores de larga duración**

Los únicos avances significativos en la terapia farmacológica se han conseguido con broncodilatadores de larga duración. Los broncodilatadores agonistas  $\beta_2$  de larga duración son broncodilatadores de uso en pacientes con EPOC, pero en la actualidad se desconoce si poseen efectos antiinflamatorios. Formoterol reduce la inflamación neutrofílica en pacientes con asma, pero esto no se ha estudiado hasta el momento en EPOC [122]. Se han visto casos donde la combinación corticosteroide-agonista  $\beta_2$  de larga duración reduce la inflamación en vías aéreas en EPOC [123, 124], mientras que el corticosteroide es inefectivo [124], lo que sugiere una interacción sinérgica entre los agonistas  $\beta_2$  y los corticosteroides, o que el agonista  $\beta_2$  es responsable de los efectos antiinflamatorios[116].

### **5.3.2. Anticolinérgicos**

Hay evidencia considerable que la acetilcolina puede ser liberada de células no neuronales, como células epiteliales y macrófagos, activando los receptores muscarínicos en células inflamatorias y estructurales como neutrófilos, macrófagos, linfocitos T y células epiteliales[125], y en estos casos es cuando hablamos del sistema colinérgico no neuronal[125, 126]. Esto sugiere que los anticolinérgicos tienen efectos antiinflamatorios potenciales en EPOC, particularmente porque el bromuro de tiotropio reduce las exacerbaciones. Los anticolinérgicos (y otros broncodilatadores) pueden reducir las fuerzas mecánicas en el pulmón que conduce al

cierre de las vías aéreas, y esto puede reducir la expresión de TGF $\beta$  y otros mediadores liberados en respuesta a la tensión mecánica de las células epiteliales. [116, 127, 128].

Un avance importante en la terapia ha sido el bromuro de tiotropio, anticolinérgico inhalado una vez al día, y otros antagonistas muscarínicos inhalados de larga duración, como el bromuro de aclidinium y el glicopirrolato, los cuales están actualmente en desarrollo[129].

Cuando usamos agonistas  $\beta_2$  y anticolinérgicos en combinación, la adición de formoterol al tiotropio tiene un efecto aditivo en la función pulmonar. Es probable que esto allane el camino para una combinación fija de inhaladores conteniendo tanto anticolinérgicos como agonistas  $\beta_2$ . [116, 120, 130].

### **5.3.3. Tratamientos usados para enfermedades que conllevan morbilidad**

Observaciones casuales y estudios epidemiológicos han mostrado que muchos tratamientos usados para enfermedades que conllevan morbilidad, como estatinas e inhibidores de enzimas convertidoras de angiotensina (IECAs), pueden ser aparentemente beneficiosos en EPOC, con reducción en las exacerbaciones y la mortalidad [131-133]. Esto puede reflejar efectos beneficiosos de estos fármacos en las comorbilidades asociadas a EPOC, como patología cardiovascular, y también tener efecto terapéutico en el proceso inflamatorio de la EPOC.

Las estatinas poseen efecto antioxidante, antiinflamatorio e inmunomodulador, además de reducir la expresión de quimiocinas y metaloproteasas de matriz [134]. También revierten la inflamación neutrofílica característica en EPOC. Por su parte, los IECAs reducen la hipertensión pulmonar, además de tener otros efectos, pues la angiotensina II puede tener efectos proinflamatorios [135]. De hecho, un antagonista de receptor de angiotensina II ( $AT_1$ ), irbesartan, ha mostrado que reduce la hiperinflación en pacientes con EPOC, a pesar de que sus mecanismos de acción se desconozcan [136].

#### **5.3.4. Antiproteasas**

Hay evidencias convincentes de un desequilibrio entre las proteasas que digieren elastina y otras proteínas estructurales, y las antiproteasas que protegen de este proceso, lo cual sugiere que inhibiendo estas enzimas proteolíticas o aumentando el número de antiproteasas endógenas podría ser beneficioso y teóricamente podría prevenir la progresión del enfisema [120].

#### **5.3.5. Estrategias antiinflamatorias**

En la actualidad también tenemos estrategias para tratar la inflamación en EPOC, ya que esta patología está caracterizada por inflamación crónica, particularmente en las vías respiratorias pequeñas y el parénquima pulmonar, con una predominancia de macrófagos, neutrófilos y células T citotóxicas y mediadores inflamatorios. Esta inflamación tiene un patrón diferente con respecto

al asma, y, en contraste, es altamente resistente a los efectos antiinflamatorios de los corticosteroides, lo que dirige una búsqueda hacia tratamientos alternativos [119].

- *Uso de antagonistas de mediadores*

Entre los nuevos tratamientos antiinflamatorios destacamos: antagonistas lipídicos, inhibidores de citocinas, antagonistas de quimiocinas, inhibidores del TGF $\beta$ , inhibidores de proteínas de fase aguda, e inhibidores de tirosina cinasas [116, 120].

- *Inhibición de la fosfodiesterasas 4*

Las enzimas PDE4 hidrolizan e inactivan selectivamente el AMPc, siendo un componente crítico del sistema complejo de nucleótidos cíclicos [137]. Este nucleótido, junto al calcio, es probablemente el sistema más importante de señalización celular en lo que a segundos mensajeros respecta. [111].

Las enzimas PDE4, son las PDEs predominantes que se expresan en neutrófilos, células T, y macrófagos, lo que sugiere que los inhibidores de estas enzimas podrían ser efectivos en el control de la inflamación en pacientes con EPOC[138].

El principal interés farmacológico de desarrollar fármacos frente a PDE4 se atribuye al amplio papel funcional de la enzima en diferentes células proinflamatorias e inmunocompetentes, incluyendo células de origen hematopoyético asociadas a la regulación de respuestas inflamatorias y células estructurales implicadas en procesos de remodelación [139-143]. En todas estas células, PDE4



está implicada en la regulación de los niveles de AMPc, los cuales en última instancia reducen muchos efectos proinflamatorios y de remodelamiento [111].

En la actualidad, los inhibidores de PDE4 son los tratamientos más avanzados como antiinflamatorios en EPOC, y han sido administrados normalmente vía oral. Un inhibidor selectivo de PDE4, roflumilast, inhibe la inflamación pulmonar y el enfisema en un modelo de ratones con humo de tabaco [144, 145]. En pacientes con EPOC, roflumilast suministrado vía oral unas 4 semanas reducía significativamente el número de neutrófilos y las concentraciones de quimiocinas CXCL8 en el esputo [146]. En ensayos clínicos, el roflumilast suministrado entre 6 y 12 meses mejoraba la función pulmonar en pacientes con EPOC de forma discreta, pero no tenía efecto significativo en la reducción de las exacerbaciones o mejoría del estado de salud [147, 148]. Estos resultados reflejan el hecho de que los efectos secundarios, como náuseas, diarreas, y dolores de cabeza, limitan la dosis que puede ser tolerada [116, 120].

Otra aproximación es el desarrollo de inhibidores selectivos de las diferentes isoenzimas. La inhibición de la PDE4D parece responsable de las náuseas y vómitos, mientras que la inhibición de la PDE4B conduce a los efectos antiinflamatorios, por lo que inhibidores selectivos de la PDE4B podrían ser tolerados. Sin embargo, la inhibición de la PDE4D puede tener algunos efectos antiinflamatorios, por ejemplo en los linfocitos T, por lo que la inhibición selectiva de PDE4B no será tan efectiva como la de los inhibidores globales de la PDE4 [149].

La PDE7A también está expresada en las mismas células inflamatorias que PDE4, por lo que la inhibición de PDE7 puede ser beneficiosa. Sin embargo, un inhibidor selectivo de la PDE7 tiene sólo un pequeño efecto antiinflamatorio cuando se administra sola, pero potencia los efectos antiinflamatorios de un inhibidor PDE4, sugiriendo que un inhibidor combinado puede ser usado si no aumenta el número de efectos secundarios [120, 149, 150].

- *Inhibición del NFκB*

El factor nuclear kappa B (NFκB) se activa en los macrófagos y células epiteliales de pacientes con EPOC, particularmente durante las exacerbaciones, siendo las pequeñas moléculas de inhibidores de la cinasa de NFκB (IKK) 2 las más prometedoras en cuanto a futuras dianas terapéuticas, aunque todavía no se hayan desarrollado ensayos clínicos a este respecto [120].

- *Inhibición de la MAP cinasa p38*

Las proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPKs) juegan un papel clave en inflamación crónica, habiendo muchas cascadas enzimáticas todavía por determinar en este proceso. Un potente inhibidor de la isoforma p38-α, SD-282, es efectivo en la inhibición de la liberación de TNFα por macrófagos pulmonares humanos *in vitro*, y el mismo inhibidor es también efectivo en la supresión de la inflamación en un modelo de tabaco de EPOC en

ratón [151], en el cual la terapia con corticosteroides fue inefectiva [120].

- *Inhibición del IP3*

Una forma particular del inositol trifosfato (IP3), la IP3K- $\gamma$ , está implicada en el reclutamiento y activación de neutrófilos. El silenciamiento génico de IP3K- $\gamma$  desemboca en una inhibición de la migración y activación neutrofílica, así como en la función de linfocitos T y macrófagos, por lo que estos inhibidores podrían ser una potencial terapia antiinflamatoria en EPOC [120, 152].

- *Activación del RAPP*

Los receptores activados de la proliferación de peroxisomas (RAPPs) están implicados en muchas manifestaciones sistémicas en EPOC como caquexia, debilitamiento del músculo esquelético e inflamación sistémica [153]. El interés particular en EPOC se centra en los efectos inmunomoduladores de los agonistas de RAPPs en la secreción de IL17 e IFN $\gamma$  [116, 154].

### **5.3.6. Estrategias frente al estrés oxidativo**

También requiere ser mencionada la estrategia farmacológica enfocada hacia el estrés oxidativo, el cual, está implicado en pacientes con EPOC, particularmente durante las exacerbaciones [117], contribuyendo las especies reactivas de oxígeno a la patofisiología [155]. El estrés oxidativo reduce la respuesta esteroide vía una reducción en la actividad y expresión de

la HDAC2 [115]. Este mismo estrés oxidativo puede ser crítico en la aceleración no programada del envejecimiento del pulmón a través de los efectos inhibitorios de las moléculas antienvjecimiento, lo cual se traduce en un declive de la función pulmonar. La reducción del estrés oxidativo en pacientes con EPOC podría proveer beneficio clínico reduciendo la inflamación y revirtiendo la resistencia a corticosteroides [116].

Los mecanismos moleculares implicados en la resistencia a corticosteroides que se produce a menudo con altas dosis de corticosteroides no están bien conocidos en la actualidad y serían dianas noveles en la terapia de la EPOC. El principal mecanismo de la resistencia a corticosteroides en EPOC es la disminución de la expresión de la HDAC2, que apaga múltiples genes inflamatorios en respuesta a la terapia con corticosteroides. Se ha visto que esta enzima es muy defectiva en pulmones y macrófagos alveolares afectados por EPOC. Esta anomalía puede ser consiguiente a la actividad de estrés oxidativo, a través de las vías de la cinasa de inositol trifosfato (PI3K) que fosforilan e inactivan la HDAC2, y con el estrés nitrosativo a través de la nitración de tirosinas que conduce a la ubiquitinación y degradación de HDAC2 [156].

Una estrategia terapéutica novel sería la reversión de esta resistencia a corticosteroides mediante el aumento de la expresión y actividad de la HDAC2, ya que esta reversión puede ser muy útil en la reducción de la inflamación sistémica en pacientes con EPOC. Esto se podría llevar a cabo de diferentes formas: teofilina y fármacos asociados, antioxidantes y macrólidos.

- *Fármacos asociados a la teofilina*

La administración oral de dosis altas de teofilina aumenta la expresión de HDAC2 en macrófagos alveolares en pacientes con EPOC, y restablece la respuesta a esteroides [157, 158]. La inflamación resistente no se revierte con altas dosis de corticosteroides o por teofilina sola, pero se revierte con bajas dosis de teofilina oral o inhalada en combinación con un corticosteroide vía un incremento en la actividad de HDAC2. Así pues, la teofilina, puede conducirnos a una nueva aproximación terapéutica para la restauración de la respuesta a corticosteroides que evite los efectos secundarios e interacciones farmacológicas que produce por sí sola [120].

- *Antioxidantes*

El estrés oxidativo reduce la respuesta esteroide mediante la reducción en la actividad y expresión de la HDAC2. Los antioxidantes que poseemos en la actualidad están basados en el glutatión. Se están desarrollando antioxidantes más potentes y estables (miméticos de la superóxido dismutasa e inhibidores de la NADPH oxidasa) [159], como la taurina [160, 161].

Es interesante el uso de N-acetilcisteína (NAC), un potente antioxidante, derivado del aminoácido L-Cys, el cual contiene grupos tioles [162]. La acción antioxidante de este fármaco se basa en que capta radicales de oxígeno [163], además de ser capaz de penetrar en el citoplasma celular induciendo la síntesis de GSH, ya que NAC aporta el reactivo limitante en la síntesis del mismo, la L-

Cys [164]. NAC ha demostrado cierta eficacia clínica en pacientes con fibrosis pulmonar [118, 165], EPOC [166] y otras patologías.

- *Macrólidos*

Se ha visto que los macrólidos también tienen efectos antiinflamatorios independientes a sus efectos como antibióticos. Inhiben la inflamación mediante la inhibición de factores de transcripción como NFκB. Se ha visto que un macrólido no antibiótico, EM-703 [120], revierte la resistencia a corticosteroides, aumentando la actividad de HDAC2. Así pues, muchos macrólidos no antibióticos están actualmente en desarrollo como terapia antiinflamatoria.

### **5.3.7. Nuevas perspectivas**

La mejor aproximación para la prevención y desarrollo de la EPOC es el dejar de fumar. También es importante el identificar los factores genéticos que determinan porqué la EPOC se desarrolla en sólo una minoría de fumadores habituales, así como identificar los genes que predisponen a los fumadores para desarrollar la EPOC.

También hay una necesidad de desarrollar nuevas formas de valorar resultados y de sustitución de biomarcadores, como el análisis de los parámetros del esputo o los condensados de exhalados. Otra aproximación sería el uso de técnicas de imagen que permitan ver la progresión de la enfermedad, y además sería importante profundizar en la investigación de los mecanismos

celulares y moleculares básicos de la EPOC, ayudados por modelos animales que lo permitan.

De los fármacos que están actualmente en desarrollo, los inhibidores de la PDE4, los inhibidores de la MAPK p38 y los inhibidores de la IKK2 parecen prometedores, pero está ahí la preocupación por los efectos secundarios, con lo que se necesitará administrar estos fármacos de forma inhalatoria. Por su parte, los antagonistas de las quimiocinas CXCR2 apuntan hacia una terapia antineutrófila antimacrofágica, y además podrían tolerarse bien al administrarse vía oral.





## II. OBJETIVOS



Tal y como está expuesto en el apartado de introducción del presente trabajo, la EPOC está caracterizada por una obstrucción de las vías respiratorias, siendo el tabaco el principal factor que contribuye al desarrollo de esta patología. Una característica distintiva de esta patología es la hipersecreción mucosa [110]. De este modo, en el presente trabajo se planteó estudiar los mecanismos que conducen a la activación del complejo NADPH oxidasa inducidos por extracto de humo de tabaco y las consecuencias que dicha activación puede desempeñar sobre la producción de mucinas en células epiteliales de bronquio humano.

Para ello, el primer objetivo del trabajo fue establecer un cultivo de células epiteliales de bronquio humano que permitiese la diferenciación celular, de modo que simulase las condiciones fisiológicas del epitelio respiratorio humano, es decir, con una polaridad celular establecida, y con células secretoras de moco, el cual, fuese liberado al medio.

Ya que el tabaco está descrito como el principal agente desencadenante de la hipersecreción mucosa, se planteó utilizar como estímulo extracto de humo de tabaco, CSE, utilizado como tal en investigaciones previas [78, 167, 168].

Una vez definidos tanto el cultivo celular como el estímulo a utilizar, se plantearon los siguientes objetivos:

1. Efectos del CSE sobre el sistema NADPH oxidasa:
  - Caracterización de las isoenzimas de este sistema participantes en dicho proceso.
  - Modificación de la expresión del sistema debida a CSE.
  - Modificación de la actividad debida a CSE.
  
2. Efectos de la activación del sistema NADPH oxidasa:
  - Sobre la síntesis de mucinas.
  - Sobre la expresión de genes inflamatorios.
  
3. Papel del AMPc en la expresión de mucinas inducida por CSE.
  
4. Papel del EGFR en la síntesis de mucinas inducida por CSE.

### **III. MATERIAL Y MÉTODOS**



## **1. Material**

### **1.1. Células**

Para los experimentos planteados se escogió un cultivo primario de células epiteliales de bronquio humano obtenido por resección pulmonar debida a carcinoma de pulmón. Dicho proceso está aprobado por el Comité Ético de Investigaciones Clínicas (CEIC) del Consorcio Hospital General Universitario de Valencia.

### **1.2. Sondas TaqMan**

Con la finalidad de determinar la cantidad de ARNm codificante para los genes estudiados se escogió la técnica de RT-PCR, utilizando para ello los TaqMan® *Assays on demand* de Applied Biosystems.

La Tabla 4 muestra las características de los genes estudiados y del amplicón (cebadores más sondas) que se utilizaron según las instrucciones del fabricante para la detección de los niveles de expresión génica:

Nombre del gen	Símbolo del gen	Alias	Referencia	Long. amplic. (pb)
Cytocrome b-245, beta polypeptide	CYBB	CGD, GP91-1, GP91-PHOX, GP91PHOX, NOX2, p91-PHOX	Hs00166163_m1	78
Dual oxidase 1	DUOX1	LNOX1, MGC138840, MGC138841	Hs00213694_m1	87
Dual oxidase 2	DUOX2	LNOX2, NOXEF2, P138-THOX, THOX2	Hs00204187_m1	74
Mucin 5AC, oligomeric mucus/gel-forming	MUC5AC	MUC5	Hs01365601_m1	118
Phosphodiesterase 4A, cAMP-specific (phosphodiesterase E2 dunce homolog, Drosophila)	PDE4A	DPDE2, PDE4, PDE46	Hs00183479_m1	62
Phosphodiesterase 4B, cAMP-specific (phosphodiesterase E4 dunce homolog, Drosophila)	PDE4B	DKFZp686F2182, DPDE4, MGC126529, PDE4B5, PDEIVB, RP5-876C12.1	Hs00277080_m1	72
Phosphodiesterase 4C, cAMP-specific (phosphodiesterase E1 dunce homolog, Drosophila)	PDE4C	DPDE1, MGC126222	Hs00971865_m1	70



Nombre del gen	Símbolo del gen	Alias	Referencia	Long. amplic. (pb)
Phosphodiesterase 4D, cAMP-specific (phosphodiesterase E3 duncce homolog, Drosophila)	PDE4D	DPDE3 HSPDE4D PDE4DN2 STRK1	Hs00174810_m1	123
Transforming growth factor, alpha	TGFA	TGFA	Hs00608187_m1	70
Tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2)	TNF	DADB-70P7.1, DIF, TNFalpha, TNFA, TNFSF2	Hs00174128_m1	80
Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	GAPDH	GAPDH	4326317	122
Human ACTB (beta actin)	ACTB	ACTB	4326315	171

**Tabla 4. Sondas TaqMan® utilizadas en RT-PCR.**

### 1.3. Fármacos, reactivos, kits y soluciones utilizadas

- **Ácido sulfúrico:** Panreac, Castellar del Vallès, Barcelona, España (471058).
- **Ácido tricloroacético (cloroformo):** Panreac, Castellar del Vallès, Barcelona, España (151067).
- **Agua Dietilpirocarbonato (DEPC):** Applied Biosystems, Tres Cantos, Madrid, España (AM9906).

- **Agarosa:** Euroclone, Italia (EMR010500).
- **Amersham cAMP Biotrak Enzymeimmunoassay (EIA) system:** GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, Reino Unido (RPN225).
- **Amplex® Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay kit:** Invitrogen, Reino Unido (A22188).
- **Amfotericina B:** Lonza Group LTD, Suiza (17-836R).
- **BEBM Single Quots:** Lonza Group LTD, Suiza (CC-4175).
- **Bluing Reagent:** Thermo Fisher Scientific, Alcobendas, Madrid, España (6769001).
- **Bronchial Epithelial Cell Basal Medium (BEBM):** Lonza Group LTD, Suiza (CC-3171).
- **Cigarrillos de investigación 2RF4:** University of Kentucky, KY, EEUU.
- **Colágeno:** Sigma Aldrich, Tres Cantos, Madrid, España (C3867).
- **dePeX:** BDH Chemicals, Poole, Reino Unido (101410-638).

- **Difenilenedonio (DPI):** Sigma Aldrich, Tres Cantos, Madrid, España (D2926). Se prepara a concentración 6,35 mM en DMSO.
- **Dulbecco´s modified Eagle Medium (DMEM):** Lonza Group LTD, Suiza (BE12-604F).
- **Eosina Amarillenta:** Panreac, Castellar del Vallès, Barcelona, España (251299).
- **Etanol Absoluto:** Panreac, Castellar del Vallès, Barcelona, España (361086).
- **Factor de crecimiento epidérmico (EGF):** Sigma Aldrich, Tres Cantos, Madrid, España (E4127).
- **FluoCycle™ II, Mix for Probe RT-PCR:** Euroclone, Italia (EMQ012250).
- **Glucógeno:** Calbiochem, San Diego, California, EEUU (361507).
- **Hematoxilina de Harris:** Panreac, Castellar del Vallès, Barcelona, España (253949).
- **High Sensitivity Human Cytokine Milliplex™ MAP Kit:** Millipore Corporation, Billerica, EEUU (HSCYTO-60SK).

- **Isopropranolol:** Sigma Aldrich, Tres Cantos, Madrid, España (I9516).
- **Lactate Dehydrogenase Cytotoxicity Assay:** Cayman, Reino Unido (10008882).
- **Medio Royal Park Memorial Institute (RPMI):** Euroclone, Italia (ECB9006L).
- **Millex Syringe Driven Filter Unit MCE 0,22 µm:** Millipore Corporation, Billerica, EEUU (SLGS033SS).
- **N-acetilcisteína:** Sigma Aldrich, Tres Cantos, Madrid, España (A8199). Se prepara a una concentración 1M en agua bidestilada.
- **Parafina:** Panreac, Castellar del Vallès, Barcelona, España (PPPLUS).
- **Paraformaldehido al 4%:** Panreac, Castellar del Vallès, Barcelona, España (143091).
- **PCR 100 pb low ladder:** Sigma Aldrich, Tres Cantos, Madrid, España (P1473).
- **Piclamilast:** Sanofi-Aventis, Estrasburgo, Francia. Se prepara a una concentración  $10^{-4}$  M en DMSO.

- **Poli-L- lisina:** BDH Chemicals, Poole, Reino Unido (734-1005).
- **Quantikine® Human TGF $\alpha$  ELISA Kit:** R&D Systems Minneapolis, MN, EEUU (DTGA00).
- **Tampón salino fosfato (PBS):** Sigma Aldrich, Tres Cantos, Madrid, España (P4417).
- **TaqMan® Gene Expression Assays:** Applied Biosystems, Tres Cantos, Madrid, España (las referencias de cada una de las sondas están indicadas en el apartado anterior).
- **TaqMan® Reverse Transcription Reagents:** Applied Biosystems, Tres Cantos, Madrid, España (N8080234).
- **Transwell insert:** Millipore Corporation, Billerica, EEUU (PIRP12R48).
- **Trietanolamina (TEAM):** Sigma Aldrich, Tres Cantos, Madrid, España (T58300).
- **TriPure Isolation Reagent:** Roche Diagnostics, Leganés, Madrid, España (11667157001).
- **Xileno:** Merck, Darmstadt, Alemania (481769).



## 2. Métodos

### 2.1. Cultivo de células epiteliales

Con la finalidad de establecer el cultivo de células epiteliales de vías aéreas, se partió del fragmento de bronquio obtenido por resección pulmonar, tal y como se expone en el apartado de Material.

Dicho fragmento se resuspendió en medio *Royal Park Memorial Institute* (RPMI) con antibióticos. Tras limpiar la pieza, se hicieron explantes de unos 2 mm aproximadamente para pasar posteriormente a placas de 6 pocillos tapizadas con colágeno  $10^{-2}$  M, a razón de 8-10 explantes por pocillo, dejándolos 15 minutos en estufa a  $37^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, se añadió 1 ml de medio *Bronchial Epithelial Cell Basal medium*, (BEBM), específico de crecimiento para células epiteliales de bronquio, suplementado con BEBM *single quots* y se incubó a  $37^{\circ}\text{C}$  con 5% de  $\text{CO}_2$ .

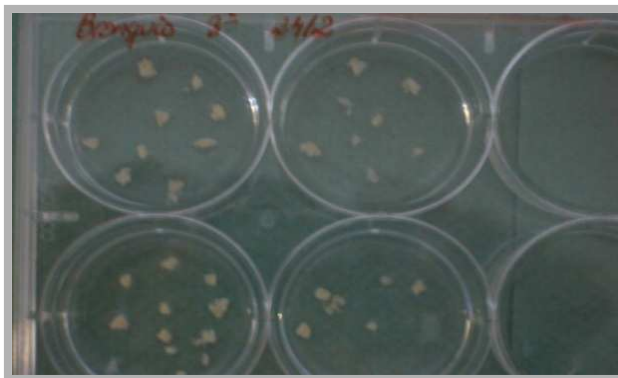


Figura 10. Explantes de bronquio humano depositados en placas con Colágeno  $10^{-2}$  M.

Cuando se alcanzó confluencia alrededor de los explantes, se retiraron los fragmentos y se amplió el cultivo celular en medio BEBM suplementado con *single quots*, y al tener una confluencia alrededor del 80-90%, las células se dispusieron en una interfase aire-líquido (*Air Liquide Interface*, ALI). Para constituir dicha interfase, se mezclaron a partes iguales los medios *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) y BEBM, suplementado con anfotericina B 250 µg/ml, BEBM *single quots* y EGF 50 µg/ml, sobre un *transwell insert*, que consiste en un cestillo depositado dentro de un pocillo, cuyo fondo es una membrana microporosa que delimita dos compartimentos, el superior y el inferior. En este caso particular, y dependiendo de las necesidades de los experimentos, las células se sembraron en placas de 12 o 24 pocillos.

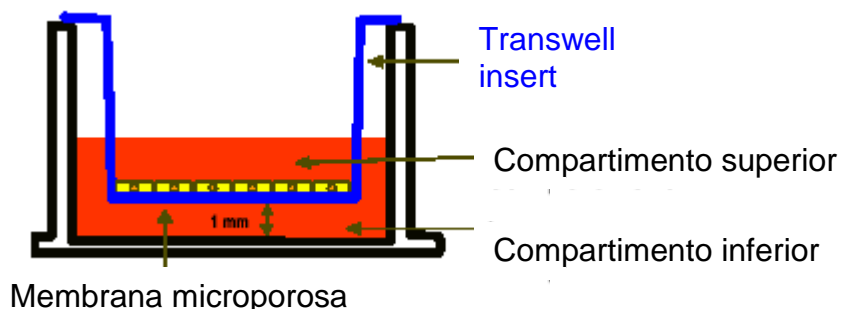


Figura 11. Estructura de un *Transwell insert*, donde quedan delimitados los dos compartimentos en el *air liquide Interface*.

Este tipo de cultivo tiene como finalidad establecer una diferenciación celular que simula las condiciones fisiológicas del epitelio respiratorio humano. Para ello, las células se dispusieron en ALI en la parte superior del *insert*. Al día siguiente se retiró el ALI



para eliminar las células muertas y se depositó de nuevo ALI sobre el *insert*.

Cuando se observó una monocapa confluyente, el cultivo se mantuvo sólo con medio en el compartimento inferior, para así establecer una polaridad celular.

## **2.2. Diseño experimental**

Cuando las células estaban diferenciadas y con cilios se procedió a la estimulación de las mismas. Todas las condiciones se realizaron por triplicado, y dependiendo del experimento propuesto, las células se sembraron en placas de 12 o de 24 pocillos.

En placas de 12 pocillos se sembraron 3 pocillos del grupo control para la tinción de Hematoxilina- Eosina.

Por otra parte, en placa de 24 pocillos se realizaron los siguientes experimentos:

<b>Condiciones</b>	<b>RT-PCR</b>	<b>Cuantificación de AMPc</b>
<b>Control</b>	<b>X</b>	<b>X</b>
<b>CSE 10% 4H</b>	<b>X</b>	
<b>CSE 10%+ DPI 10<sup>-6</sup> M 4H</b>	<b>X</b>	
<b>Piclamilast 10<sup>-7</sup> M 6H</b>	<b>X</b>	
<b>CSE 10% 6H</b>	<b>X</b>	<b>X</b>
<b>CSE 10%+ Piclamilast 10<sup>-7</sup> M 6H</b>	<b>X</b>	<b>X</b>
<b>CSE 10%+ NAC 1 mM 6H</b>	<b>X</b>	
<b>CSE 10%+ DPI 10<sup>-6</sup> M 6H</b>	<b>X</b>	<b>X</b>
<b>CSE 10%+ Tyr AG1478 10<sup>-6</sup> M</b>	<b>X</b>	
<b>CSE 10% 8H</b>	<b>X</b>	
<b>CSE 10%+DPI 10<sup>-6</sup> M 8H</b>	<b>X</b>	
<b>CSE 10% 24H</b>	<b>X</b>	
<b>CSE 10%+ DPI 10<sup>-6</sup> M 24H</b>	<b>X</b>	

Tabla 5. Condiciones experimentales realizadas en placa de 24 pocillos.

Además, se recogieron los sobrenadantes de la parte apical para realizar determinaciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, TGFα y citocinas liberadas, ya que es en este sobrenadante donde se vierten dichos compuestos liberados por la célula en respuesta a diferentes condiciones.

De este modo, para la cuantificación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se utilizaron sobrenadantes de las siguientes condiciones:

- a) **Control.**
- b) **CSE 10% 0,5 H.**
- c) **CSE 10% 4 H.**
- d) **CSE 10% + DPI  $10^{-6}$  M 4 H.**
- e) **CSE 10% 6 H.**
- f) **CSE 10% + Piclamilast  $10^{-7}$  M 6 H.**
- g) **CSE 10% + NAC 1 mM 6 H.**
- h) **CSE 10% + DPI  $10^{-6}$  M 6 H.**
- i) **CSE 10% 8 H.**
- j) **CSE 10% + DPI  $10^{-6}$  M 8 H.**
- k) **CSE 10% 12 H.**
- l) **CSE 10% 24 H.**
- m) **CSE 10% + DPI  $10^{-6}$  M 24 H.**

Por otra parte, para la cuantificación de los niveles de TGF $\alpha$  se utilizaron los siguientes sobrenadantes:

- a) **Control.**
- b) **CSE 10% 6 H.**
- c) **CSE 10% + Piclamilast  $10^{-7}$  M 6 H.**

Finalmente, para la determinación de citocinas liberadas se utilizaron los siguientes sobrenadantes:

- a) **Control.**
- b) **CSE 10% 6H.**
- c) **CSE 10% + Piclamilast  $10^{-7}$  M 6H.**

- d) CSE 10% + DPI  $10^{-6}$  M 6H.**
- e) CSE 10% + NAC 1 mM 6H.**

En todas las estimulaciones expuestas a lo largo de este apartado de diseño experimental, las células se expusieron a los fármacos durante 30 minutos previos a la adición del estímulo. Tras la adición del mismo, las células se incubaron a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> durante el tiempo que indica cada condición.

## **2.3. Estudios histológicos**

### **2.3.1. Procesamiento de las muestras**

El epitelio pseudoestratificado con células ciliadas de bronquio humano se fijó al menos 48 horas en paraformaldehído al 4%. Para su inclusión, se deshidrataron en concentraciones crecientes de etanol, seguido de xileno, y a continuación se embebieron en parafina, seguido de los siguientes pasos:

- Etanol 70% (1 hora).
- Etanol 96% I (3 horas).
- Etanol 96% II (1,5 horas).
- Etanol 100% I (2 horas).
- Etanol 100% II (6 horas).
- Xileno I (1,5 horas).

- Xileno II (2,5 horas).
- Parafina I (2,5 horas).
- Parafina II (2 horas).

Las muestras se incluyeron en bloques de parafina con un inclusor EC350-1 *Myr* (Leica), se cortaron en secciones consecutivas de 4  $\mu\text{m}$  de espesor con un micrótopo *HM 340 E* (Leica) y se adhirieron a portaobjetos tratados con poli-L-lisina.

### **2.3.2. Tinción con hematoxilina-eosina**

Los cortes histológicos fueron desparafinados con xileno e hidratados con concentraciones decrecientes de etanol. Se tiñeron con hematoxilina de Harris, *bluing reagent* y eosina amarilla. Posteriormente, las muestras se deshidrataron por sucesivos pases en alcoholes crecientes y xileno, y se montaron con una resina sintética (dePeX). Las preparaciones se analizaron con un microscopio de campo claro (Leica DM6000B) tomando fotografías en las magnificaciones oportunas.

## **2.4. Obtención del condensado de humo de tabaco**

Con la finalidad de establecer el tabaco como estímulo para los experimentos propuestos, y basados en informaciones

previas, se preparó extracto de humo de tabaco (*Cigarette Smoke Extract*, CSE), el cual, se usa para estudiar los efectos del humo de tabaco en varios tipos de cultivos celulares [78, 167, 168].

Para proceder a la preparación del extracto, se introdujo un cigarrillo de investigación (2RF4; *Tobacco Health Research, University of Kentucky*, KY, EEUU) en una bomba respiratoria (*Apparatus Rodent Respirator 680, Harvard*, Alemania) a través de un mecanismo en el que el humo producido es relativo al patrón de fumado en humanos (3 soplos/minuto; 1 soplo de 35 minutos; cada soplo de 2 segundos de duración a 0,5 cm sobre el filtro), todo ello burbujeado en un frasco que contenía 25 ml de ALI precalentado a 37°C.

La solución se esterilizó mediante filtración a través de un sistema esterilizador de acetato de celulosa de 0,22  $\mu\text{m}$ . Se consideró el 100% de CSE a la solución restante de CSE, la cual, fue usada en los experimentos durante los 30 minutos siguientes a la preparación de la misma. La dosis de CSE 10% corresponde aproximadamente a fumar dos paquetes de cigarrillos al día[78].

La calidad del CSE preparado fue evaluada en base a la absorbancia a 320 nm, que es la longitud de onda específica de absorción para el peroxinitrito. Se utilizaron aquellas soluciones madre con un valor de absorbancia de  $3,0 \pm 0,1$ . Con el fin de testar la citotoxicidad del CSE en células epiteliales de bronquio humano en ALI, se trataron las mismas con concentraciones crecientes de CSE hasta el 20% durante 24 y 48 horas, no viendo diferencias en los

niveles de lactato deshidrogenada (*Lactate Dehydrogenase Cytotoxicity Assay*, Cayman, Reino Unido) en comparación con el grupo control.

## 2.5. Estudio de la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Con el objetivo de determinar la cantidad de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> liberada, se incubaron las células epiteliales en una placa de 24 pocillos en ALI con 600 µl en la parte basolateral y 200 µl en la parte apical con o sin CSE como estímulo y con o sin fármacos, añadidos durante los 30 minutos previos a la adición del estímulo, como tratamiento. Tras el tiempo de incubación a 37°C, indicado en el diseño experimental, se recogió el sobrenadante de la parte apical para determinar la cantidad de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> producida utilizando el *Amplex® Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay Kit* (Invitrogen, Reino Unido).

Este kit se basa en una técnica colorimétrica, en la que el sustrato es convertido en un compuesto valorable mediante la actividad enzimática de proteínas conjugadas a un anticuerpo, el cual confiere especificidad. Uno de los enzimas más comúnmente utilizados es la peroxidasa de rábano (HRP), una proteína de 40 kDa, que cataliza la reducción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en H<sub>2</sub>O.

En presencia de sustratos específicos, que actúan como dadores de hidrógeno, la acción de la HRP convierte moléculas sin color o no fluorescentes en moléculas coloreadas o fluorescentes. Amplex® Red es un sustrato para usar con HRP que contiene ensayos. Dicha sustancia, en presencia de la peroxidasa, reacciona

con  $\text{H}_2\text{O}_2$  en una relación estequiométrica 1:1 para producir resorufina, un compuesto rojo fluorescente que tiene una absorción y emisión de fluorescencia máxima de 563 nm y 587 nm respectivamente. Del mismo modo, dicho compuesto también manifiesta absorbancia a 560 nm.

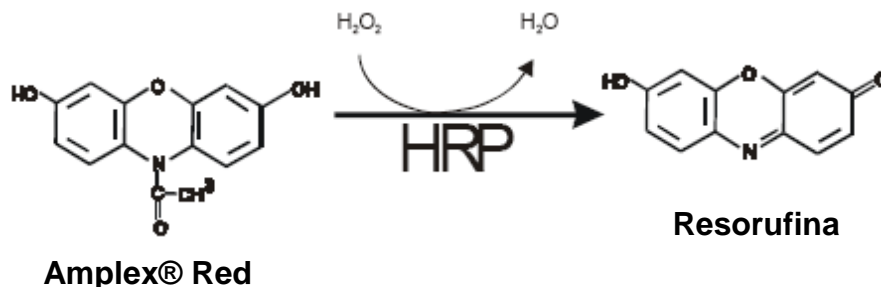


Figura 12. Producción de resorufina a partir de Amplex® Red en una reacción catalizada por la peroxidasa de rábano.

Para ello se preparó una curva patrón con 50  $\mu\text{l}$  de cantidades conocidas de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0-10 mM), y sobre una placa de 96 pocillos se depositaron 50  $\mu\text{l}$  de muestra. Seguidamente se preparó la solución 100 mM Amplex® Red (BioTek®) y la de HRP a 0,2 U/ml, añadiéndola a las muestras y posteriormente, tras incubar 30 minutos a temperatura ambiente y oscuridad, se leyó la absorbancia a 560 nm y se interpoló la concentración obtenida para las muestras en la curva patrón.

## 2.6. Determinación de la producción de AMPc

Para medir la producción de AMPc a nivel tisular, se incubaron las células epiteliales en placas de 24 pocillos en ALI con



600 µl en la parte basolateral y 200 µl en la parte apical con o sin CSE al 10% como estímulo y con o sin el inhibidor de la PDE4 piclamilast ( $10^{-7}$  M), añadido durante los 30 minutos previos a la adición del estímulo, como tratamiento. Tras 6 horas de incubación a 37°C, se añadió etanol frío sobre el cultivo hasta alcanzar una suspensión final del 65% de etanol y dejamos que se mezclase bien. Posteriormente, se eliminó el sobrenadante en tubos de microcentrífuga, lavando el precipitado remanente en etanol frío al 65%, y depositando estos lavados en sus tubos correspondientes. A continuación se centrifugaron los extractos a 2000 g durante 15 minutos a 4°C, transcurridos los cuales se depositaron los sobrenadantes en tubos nuevos. Estos extractos se desecaron en un concentrador de vacío *Speed Vac Concentrador Savant SPD121P* (Thermo Electron Corporation), y tras este paso, se resuspendió en *Assay Buffer* (GE Healthcare).

La determinación de la cantidad de AMPc se llevó a cabo utilizando el *Amersham cAMP Biotrak Enzymeimmunoassay (EIA) system* (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, Reino Unido). Este sistema es un kit consistente en un Ensayo Inmunofluorescente Ligado a Enzima (*Enzime-Like Immunosorbent Assay, ELISA*). Contiene un anticuerpo frente a AMPc.

Este ensayo emplea la técnica de inmunoensayo cuantitativo en sándwich, en una placa de 96 pocillos. Esta microplaca contiene un anticuerpo específico policlonal para AMPc, preincubado en el fondo del pocillo, sobre el cual se añadieron 100 µl de estándares (con los que se realizó la curva patrón) o de muestra,

paso tras el cual se pipetearon 100 µl de antisuero. A continuación se mantuvo la placa en agitación durante 2 horas a 4°C, tiempo en el que cualquier molécula de AMPc presente se une al anticuerpo inmovilizado. Después de lavar para eliminar cualquier tipo de unión inespecífica, se añadieron 50 µl de un anticuerpo policlonal específico para AMPc conjugado a peroxidasa, y se incubaron durante 1 hora más a 4°C y en agitación. Tras un lavado para eliminar cualquier unión enzima-anticuerpo, se añadieron 150 µl de una solución de sustrato a los pocillos y se incubó durante 30 minutos en oscuridad para que se desarrollase coloración proporcional a la concentración de AMPc unido en el paso inicial.

Finalmente, para detener el desarrollo de coloración, se añadieron 100 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M y a continuación se midió la intensidad de la misma, leyendo la absorbancia a 450 nm. Los datos se interpolaron en la curva patrón construida con las cantidades conocidas de estándar de AMPc (12,5-3200 fmol/pocillo), y se expresaron como concentración de AMPc en fmol/pocillo.

## **2.7. Ensayo de la escisión y liberación de TGF $\alpha$**

Para medir la cantidad del Factor de Crecimiento Transformante- $\alpha$  (*Transforming Growth Factor, TGF $\alpha$* ) liberado, se incubaron las células epiteliales en ALI con 600 µl en la parte basolateral y 200 µl en la parte apical con o sin CSE como estímulo y con o sin fármacos, añadidos durante los 30 minutos previos a la adición del estímulo, como tratamiento. Tras 6 horas de incubación a 37°C, se recogió el sobrenadante de la parte apical para medir la

cantidad de proteína liberada. Para ello, se utilizó el *TGF $\alpha$  ELISA Kit* (Oncogene, San Diego, CA, EEUU).

Este kit consiste en un ELISA en fase sólida de 4,5 horas diseñado para medir TGF $\alpha$  humano en sobrenadantes de cultivos celulares, suero, plasma y leche humana. Contiene TGF $\alpha$  humano recombinante con *E. coli* y ha demostrado que cuantifica con precisión el factor recombinante.

Este ensayo emplea la técnica de inmunoensayo cuantitativo en sándwich, en una placa de 96 pocillos. Esta microplaca contiene un anticuerpo específico policlonal para TGF $\alpha$ , preincubado en el fondo del pocillo, sobre el cual se añadieron 100  $\mu$ l de *Assay Diluent* RD1W, y posteriormente se adicionaron 50  $\mu$ l de estándares (con los que se realizó la curva patrón) o de muestra, manteniendo la placa en incubación durante 2 horas, tiempo en el que cualquier molécula de TGF $\alpha$  presente se une al anticuerpo inmovilizado. Después de lavar para eliminar cualquier tipo de unión inespecífica, se añadieron 200  $\mu$ l de un anticuerpo policlonal específico para TGF $\alpha$  que está ligado a un enzima, incubando posteriormente durante 2 horas más. Tras un lavado para eliminar cualquier unión enzima-anticuerpo, se añadieron 200  $\mu$ l de una solución de sustrato a los pocillos, seguido de una incubación durante 30 minutos en oscuridad para que se desarrollase coloración proporcional a la concentración de TGF $\alpha$  unida en el paso inicial.

Finalmente, se detuvo el desarrollo de coloración, para lo que se añadieron 50  $\mu$ l de *Stop Solution* y a continuación se valoró la

intensidad de la misma. Los datos fueron interpolados en la curva patrón construida con las cantidades conocidas de Standard de TGF $\alpha$  (15,6- 1000 pg/ml), y se expresaron como concentración de TGF $\alpha$  en pg/ml.

## **2.8. Detección de la liberación de citocinas**

Para medir la cantidad de citocinas liberadas, las células epiteliales fueron incubadas en placas de 24 pocillos en ALI con 600  $\mu$ l en la parte basolateral y 200  $\mu$ l en la parte apical con o sin CSE como estímulo y con o sin fármacos, añadidos durante los 30 minutos previos a la adición del estímulo, como tratamiento. Tras 6 horas de incubación a 37°C, se recogió el sobrenadante de la parte apical para medir la cantidad de proteína liberada. Para la determinación de citocinas liberadas al medio, empleamos el *High Sensitivity Human Cytokine Milliplex™ MAP Kit* (Millipore).

La citocina de interés a determinar en el presente trabajo es TNF $\alpha$ . Podemos considerar este ensayo como un ELISA múltiple automatizado. El panel Milliplex™ MAP está basado en la tecnología Luminex® xMAP®, la cual utiliza técnicas patentadas con microesferas que poseen un código de color interno con dos colorantes fluorescentes. A través de concentraciones precisas de estos colorantes, se pueden crear hasta 100 sets de bolas coloreadas, cada una de las cuales está marcada con un anticuerpo de captura específico. Después de que un analito de una muestra a testar se captura por la bola, se introduce un anticuerpo de detección biotinilado. La mezcla de reacción se incuba con un conjugado de

estreptavidina-ficoeritrina, la molécula reportera, para completar la reacción en la superficie de cada microesfera. Estas microesferas se dejan pasar rápidamente a través de un láser que excita los marcadores internos del conjunto de las microesferas. Un segundo láser excita la ficoeritrina, el marcador fluorescente en la molécula reportera. Finalmente, unos procesadores identifican cada una de las microesferas y cuantifican el resultado de su bioensayo basado en las señales fluorescentes del reportero.



**Figura 13. Sistema Luminex 200™ utilizado en la detección de liberación de citocinas al medio.**

El procedimiento experimental de este ensayo empezaba por añadir 200  $\mu$ l de *Wash Buffer* 1x a cada pocillo, seguido de agitación durante 10 minutos a temperatura ambiente. El contenido de los pocillos fue aspirado, tras lo cual se añadieron 50  $\mu$ l de *Assay*

*Buffer* tanto en los pocillos diseñados para los estándares como los diseñados para la muestra. Posteriormente, se añadieron 50  $\mu$ l de estándares o muestra en los pocillos apropiados, seguido de 25  $\mu$ l de la mezcla de bolas a cada pocillo. Una vez añadidos estos compuestos, las muestras fueron sometidas a incubación toda la noche a 4°C en agitación. El día siguiente, se aspiraron los pocillos y fueron lavados dos veces con 200  $\mu$ l de *Wash Buffer*, proceso tras el cual se añadieron 50  $\mu$ l de anticuerpo de detección a cada pocillo para posteriormente incubar durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras esta incubación, se añadieron 50  $\mu$ l del conjugado de estreptavidina-ficoeritrina por pocillo, con lo que se volvió a incubar de nuevo durante 30 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente, tras aspirar, los pocillos se lavaron dos veces más con 200  $\mu$ l de *Wash Buffer*, tras los cuales, se añadieron 100  $\mu$ l de *Sheath Fluid* a cada pocillo para leer en el Luminex 200™, cuyo software, a partir de las concentraciones de la curva patrón, interpola las concentraciones y de esta forma determina la concentración de las diferentes citocinas en pg/ml.

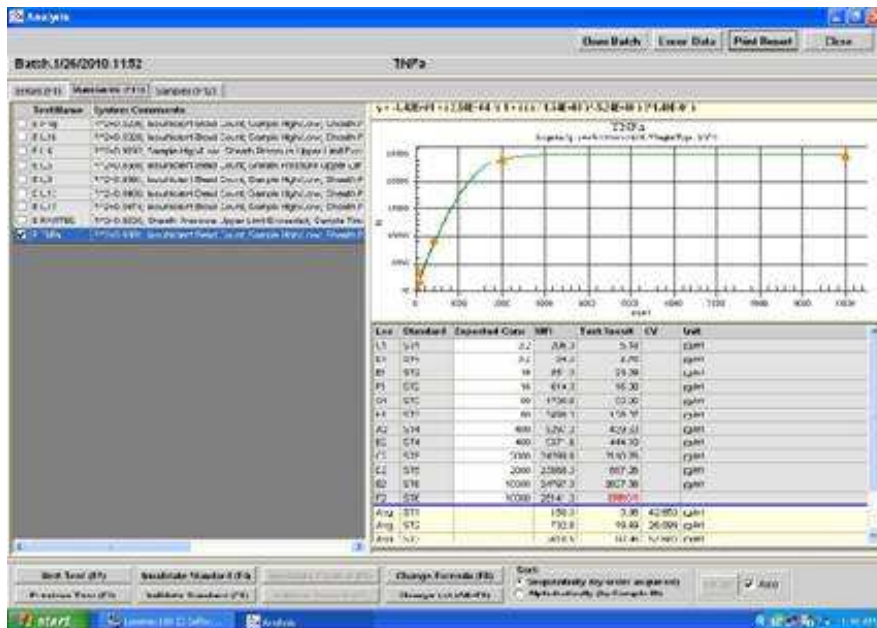


Figura 14. Representación de la intensidad de la fluorescencia frente a la concentración de TNF $\alpha$  de la curva patrón donde se interpolan las concentraciones de las muestras problema en sistema Luminex 200™.

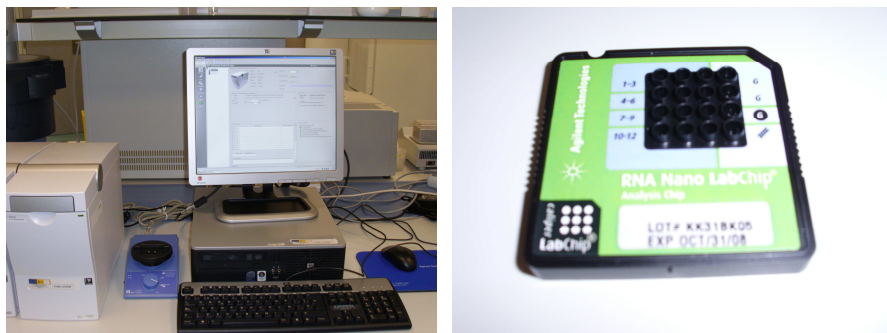
## 2.9. Análisis de la expresión génica. RT-PCR

### 2.9.1. Extracción de ARN total

Para la extracción del ARN total se escogió el reactivo *TriPure Isolation Reagent*, el cual es una solución monofásica de fenol y tiocianato de guanidina (Trizol), que permite separar ARN, ADN y proteínas. Tras eliminar el ALI tanto en la parte superior como inferior del cultivo de células epiteliales de bronquio humano y lavar el pocillo, se añadió dicho reactivo en una cantidad de 300  $\mu$ l sobre el mismo, con lo que las células se lisaron directamente.

Una vez lisadas se separaron las fases con cloroformo y se precipitó el ARN total de la muestra con isopropanol. A fin de facilitar dicha precipitación se añadió a la fase acuosa 1  $\mu$ l de glucógeno. Tras una centrifugación de 5 minutos a 7500 g, el ARN se resuspendió en 20  $\mu$ l de agua DEPC.

Tras resuspender el ARN extraído, se procedió a la determinación de integridad y concentración del mismo, utilizando un sistema electroforético capilar *2100 Bioanalyzer* (Agilent Technologies) y el *RNA 6000 LabChip® kit* (Agilent Technologies) siguiendo las instrucciones del fabricante.



**Figura 15. Sistema electroforético capilar *2100 Bioanalyzer* y *RNA 6000 LabChip®* utilizados para la determinación de integridad y cuantificación del ARN.**

Se añadió 1  $\mu$ l de muestra al *RNA 6000 LabChip®* y se obtuvo el electroferograma. Se calculó la concentración total de ARN y el ratio entre el área de los picos de ARN ribosómico 28S/18S. Los ratios comprendidos entre 1,5 y 2 indican un ARN íntegro.



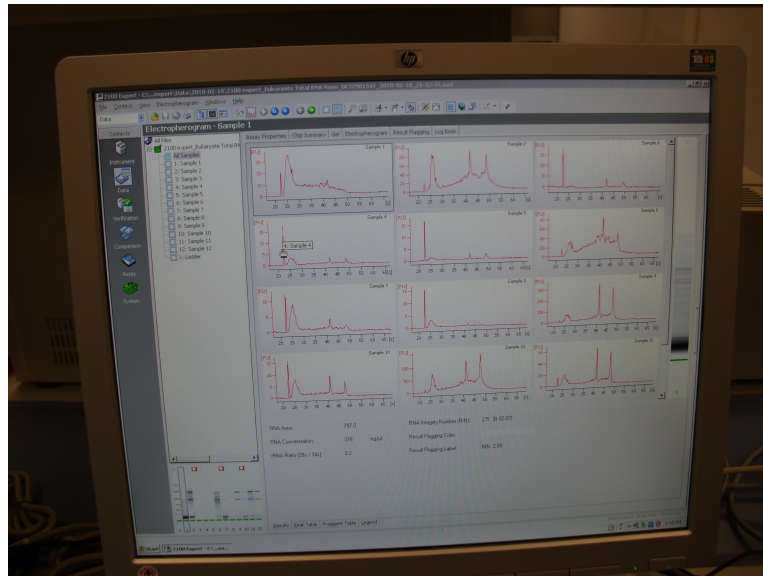


Figura 16. Electroferograma obtenido con el RNA 6000 LabChip® en el sistema 2100 Bioanalyzer.

## 2.9.2. RT-PCR

- *Transcripción inversa (RT)*

Consiste en la obtención de un ADN complementario (ADNc) a partir del ARN, por ello se denomina transcripción inversa. Se requieren en el proceso unas ADN polimerasas particulares, las transcriptasas inversas o retrotranscriptasas, utilizando en este caso particular la *MultiScribe™ Reverse Transcriptase* (Applied Biosystems). Para la síntesis de ADNc a partir de ARN se utilizó el *TaqMan® Reverse Transcription Reagents kit*, cuyos componentes se utilizan en la siguiente proporción:

<b>Componentes</b>	<b>Volumen (15 µl)</b>	<b>Concentración final</b>
Tampón de RT (10X)	1,5 µl	1X
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	3,3 µl	5,5 mM
<i>Random Hexamer</i>	0,75 µl	2,5 µM
Mezcla dNTP	3 µL	500 µM de cada dNTP
Inhibidor ARNasa	0,3 µL	0,4 U/µL
<i>MultiScribe Reverse Transcriptase (50 U/µL)</i>	0,375 µL	1,25 U/µL
ARN		0,3 µg
Agua DEPC- ARN	5,77 µL	

**Tabla 6. Composición de la reacción de retrotranscripción.**

El proceso de transcripción inversa se llevó a cabo en un termociclador *9800 Fast Thermal Cycler* (Applied Biosystems), con las siguientes condiciones experimentales: incubación de 25°C durante 10 minutos, seguida de un ciclo a 48°C durante 30 minutos. Finalmente la transcriptasa reversa fue inactivada mediante una incubación a 95°C durante 5 minutos.



**Figura 17. Termociclador 9800 Fast Thermal Cycler donde se llevó a cabo la retrotranscripción de ARN en ADNc.**

El ADNc sintetizado se guardó a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta la realización de la siguiente etapa.

- *RT-PCR a tiempo real*

La reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (RT-PCR) es actualmente el método más sensible y preciso en la detección de los niveles de ARNm. El método nos permite la detección directa del producto de amplificación durante la fase exponencial de la reacción, a través del empleo de compuestos con propiedades fluorescentes, de modo que determinando el incremento

de fluorescencia se puede determinar la cantidad de producto formado.

Se amplificaron de forma selectiva los *TaqMan*® assays (Applied Biosystems), que son secuencias específicas del ADNc, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la cual usa dos fragmentos cortos de ADN, denominados oligonucleótidos, como cebadores de la síntesis. Estos cebadores se unen específicamente a secuencias que flanquean la región a amplificar, cada uno en cada una de las cadenas del ADN. El proceso básico se desarrolla en tres pasos que se repiten sucesivas veces:

- 1. Desnaturalización:** separación de las cadenas complementarias de ADN.
- 2. Unión:** unión de los cebadores específicos a sus secuencias complementarias.
- 3. Extensión:** síntesis de la hebra complementaria a partir del cebador respectivo.

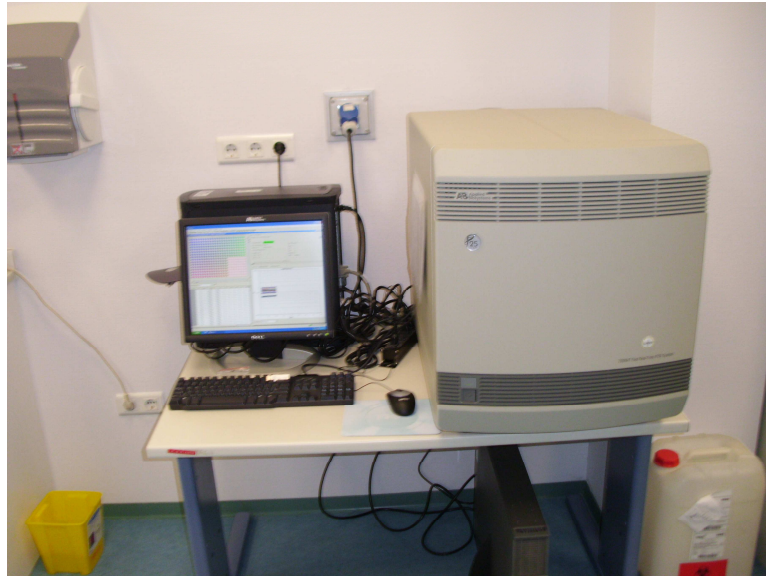
La repetición de este ciclo un determinado número de veces produce un aumento exponencial de la cantidad de la región diana del ADN, que viene dado por la expresión  $2^n$  (siendo n el número de ciclos), hasta que se llega a un punto en que disminuye la eficiencia de la enzima y la reacción deja de ser exponencial.

La composición para cada reacción del PCR fue la siguiente:

<b>Componentes</b>	<b>Volumen ( 10 <math>\mu</math>l)</b>	<b>Concentración Final</b>
<i>FluoCycle™ II, Mix for probe RT-PCR</i> (2X)	5 $\mu$ l	1X
<i>TaqMan Gene Expression Assays</i> (20X)	0,5 $\mu$ l	1X
ADNc	1 $\mu$ l	
Agua DEPC	3,5 $\mu$ l	

**Tabla 7. Composición de la reacción de RT-PCR.**

Una vez preparadas las mezclas se introdujeron en el termociclador *ABI Prism 7900 Sequence Detection System®* (Applied Biosystems) siguiendo las siguientes condiciones de amplificación: 1 ciclo a 95° C de 10 minutos, y 40 ciclos a 95° C de 15 segundos seguidos de 60° C durante 1 minuto.



**Figura 18. Termociclador ABI Prism 7900 Sequence Detection System®, donde se llevaron a cabo las diferentes reacciones de RT-PCR**

En este termociclador se realiza tanto la amplificación como la detección del producto amplificado, ya que el sistema incorpora un lector de fluorescencia y está diseñado para poder medir, en cualquier momento la fluorescencia emitida en cada uno de los pocillos donde se realiza la amplificación. En el presente trabajo, el sistema de detección por fluorescencia empleado en la PCR a tiempo real utilizó cebadores y sondas específicas marcadas con fluorocromos diseñados de manera especial *Assays-on-Demand Gene Expression probes* (Applied Biosystems), las cuales están enumeradas en detalle en el apartado de Material.

Las sondas son oligonucleótidos marcados con un fluorocromo donante en 5' que emite fluorescencia al ser excitado y

un aceptor en el extremo 3' que absorbe la fluorescencia liberada por el donante. Para que esto ocurra, las moléculas donante y aceptora deben estar especialmente próximas. Además, el espectro de emisión de la primera se ha de solapar con el espectro de absorción de la segunda. Mientras la sonda está intacta, la fluorescencia emitida por el donante es absorbida por el aceptor. Sin embargo, durante la amplificación del ADN diana, la sonda hibrida con su cadena complementaria. Al desplazarse a lo largo de la cadena, en su acción de síntesis, la ADN polimerasa, mediante su actividad 5' exonucleasa, hidroliza el extremo libre 5' de la sonda, produciéndose la liberación del fluorocromo donante [169]. Como donante y aceptor están ahora alejados, la fluorescencia emitida por el primero es captada por el lector. Este proceso ocurre en cada ciclo y no interfiere con la acumulación exponencial del producto de amplificación.

Se tomó como control interno al ARN de la proteína gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenada (GAPDH), o bien el de la  $\beta$ -actina (ACTB) dado que estos ARN se expresan de forma constante en muchos tejidos en diferentes condiciones fisiológicas y fisiopatológicas.

El programa informático construye las curvas de amplificación a partir de los datos de emisión de fluorescencia recogidos durante la reacción en tiempo real. De este modo, al final obtenemos una representación en la que el eje de ordenadas es el logaritmo de la intensidad de la fluorescencia y el eje de abscisas es el número de ciclos transcurridos.

El parámetro de medida de la expresión de un determinado gen es el ciclo que alcanza el nivel prefijado de fluorescencia. Este ciclo se denomina ciclo umbral (*threshold cycle, Ct*), a partir del cual la intensidad de fluorescencia empieza a ser apreciable. De este modo, los valores del ciclo umbral decrecerán linealmente conforme aumenta la cantidad de ADNc de partida. Cuantas más copias de ARNm de partida del gen estudiado, más ADNc se obtendrá en la transcripción inversa, y antes comenzará la amplificación a ser exponencial.

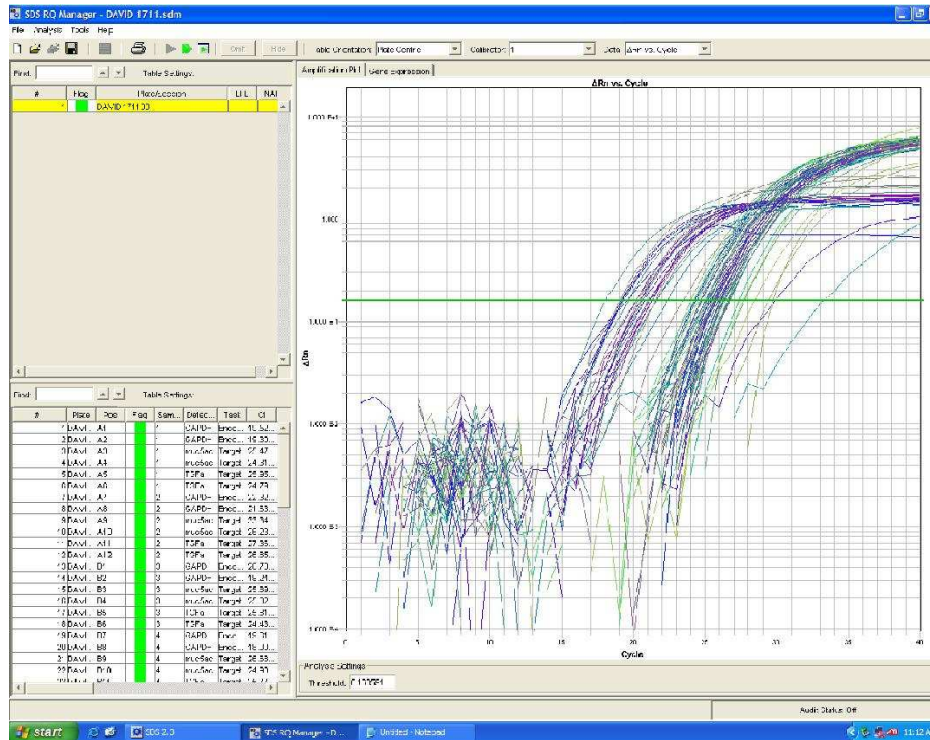


Figura 19. Representación del logaritmo de la intensidad de la fluorescencia frente al número de ciclos transcurridos con el ciclo umbral prefijado en el termociclador *ABI Prism 7900 Sequence Detection System*®.



Un método para determinar la expresión a partir de las curvas de amplificación obtenidas consiste en la comparación de  $C_t$ . La expresión de los genes estudiados, se normalizó con respecto a la expresión del gen de referencia.

- *Electroforesis en gel de agarosa*

Para la caracterización de las isoenzimas de gp91phox, a partir de la RT-PCR realizada en el termociclador ABI Prism 7900 Sequence Detection System®, se dejó correr el producto amplificado en un gel de agarosa al 2,5%, a un voltaje constante de 90 V, utilizando como marcador de pesos moleculares el PCR 100 pb low ladder.

## 2.10. Cálculos y análisis estadísticos

La cuantificación relativa del gen problema por RT-PCR se realizó utilizando el método de comparación de  $C_t$  [170].

La ecuación que permite la cuantificación por este método viene dada por  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  donde:

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_{t1} - \Delta C_{t2}$$

siendo:

$\Delta C_{t1} = (C_t \text{ gen problema} - C_t \text{ gen referencia})$  de la muestra 1

$\Delta C_{t\ 2} = (C_t \text{ gen problema} - C_t \text{ gen referencia})$  de la muestra 2

Para que la determinación a través de esta fórmula aritmética sea válida, debe cumplirse que la eficiencia de la reacción para el gen problema y para el gen de referencia sea aproximadamente igual. En los *TaqMan assays* utilizados en los experimentos, el proveedor de los mismos, Applied Biosystems, garantiza que la eficiencia en las reacciones es de 1.

Cada muestra se estudió por duplicado y aplicamos la ecuación de comparación de  $C_t$  mencionada anteriormente para el cálculo de la diferencia de expresión génica entre el grupo control y los grupos tratados. El grupo control toma el valor de  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  como 1.

Los datos han sido expresados como media  $\pm$  desviación estándar de n experimentos. El análisis de los datos obtenidos en las distintas condiciones se llevó a cabo mediante un análisis de la varianza [171], seguido del test de Bonferroni. Las diferencias entre grupos fueron estimadas mediante el test de la t de *Student*. En todos los casos se consideraron las diferencias significativas cuando el valor de  $P < 0,05$ .

El programa informático utilizado en el cálculo, gráficos y estadística ha sido GraphPad Prism versión 5.0 para Windows (GraphPad Software Inc., San Diego, CA).

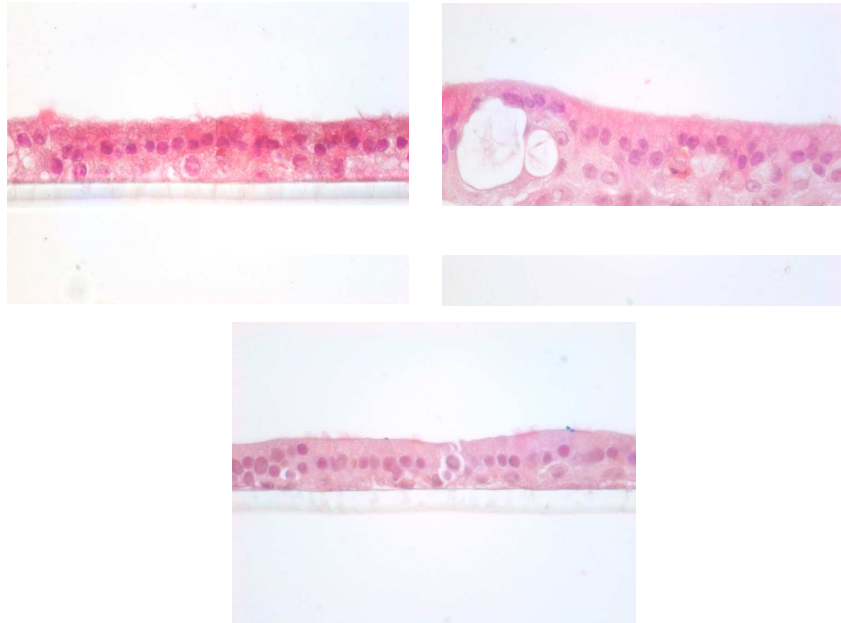
## **IV. RESULTADOS**



## **1. Caracterización del cultivo celular**

El primer objetivo planteado fue la caracterización del cultivo celular. Las células fueron sembradas sobre el insert, utilizando para su cultivo medio ALI. Tras alcanzar la confluencia se estableció la interfase aire-líquido eliminando el medio de la cámara superior.

Entre los 7 y 14 días de diferenciación las células caliciformes empezaron a secretar moco, y pocos días después aparecieron las células ciliadas. Entre los días 17 y 21 de diferenciación aparecieron los cilios, y unos días después, cuando la actividad ciliar registrada en un microscopio óptico era de alrededor del 90%, se empezaron a desarrollar los diferentes experimentos.



**Figura 20. Cortes histológicos de un insert. Tinción con hematoxilina-eosina.** En ellos se puede ver la disposición que adoptan las células epiteliales en el insert, simulando las condiciones fisiológicas.

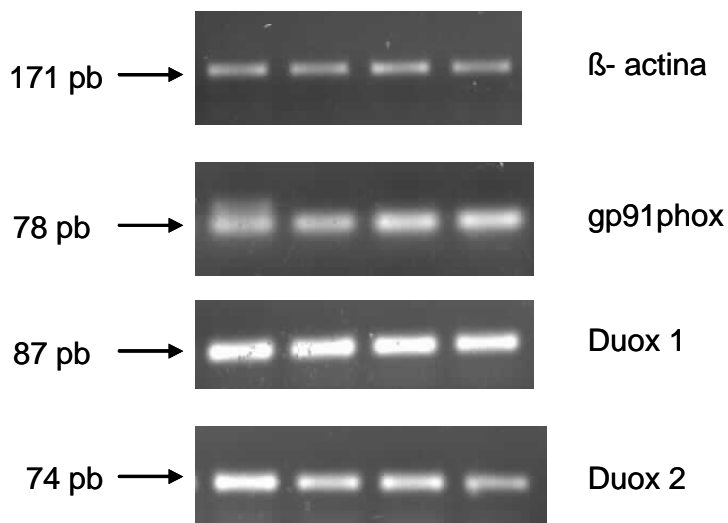
## **2. Sistema NADPH oxidasa y CSE**

### **2.1. Caracterización de las isoenzimas gp91phox**

Una vez caracterizado el cultivo, el siguiente objetivo propuesto fue estudiar qué isoenzimas de gp91phox estaban

presentes en el mismo. De todas las isoenzimas descritas [77, 80], se compararon las oxidasas duales, cuya presencia es la predominante en vías aéreas [83, 84]. También se decidió estudiar la subunidad gp91phox.

Para ello, se estudió la expresión relativa de células epiteliales de bronquio humano en ALI sin ningún tipo de estímulo, y posteriormente se visualizó la amplificación corriendo los productos amplificados en un gel de agarosa al 2,5 %. La Figura 21 muestra los resultados de expresión relativa de GP91PHOX, DUOX1 y DUOX2.



**Figura 21. RT-PCR de las subunidades NADPH oxidasa gp91phox y las oxidasas duales, Duox 1 y Duox 2 en células epiteliales de bronquio humano cultivado en ALI.** Se detectó la secuencia correspondiente a DUOX 1, la cual presentaba una expresión ligeramente más marcada que la secuencia correspondiente a DUOX 2. Dichas subunidades presentaban una expresión marcadamente superior a la expresión de la secuencia correspondiente a la subunidad gp91phox. El control de la reacción fue llevado a cabo mediante el uso del assay correspondiente al gen de la  $\beta$ -actina. La RT-PCR del ADNc se llevó a cabo usando los TaqMan Assays descritos en el apartado de material y métodos, utilizando cuatro controles de células epiteliales de bronquio humano en ALI.

En la figura anterior, se observa que los resultados obtenidos mediante real time PCR para los genes de las isoenzimas de gp91phox muestran una ligera diferencia en la expresión del gen DUOX1 con respecto a DUOX2, mientras que la expresión de GP91PHOX con respecto a las oxidasas duales es bastante menor.

## **2.2. Modificación de la expresión del sistema NADPH oxidasa**

Una vez caracterizada la expresión génica de las isoenzimas gp91phox, se planteó el estudiar si la expresión de las mismas se modificaba en presencia de estímulos y/o fármacos.

Para ello, las células epiteliales de bronquio humano en ALI se estimularon con extracto de humo de tabaco al 10%, durante 6 y/o 24 horas, tras las cuales, se procedió a lisar el cultivo para posteriormente extraer el ARN total y así poder ver la expresión relativa de las células tratadas con respecto al control. La Tabla 8 muestra los resultados de la cinética de la expresión relativa de estas isoenzimas con respecto a la isoforma DUOX1, que presenta mayor expresión.



CONDICIONES	$2^{-\Delta\Delta C_t}$		
	DUOX1	DUOX2	GP91PHOX
<b>CONTROL</b>	1,024 ± 0,129	0,062 ± 0,016	0,0008 ± 0,0001
<b>CSE 10% 6H</b>	1,046 ± 0,222	0,070 ± 0,029	0,0000 ± 0,0000
<b>CSE 10% 24H</b>	1,174 ± 0,313	0,077 ± 0,008	0,0000 ± 0,0000

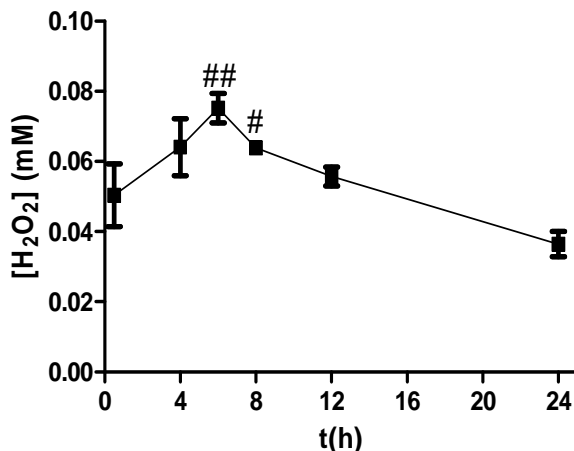
**Tabla 8. Cuantificación relativa de los niveles de ARNm de DUOX1, DUOX2, y GP91PHOX, relativos a los niveles de DUOX1 en cultivo de células epiteliales de bronquio humano no estimuladas (control) o estimuladas con extracto de humo de tabaco (CSE; 10%, 6 y 24 horas de incubación)** No se observó modificación en la expresión a lo largo del tiempo de DUOX1, DUOX2 y GP91PHOX al estimular el cultivo con CSE 10%. El ARNm de estos genes se determinó mediante RT-PCR por el método del  $\Delta\Delta C_t$  con respecto a los niveles de expresión de DUOX1.

Se observó que las isoenzimas de gp91phox no muestran una diferencia de expresión significativa en las distintas condiciones estudiadas.

### **2.3. Modificación de la actividad del sistema NADPH oxidasa**

Con el objetivo de ver si el extracto de humo de tabaco modificaba la actividad del sistema NADPH oxidasa, con la consiguiente liberación de  $H_2O_2$ , se estimularon células epiteliales de bronquio humano en ALI con o sin extracto de humo de tabaco al 10%, durante 0,5, 4, 6, 8, 12 y 24 horas, tras las cuales, se eliminó el sobrenadante de la parte apical del insert para valorar el contenido en  $H_2O_2$  en cada muestra utilizando el método del *Amplex® Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay Kit*, tal y como está descrito en

el apartado de Material y Métodos. La Figura 22 muestra los resultados de la cinética de producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

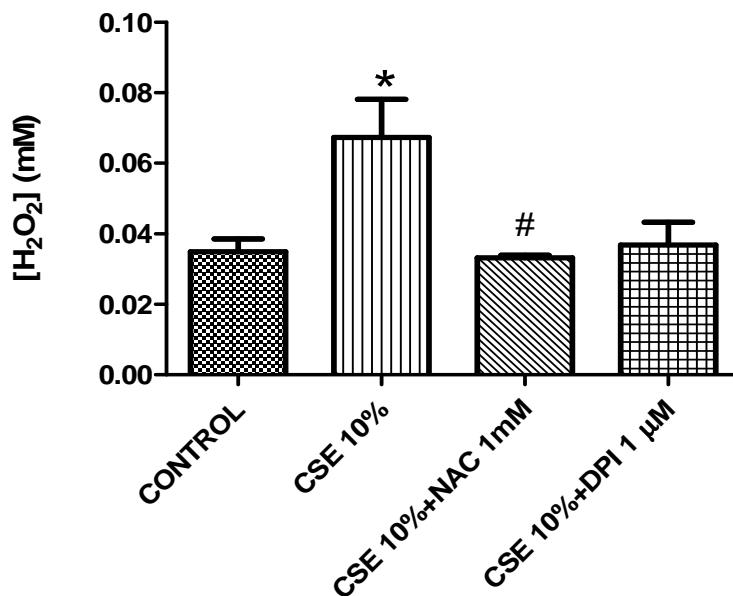


**Figura 22. Cinética de la cuantificación de los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en cultivos de células epiteliales de bronquio humano no estimuladas (control) o estimuladas con extracto de humo de tabaco (CSE 10%; 0,5, 4, 6, 8, 12 y 24 horas de incubación).** El CSE aumentaba la liberación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, llegando a su punto máximo en las 6 horas, momento en el cual empezó a decrecer. Los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se determinaron mediante el *Amplex® Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay Kit*; los puntos muestran la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> liberada como la media ± desviación estándar de los valores de [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] de tres experimentos diferentes. # p<0,05 versus t=24h, ## p<0,01 versus t=24h.

En el gráfico anterior, se puede observar que los resultados obtenidos en la cuantificación de la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aumentan al añadir el estímulo (CSE 10%) hasta alcanzar valores máximos de expresión a las 6 horas siguientes al estímulo.

A la vista de los resultados, se decidió estudiar si el DPI, un inhibidor de la NADPH oxidasa, implicada en la síntesis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,

disminuía el aumento de liberación de la misma, además de estudiar el efecto de un antioxidante, NAC, en la actividad de la NADPH oxidasa y su consiguiente producción de  $H_2O_2$ , para lo que se estimularon células epiteliales de bronquio humano en ALI con extracto de humo de tabaco al 10%, en presencia o ausencia de NAC 1 mM y DPI  $10^{-6}$  M, durante 6 horas, tras las cuales, se eliminaron los sobrenadantes de la parte apical y se midió el contenido en  $H_2O_2$  en cada muestra utilizando el método del *Amplex® Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay Kit*. La Figura 23 muestra los resultados de liberación de  $H_2O_2$ .



**Figura 23.** Cuantificación de los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en cultivo de células epiteliales de bronquio humano no estimuladas (control) o estimuladas con extracto de humo de tabaco (CSE 10%; 6 horas de incubación) en ausencia o presencia de NAC 1 mM o DPI 10<sup>-6</sup> M. El incremento de la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inducido por CSE 10% disminuyó al preincubar 30 minutos previamente con el antioxidante NAC 1 mM y el inhibidor de la NADPH oxidasa DPI 10<sup>-6</sup> M. Los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se determinaron mediante el *Amplex® Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay Kit*; las columnas muestran la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> liberada al medio como la media ± desviación estándar de los valores de [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] de tres experimentos diferentes. \* p<0,05 versus control; # p<0,05 versus CSE 10%.

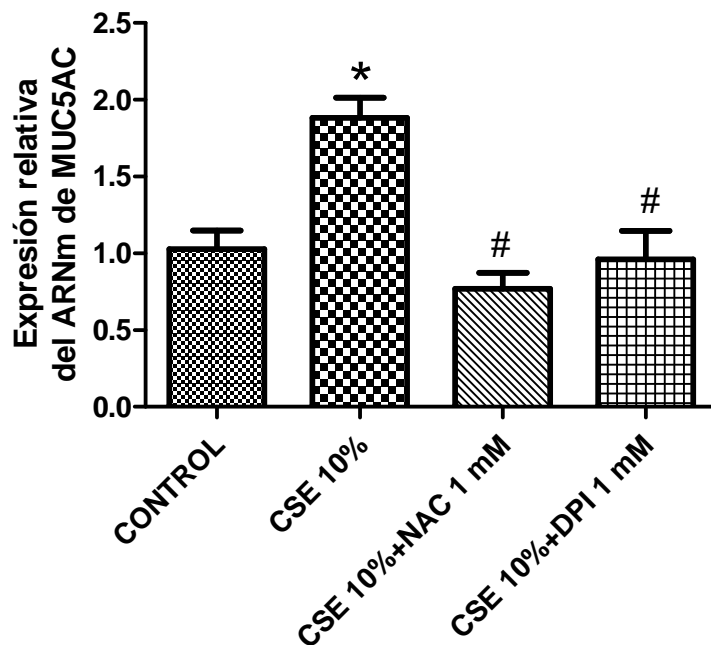
En la Figura 23 podemos observar que los resultados obtenidos en la cuantificación de los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> liberados al medio muestran que tanto NAC 1 mM como DPI 10<sup>-6</sup> M producen una inhibición del incremento de la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al tratar estas células con CSE 10%.

### **3. Efecto de la activación del sistema NADPH oxidasa**

#### **3.1. Expresión génica de mucinas**

A continuación, se planteó estudiar si el extracto de humo de tabaco conllevaba en último término la expresión génica de mucinas, para lo que se decidió estudiar dicha expresión en el gen MUC5AC, que codifica la mucina mayoritaria presente en vías aéreas humanas, y los efectos farmacológicos que producía sobre esta expresión NAC como antioxidante. Para comprobar si el sistema NADPH oxidasa intervenía en la producción de mucinas inducido por CSE, se estudiaron los efectos del inhibidor de la NADPH oxidasa DPI sobre dicha expresión.

Con este objetivo, se estimularon células epiteliales de bronquio humano en ALI con extracto de humo de tabaco al 10%, en presencia o ausencia de NAC 1 mM y DPI  $10^{-6}$  M, durante 6 horas, tras las cuales, se procedió a lisar el cultivo para posteriormente extraer el ARN total y así poder ver la expresión relativa de las células tratadas con respecto al control. La Figura 24 muestra los resultados de expresión relativa del ARNm de MUC5AC en las diferentes condiciones frente al grupo control.

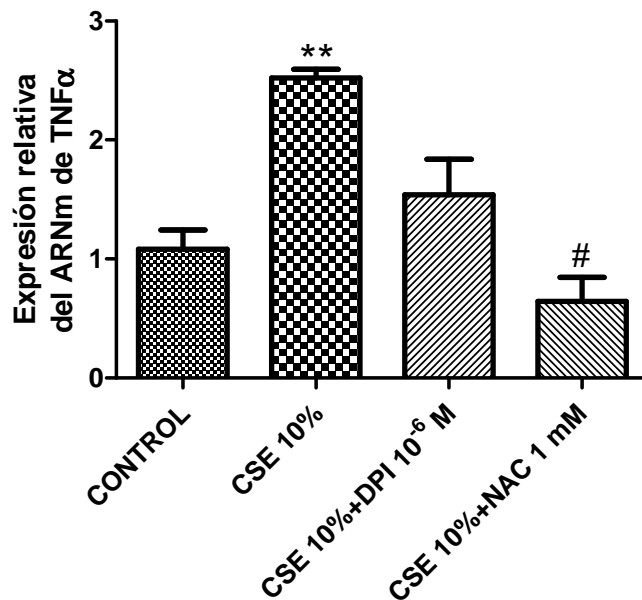


**Figura 24. Cuantificación relativa de los niveles de ARNm de MUC5AC en cultivo de células epiteliales de bronquio humano no estimuladas (control) o estimuladas con extracto de humo de tabaco (CSE;10%, 6 horas de incubación) en ausencia o en presencia de NAC 1 mM y DPI  $10^{-6}$  M. El incremento de expresión de MUC5AC inducido por CSE 10 %, disminuyó significativamente al preincubar 30 minutos con el antioxidante NAC 1 mM y con el inhibidor de la NADPH oxidasa DPI  $10^{-6}$  M . El ARNm de estos genes se determinó mediante RT-PCR por el método del  $\Delta\Delta C_t$ ; las columnas muestran el incremento en la expresión de MUC5AC relativo a los valores de GAPDH como la media  $\pm$  desviación estándar de los valores de  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  de tres experimentos diferentes. \*  $p < 0,05$  versus control; #  $p < 0,05$  versus CSE 10%.**

En la Figura 24 se puede observar que los resultados obtenidos en la cuantificación relativa de los niveles de ARNm de MUC5AC frente al control muestran que tanto NAC 1 mM como DPI  $10^{-6}$  M producen una inhibición significativa del aumento de expresión de MUC5AC inducido por CSE al 10%.

### **3.2. Expresión génica y proteica de TNF $\alpha$**

También se planteó estudiar si el tabaco inducía la expresión, tanto a nivel génico como proteico, del factor de necrosis tumoral (TNF)  $\alpha$ , mediador inflamatorio, para lo que el cultivo de células epiteliales de bronquio humano en ALI se estimuló con extracto de humo de tabaco al 10%, en presencia o ausencia del inhibidor de la NADPH oxidasa DPI  $10^{-6}$  M, y el antioxidante NAC 1 mM, durante 6 horas, tras las cuales, se retiró el sobrenadante de la parte apical para determinar la cantidad liberada al medio de TNF $\alpha$ , y posteriormente se lisó el cultivo para extraer el ARN total y así estudiar la expresión relativa de este factor en las células tratadas con respecto al control. La Figura 25 muestra los resultados de expresión relativa del ARNm de TNF $\alpha$  en las diferentes condiciones frente al grupo control.

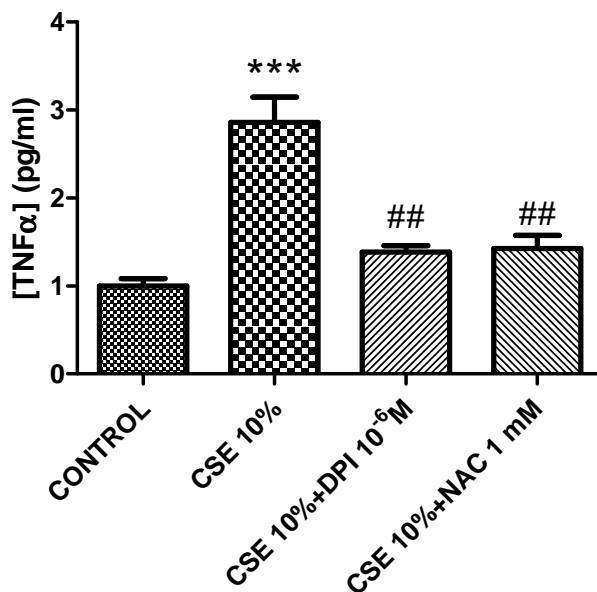


**Figura 25.** Cuantificación relativa de los niveles de ARNm de TNFα en cultivo de células epiteliales de bronquio humano no estimuladas (control) o estimuladas con extracto de humo de tabaco (CSE; 10%, 6 horas de incubación) en ausencia o en presencia de NAC 1 mM y DPI 10<sup>-6</sup> M. El incremento de expresión de TNFα inducido por CSE 10 % mostró una tendencia a disminuir al preincubar 30 minutos con el inhibidor de la NADPH oxidasa DPI 10<sup>-6</sup> M, siendo esta inhibición significativa con el antioxidante NAC 1 mM. El ARNm de estos genes se determinó mediante RT-PCR por el método del  $\Delta\Delta C_t$ ; las columnas muestran el incremento en la expresión de TNFα relativo a los valores de GAPDH como la media  $\pm$  desviación estándar de los valores de  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  de tres experimentos diferentes. \*\*  $p < 0,01$  versus control; #  $p < 0,05$  vs células tratadas con CSE 10%.

En la Figura 25 se observa que los resultados obtenidos mediante real time RT-PCR para el gen TNFα muestran NAC, a la dosis de 1 mM y DPI, a la dosis de 10<sup>-6</sup> M, producen una inhibición (en el caso de este último significativa) del incremento de la expresión de TNFα al tratar estas células con CSE 10%.



En paralelo a estos experimentos, se determinó la cantidad de TNF $\alpha$  liberado al medio en respuesta al CSE, bajo las mismas condiciones. A partir de los sobrenadantes retirados de la parte apical del cultivo de células epiteliales de bronquio humano, se valoró en los mismos el contenido en TNF $\alpha$  liberado mediante el sistema *High Sensitivity Human Cytokine Milliplex™ MAP Kit*, tal y como queda descrito en el apartado de Material y Métodos. En la Figura 26 se puede ver la cantidad de TNF $\alpha$  liberada al medio bajo las diferentes condiciones.



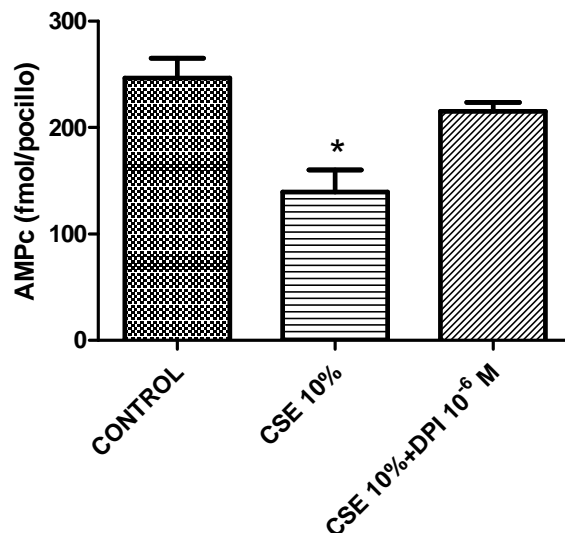
**Figura 26.** Cuantificación de los niveles de TNF $\alpha$  en cultivo de células epiteliales de bronquio humano no estimuladas (control) o estimuladas con extracto de humo de tabaco (CSE 10%; 6 horas de incubación) en ausencia o presencia de NAC 1 mM o DPI 10<sup>-6</sup> M con respecto al grupo control. El incremento de la concentración de TNF $\alpha$  inducido por CSE 10% disminuyó al preincubar 30 minutos previamente con el antioxidante NAC 1 mM y el inhibidor de la NADPH oxidasa DPI 10<sup>-6</sup> M. Los niveles de TNF $\alpha$  se determinaron mediante el *High Sensitivity Human Cytokine Milliplex™ MAP Kit*; las columnas muestran el incremento en la concentración de TNF $\alpha$  relativa a los valores del control como la media  $\pm$  desviación estándar de los valores de [TNF $\alpha$ ] de tres experimentos diferentes. \*\*\* p<0,001 versus control; ## p<0,01 versus CSE 10%.

En la figura anterior se observa que los resultados obtenidos en la cuantificación de los niveles de TNF $\alpha$  liberados muestran que tanto NAC, a la dosis de 1 mM y DPI, a la dosis de 10<sup>-6</sup> M, producen una inhibición significativa del incremento de liberación de TNF $\alpha$  al tratar estas células con CSE 10%.

## 4. Modulación del AMPc

### 4.1. Valoración de los niveles de AMPc

Con el objetivo de estudiar el papel del AMPc en respuesta al extracto de humo de tabaco, se estimularon las células epiteliales de bronquio humano en ALI, previamente incubadas o no con DPI a la dosis de  $10^{-6}$ M, con extracto de humo de tabaco al 10%, durante 6 horas, tras las cuales, se determinó la cantidad de AMPc mediante el *Amersham cAMP Biotrak Enzymeimmunoassay (EIA)* system, siguiendo las instrucciones del fabricante. La Figura 27 muestra la cantidad de AMPc en los diferentes grupos estudiados.



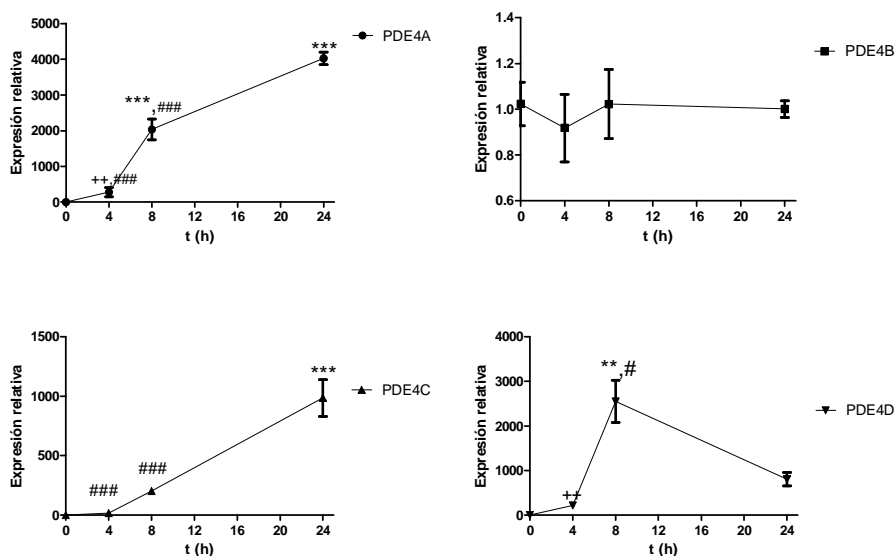
**Figura 27.** Cuantificación de los niveles de AMPc en cultivo de células epiteliales de bronquio humano no estimuladas (control) o estimuladas con extracto de humo de tabaco (CSE 10%; 6 horas de incubación) en ausencia o presencia de DPI 10<sup>-6</sup> M. Se produjo una inhibición de la disminución de los niveles de AMPc inducida a CSE 10%. Los niveles de AMPc intracelulares se determinaron mediante el *Amersham cAMP Biotrak Enzymeimmunoassay (EIA)* system; las columnas muestran la concentración intracelular de AMPc como la media  $\pm$  desviación estándar de los valores de [AMPc] de tres experimentos diferentes. \*  $p < 0.05$  vs células del grupo control.

En el gráfico anterior, se puede observar que los niveles de AMPc disminuyen en presencia del estímulo (CSE 10%), y se aprecia una tendencia en la inhibición de dicho efecto debida al inhibidor no específico de la NADPH oxidasa DPI.

#### 4.2. Expresión génica de las PDE4

En paralelo a las determinaciones de AMPc, se planteó el seguimiento de una cinética de la expresión de las isoformas PDE4A,

PDE4B, PDE4C y PDE4D durante 24 horas. Para ello, se estimularon células epiteliales de bronquio humano en ALI con extracto de humo de tabaco al 10%, durante 4, 8 y 24 horas, tras las cuales, se procedió a lisar el cultivo para posteriormente extraer el ARN total y así poder ver la expresión relativa de las células tratadas con respecto al control. La Figura 28 muestra los resultados de la cinética de la expresión relativa de estas isoformas en el grupo tratado con CSE y con respecto a la isoforma PDE4B, que posee menor expresión que las demás isoformas.

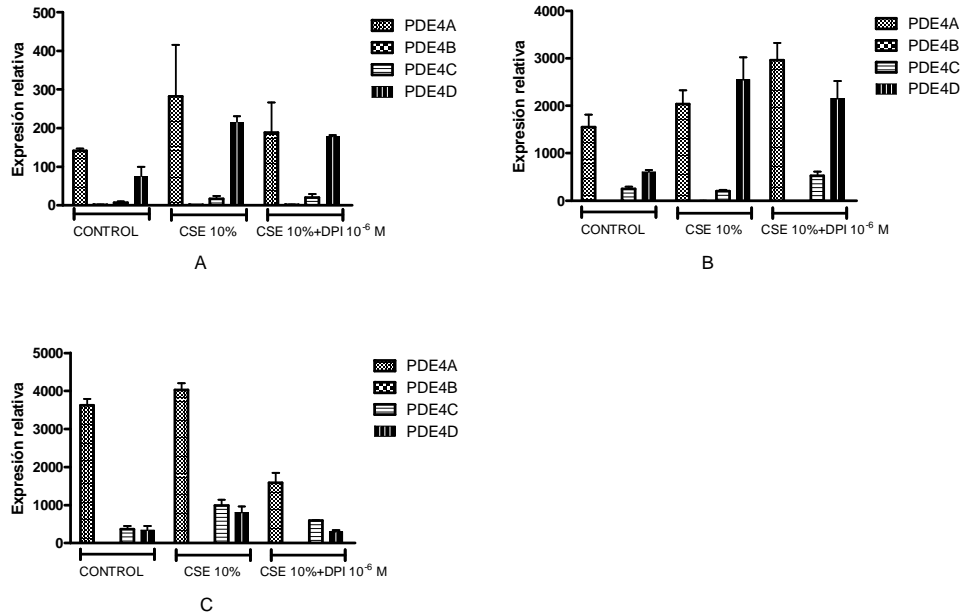


**Figura 28. Cinética de la cuantificación relativa de los niveles de ARNm de PDE4A, PDE4B, PDE4C y PDE4D en cultivo de células epiteliales de bronquio humano estimuladas con extracto de humo de tabaco (CSE 10%; 4, 8 y 24 horas de incubación) con respecto al grupo control.** La expresión relativa de PDE4A alcanza un punto de inflexión en su aumento entre 4 y 8 horas, momento en el cual sigue aumentando pero a menor velocidad. La expresión relativa de PDE4B se mantiene constante a lo largo del tiempo. La expresión relativa de PDE4C se mantiene constante entre 0 y 4 horas, momento en el cual empieza a aumentar ligeramente. La expresión relativa de PDE4D alcanza su valor máximo entre 4 y 8 horas, para posteriormente ir decreciendo. El ARNm de PDE4A, PDE4B, PDE4C y PDE4D se determinó mediante RT-PCR por el método del  $\Delta\Delta C_t$ ; los puntos muestran el incremento en la expresión de los distintos genes relativa a los valores de PDE4B como la media  $\pm$  desviación estándar de los valores de  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  de tres experimentos diferentes. \*\* $p < 0,01$  vs  $t=0h$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  vs  $t=0h$ ; ++ $p < 0,01$  vs  $t=8 h$ ; # $p < 0,05$  vs  $t=24h$ ; ### $p < 0,001$  vs  $t=24 h$ .

En la figura anterior se observa que con respecto a la expresión relativa de la isoenzima PDE4B, el aumento de la expresión relativa de la isoenzima PDE4A alcanza un punto de inflexión entre 4 y 8 horas, momento en el cual sigue aumentando pero a menor velocidad. La expresión relativa de la isoenzima PDE4C con respecto a PDE4B se mantiene constante hasta las 4 horas, donde empieza a

aumentar ligeramente. Finalmente, el aumento de la expresión relativa de PDE4D con respecto a PDE4B alcanza su valor máximo entre 4 y 8 horas, momento en el que empieza a decrecer la misma.

Además, con el fin de estudiar si el inhibidor de la NADPH oxidasa DPI disminuía el aumento de expresión génica de las PDE4, las células epiteliales de bronquio humano en ALI se estimularon con extracto de humo de tabaco al 10%, en presencia o ausencia del inhibidor de la NADPH oxidasa DPI  $10^{-6}$  M durante 4, 8 y 24 horas, tras las cuales, se procedió a lisar el cultivo para posteriormente extraer el ARN total y así poder ver la expresión relativa de las diferentes isoenzimas de la PDE4 (PDE4A, PDE4B, PDE4C y PDE4D) de las células tratadas con respecto al control. La Figura 29 muestra los resultados de expresión relativa de dichas isoenzimas con respecto a PDE4B, isoforma que presenta menor expresión génica.



**Figura 29. Cuantificación relativa de los niveles de ARNm de PDE4A, PDE4B, PDE4C y PDE4D, relativos a los niveles de PDE4B en cultivo de células epiteliales de bronquio humano no estimuladas (control) o estimuladas con extracto de humo de tabaco (CSE; 10%, 4, 8 y 24 horas de incubación) en ausencia o en presencia de DPI 10<sup>-6</sup> M. A. Cuantificación relativa de los niveles de ARNm de las isoenzimas de PDE4 a las 4 horas del estímulo. El incremento de expresión de PDE4A y PDE4D inducido por CSE 10% disminuyó al preincubar 30 minutos previamente con el inhibidor de la NADPH oxidasa DPI 10<sup>-6</sup> M. Los valores de expresión génica de PDE4C se mantuvieron prácticamente constantes en las diferentes condiciones. B. Cuantificación relativa de los niveles de ARNm de las isoenzimas de PDE4 a las 8 horas del estímulo. El incremento de expresión de PDE4A, PDE4C y PDE4D inducido por CSE 10% no disminuyó al preincubar 30 minutos previamente con el inhibidor de la NADPH oxidasa DPI 10<sup>-6</sup> M. C. Cuantificación relativa de los niveles de ARNm de las isoenzimas de PDE4 a las 24 horas del estímulo. El incremento de expresión de PDE4A, PDE4C y PDE4D inducido por CSE 10% disminuyó al preincubar 30 minutos previamente con el inhibidor de la NADPH oxidasa DPI 10<sup>-6</sup> M. El ARNm de estos genes se determinó mediante RT-PCR por el método del  $\Delta\Delta C_t$ ; las columnas muestran el incremento en la expresión de PDE4A, PDE4B, PDE4C y PDE4D relativo a los valores de PDE4B como la media  $\pm$  desviación estándar de los valores de  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  de tres experimentos diferentes.**

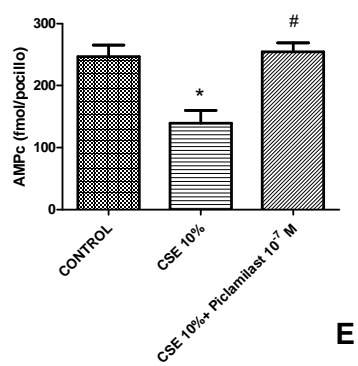
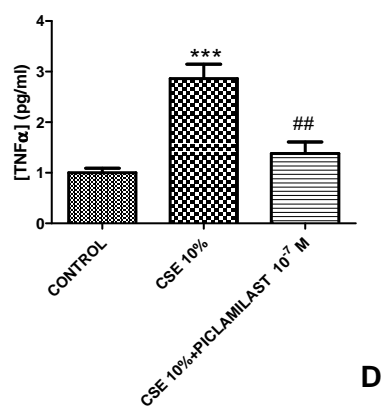
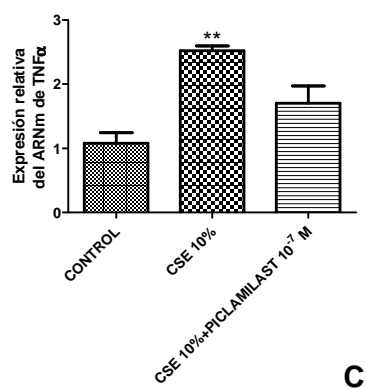
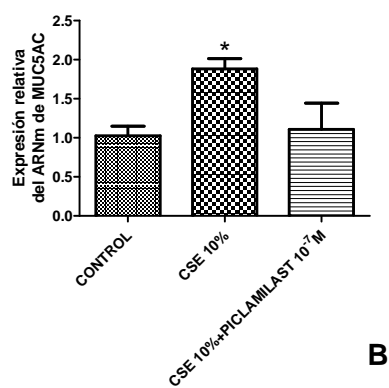
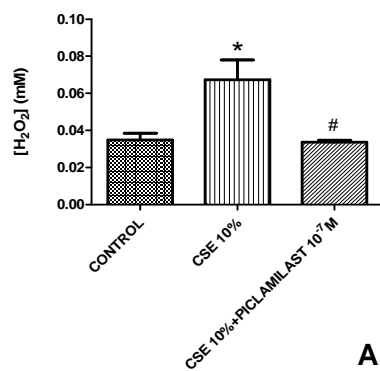
En la figura anterior se observa que con respecto a la expresión relativa de la isoenzima PDE4B, a las 4 horas de



incubación, el incremento de expresión de PDE4A y PDE4D inducido por CSE 10% disminuyó al preincubar 30 minutos con el inhibidor de la NADPH oxidasa DPI  $10^{-6}$  M, mientras que los valores de expresión génica de PDE4C se mantuvieron prácticamente constantes en las diferentes condiciones. Tras 8 horas de incubación, el incremento de expresión de PDE4A, PDE4C y PDE4D inducido por CSE 10% no disminuyó al preincubar 30 minutos con el inhibidor de la NADPH oxidasa DPI  $10^{-6}$  M. Finalmente, tras 24 horas de incubación, el incremento de expresión de PDE4A, PDE4C y PDE4D inducido por CSE 10% disminuyó al preincubar 30 minutos con el inhibidor de la NADPH oxidasa DPI  $10^{-6}$  M.

### **4.3. Efectos del piclamilast**

Visto el papel del AMPc y las PDE4 al estimular las células con extracto de humo de tabaco, se decidió estudiar el papel que tenía un inhibidor de PDE4, piclamilast, a la dosis de  $10^{-7}$  M, con respecto a la activación del sistema NADPH oxidasa, expresión génica de mucinas, liberación de TNF $\alpha$  como mediador de inflamación, y modificación de los valores de AMPc a nivel intracelular. La Figura 30 muestra estos parámetros con respuesta al piclamilast.



**Figura 30. Efectos del piclamilast en cultivo de células epiteliales de bronquio humano estimuladas con extracto de humo de tabaco (CSE).**

**A. Cuantificación de los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en cultivo de células epiteliales de bronquio humano no estimuladas (control) o estimuladas con extracto de humo de tabaco (CSE 10%; 6 horas de incubación) en ausencia o presencia de piclamilast 10<sup>-7</sup> M.** El incremento de la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inducido por CSE 10% disminuyó al preincubar 30 minutos previamente con el inhibidor de la PDE4 piclamilast 10<sup>-7</sup> M. Los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se determinaron mediante el *Amplex® Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay Kit*; las columnas muestran la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> liberada al medio como la media ± desviación estándar de los valores de [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] de tres experimentos diferentes. \* p<0,05 versus control; # p<0,05 versus CSE 10%.

**B. Cuantificación relativa de los niveles de ARNm de MUC5AC en cultivo de células epiteliales de bronquio humano no estimuladas (control) o estimuladas con extracto de humo de tabaco (CSE;10%, 6 horas de incubación) en ausencia o en presencia de piclamilast 10<sup>-7</sup> M.** En el incremento de expresión de MUC5AC inducido por CSE 10 %, se aprecia una tendencia en la inhibición de la misma al preincubar 30 minutos con el inhibidor PDE4 piclamilast 10<sup>-7</sup> M. El ARNm de estos genes se determinó mediante RT-PCR por el método del  $\Delta\Delta C_t$ ; las columnas muestran el incremento en la expresión de MUC5AC relativo a los valores de GAPDH como la media ± desviación estándar de los valores de  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  de tres experimentos diferentes. \* p<0,05 versus control

**C. Cuantificación relativa de los niveles de ARNm de TNF $\alpha$  en cultivo de células epiteliales de bronquio humano no estimuladas (control) o estimuladas con extracto de humo de tabaco (CSE; 10%, 6 horas de incubación) en ausencia o en presencia de piclamilast 10<sup>-7</sup> M.** El incremento de expresión de TNF $\alpha$  inducido por CSE 10 % mostró una tendencia a disminuir al preincubar 30 minutos con el inhibidor de la PDE4 piclamilast 10<sup>-7</sup> M. El ARNm de estos genes se determinó mediante RT-PCR por el método del  $\Delta\Delta C_t$ ; las columnas muestran el incremento en la expresión de TNF $\alpha$  relativo a los valores de GAPDH como la media ± desviación estándar de los valores de  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  de tres experimentos diferentes. \*\* p<0,01 versus control.

**D. Cuantificación de los niveles de TNF $\alpha$  en cultivo de células epiteliales de bronquio humano no estimuladas (control) o estimuladas con extracto de humo de tabaco (CSE 10%; 6 horas de incubación) en ausencia o presencia de piclamilast 10<sup>-7</sup> M.** El incremento de la concentración de TNF $\alpha$  inducido por CSE 10% disminuyó al preincubar 30 minutos previamente con el inhibidor de la PDE4 piclamilast 10<sup>-7</sup> M. Los niveles de TNF $\alpha$  se determinaron mediante el *High Sensitivity Human Cytokine Milliplex™ MAP Kit*; las columnas muestran el incremento en la concentración de TNF $\alpha$  relativa a los valores del control como la media ± desviación estándar de los valores de [TNF $\alpha$ ] de tres experimentos diferentes. \*\*\* p<0,001 versus control; ## p<0,01 versus CSE 10%.

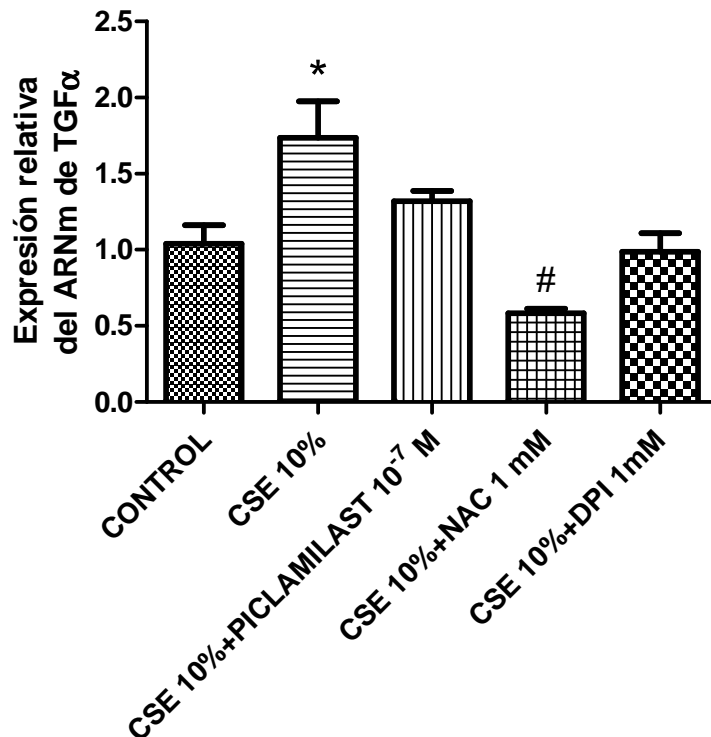
**E. Cuantificación de los niveles de AMPc en cultivo de células epiteliales de bronquio humano no estimuladas (control) o estimuladas con extracto de humo de tabaco (CSE 10%) con o sin el inhibidor de la PDE4 piclamilast 10<sup>-7</sup> M.** Se produce una inhibición de la disminución de los niveles de AMPc debida a CSE 10% con el inhibidor de la PDE4 piclamilast 10<sup>-7</sup> M. Los niveles de AMPc intracelulares se determinaron mediante el *Amersham cAMP Biotrak Enzymeimmunoassay (EIA) system*; las columnas muestran la concentración intracelular de AMPc como la media ± desviación estándar de los valores de [AMPc] de tres experimentos diferentes. \* p<0.05 vs células del grupo control. # p<0.05 vs células tratadas con CSE 10%.

En la figura anterior, se puede observar cómo el inhibidor de PDE4 piclamilast, a la dosis de  $10^{-7}$ M, inhibe la liberación de  $H_2O_2$ , el aumento de expresión génica de MUC5AC, así como la expresión génica y la liberación del mediador inflamatorio  $TNF\alpha$  con respecto a la estimulación del cultivo de células epiteliales de bronquio humano estimulado con CSE al 10%. Además, inhibe la disminución en los niveles de AMPc observada tras la estimulación del cultivo con CSE al 10%.

## **5. Activación de EGFR y producción de mucinas**

### **5.1. Expresión génica y proteica de $TGF\alpha$**

Con el objetivo de caracterizar los mecanismos por los cuales el sistema NADPH oxidasa conduce a la hiperproducción de mucinas, se planteó el estudiar la producción del  $TGF\alpha$  inducida por CSE en el modelo de cultivo celular, y los efectos que producirían sobre la expresión de este factor el antioxidante NAC, el inhibidor de la PDE4 piclamilast y el inhibidor de la NADPH oxidasa DPI. De este modo, se estimularon células epiteliales de bronquio humano en ALI con extracto de humo de tabaco al 10%, en presencia o ausencia de piclamilast  $10^{-7}$  M, NAC 1 mM y DPI  $10^{-6}$  M, durante 6 horas, tras las cuales, se procedió a lisar el cultivo para posteriormente extraer el ARN total y así poder ver la expresión relativa de las células tratadas con respecto al control. La Figura 31 muestra los resultados de expresión relativa del ARNm de  $TGF\alpha$  en las diferentes condiciones frente al grupo control.

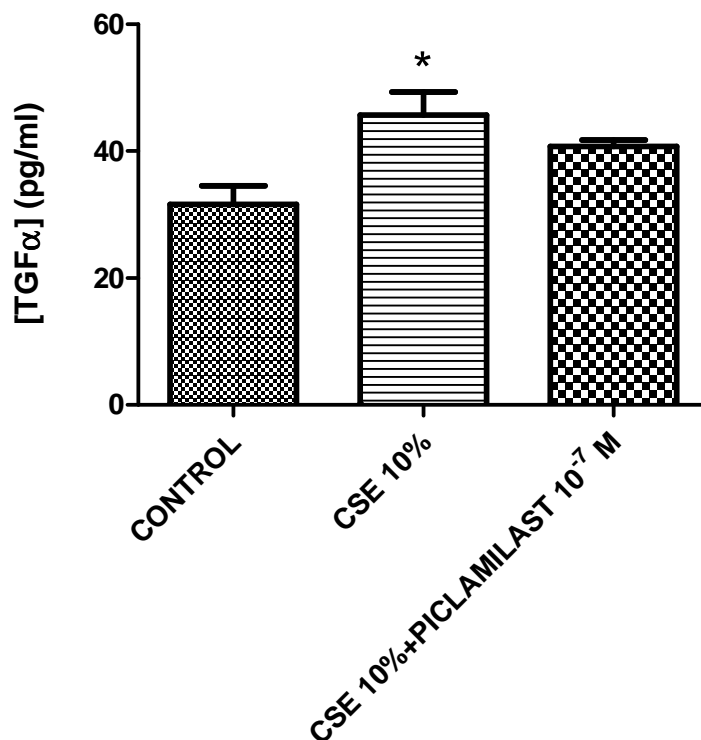


**Figura 31.** Cuantificación relativa de los niveles de ARNm de TGF $\alpha$  en cultivo de células epiteliales de bronquio humano no estimuladas (control) o estimuladas con extracto de humo de tabaco (CSE; 10%, 6 horas de incubación) en ausencia o en presencia de piclamilast  $10^{-7}$  M, NAC 1 mM y DPI  $10^{-6}$  M. En el incremento de expresión de TGF $\alpha$  inducido por CSE 10 %, se vió una tendencia en la inhibición de la misma al preincubar 30 minutos con el inhibidor PDE4 piclamilast  $10^{-7}$ M, con el antioxidante NAC 1 mM (siendo en este caso significativa) y con el inhibidor de la NADPH oxidasa DPI  $10^{-6}$  M . El ARNm de estos genes se determinó mediante RT-PCR por el método del  $\Delta\Delta C_t$ ; las columnas muestran el incremento en la expresión de TGF $\alpha$  relativo a los valores de GAPDH como la media  $\pm$  desviación estándar de los valores de  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  de tres experimentos diferentes. \*  $p < 0,05$  versus control; #  $p < 0,05$  versus CSE 10%.

En la Figura 31 se puede observar que los resultados obtenidos mediante real time RT-PCR para el gen TGF $\alpha$  muestran que piclamilast, a la dosis de  $10^{-7}$  M producía una ligera inhibición del incremento de la expresión de este gen al tratar estas células con

CSE 10 %. Por su parte, NAC, a la dosis de 1 mM y DPI, a la dosis de  $10^{-6}$  M, producían una mayor inhibición, siendo significativa en el caso de NAC, del incremento de la expresión de TGF $\alpha$  al tratar estas células con CSE 10%.

En paralelo a los experimentos de expresión génica, se determinó la cantidad de TGF $\alpha$  liberada al medio en respuesta al CSE 10% y el inhibidor de PDE4 piclamilast  $10^{-7}$  M. A partir de los sobrenadantes retirados de la parte apical del cultivo de células epiteliales de bronquio humano, se determinó el contenido en TGF $\alpha$  liberado mediante el sistema *TGF $\alpha$  ELISA Kit*, tal y como está descrito en el apartado de Material y Métodos. En la Figura 32 se ve la cantidad de TGF $\alpha$  liberada en el medio.



**Figura 32. Cuantificación de los niveles de TGFα liberados en cultivo de células epiteliales de bronquio humano no estimuladas (control) o estimuladas con extracto de humo de tabaco (CSE 10%; 6 horas de incubación) en ausencia o presencia de piclamilast  $10^{-7}$  M con respecto al grupo control. El incremento de la concentración de TGFα inducido por CSE 10% prácticamente no disminuyó al preincubar 30 minutos previamente con el inhibidor de la PDE4 piclamilast  $10^{-7}$  M. Los niveles de TGFα se determinaron mediante el *TGFα ELISA Kit*; las columnas muestran la concentración liberada de TGFα como la media  $\pm$  desviación estándar de los valores de [TGFα] de tres experimentos diferentes.\*  $p < 0,05$  versus control.**

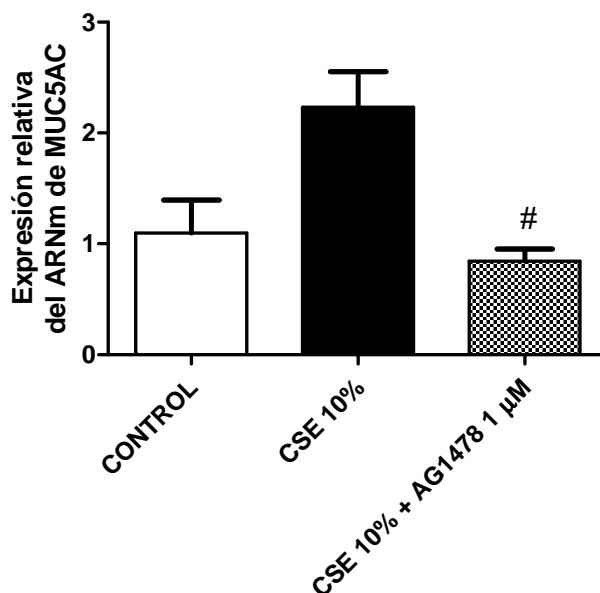
En la figura anterior se observa que los resultados obtenidos en la cuantificación de los niveles de TGFα liberados muestran que piclamilast, a la dosis de  $10^{-7}$  M, modificaba ligeramente el incremento de liberación de TGFα al tratar estas células con CSE 10%.

## **5.2. Papel del Tirfostín AG1478 en la síntesis de mucinas**

Con el objetivo de caracterizar la implicación del EGFR en la producción de mucinas como respuesta a la liberación de TGF $\alpha$ , se planteó estudiar el papel de un inhibidor de la fosforilación de Tyr del receptor anteriormente citado, el tirfostín AG1478.

Para ello, se estimularon células epiteliales de bronquio humano en ALI con CSE 10%, previamente incubadas o no con tirfostín AG1478  $10^{-6}$  M, durante 6 horas, tras las cuales, se procedió a lisar el cultivo para posteriormente extraer el ARN total y así poder ver la expresión relativa de las células tratadas con respecto al control. La Figura 33 muestra los resultados de expresión relativa del ARNm de MUC5AC frente al grupo control.





**Figura 33. Cuantificación relativa de los niveles de ARNm de MUC5AC en células epiteliales de bronquio humano no estimuladas (control) o estimuladas con extracto de humo de tabaco (CSE; 10%, 6 horas de incubación) en ausencia o en presencia de Tirfostín AG1478  $10^{-6}$  M.** El incremento de expresión de MUC5AC inducido por CSE 10% disminuyó al preincubar 30 minutos previamente con el inhibidor del EFGR tirfostín AG1478. El ARNm de MUC5AC se determinó mediante RT-PCR por el método del  $\Delta\Delta C_t$ ; las columnas muestran el incremento en la expresión de MUC5AC relativo a los valores de GAPDH como la media  $\pm$  desviación estándar de los valores de  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  de tres experimentos diferentes. #  $p < 0.05$  vs CSE 10%.

En la Figura 33 se puede observar que los resultados obtenidos mediante real time RT-PCR para el gen MUC5AC muestran que el tirfostín AG1478 produce una inhibición del incremento de la expresión del gen MUC5AC del grupo tratado con CSE al 10%.



## V. DISCUSIÓN



El primer objetivo planteado fue la caracterización de las isoenzimas de la NADPH oxidasa. Para ello, se realizó una RT-PCR de las oxidasas duales, DUOX1 y DUOX2, además de la isoforma GP91PHOX. Relativizando la expresión de las tres isoformas con respecto a DUOX 1, que era la que tenía la expresión mayoritaria, se observó que GP91PHOX tenía una expresión prácticamente nula en el cultivo de células epiteliales de bronquio humano. Estos datos concuerdan con la bibliografía existente[78, 80], que no refiere la expresión de esta isoenzima en células epiteliales de vías aéreas. Por su parte, las oxidasas duales, DUOX 1 y DUOX 2, son las que se expresan en el cultivo, lo cual concuerda con los estudios previos, que describen a las oxidasas duales como las isoenzimas de la NADPH oxidasa expresadas en el epitelio respiratorio [83-85].

Por otra parte, se comprobó que el estrés oxidativo provocado por el extracto de humo de tabaco no modificaba la expresión de las oxidasas duales, lo cual sugiere que el aumento de la liberación de  $H_2O_2$  al medio dependiente del sistema NADPH oxidasa no es debido a un aumento en la síntesis de ARNm de estos genes, sino en la actividad de los mismos.

Visto que el CSE no afectaba a la expresión del complejo NADPH oxidasa, se estudiaron los efectos que éste tenía sobre la actividad del sistema, utilizando un inhibidor no específico del mismo, el difenileneidonio (DPI). Hay estudios que indican que las especies reactivas de oxígeno median ciertas respuestas biológicas adaptativas[99, 100], modulando el estrés oxidativo derivado de la exposición de  $H_2O_2$ , la expresión de una variedad de genes

implicados en respuestas inflamatorias e inmunomoduladoras[101]. Este  $H_2O_2$  está generada por el sistema NADPH oxidasa, y los niveles de este metabolito son utilizados por la lactoperoxidasa para producir hipotiocianato, un fuerte agente antimicrobica. Se ha apreciado un aumento progresivo con el tiempo de producción de  $H_2O_2$  a consecuencia de estimular el cultivo con CSE 10%. Esta inducción es debida a que el extracto de humo de tabaco induce la activación de la NADPH oxidasa, lo cual ya ha sido demostrado con anterioridad[172]. Esta hipótesis se refuerza con el hecho de que al utilizar un inhibidor no específico del sistema, El DPI, se produce una disminución en la liberación de  $H_2O_2$  al medio.

También se observó que el antioxidante N-acetilcisteína (NAC) a la dosis de 1 mM inhibía significativamente el aumento de liberación al medio de  $H_2O_2$ , al ser estimulado el cultivo con CSE al 10%. NAC es un potente antioxidante, derivado del aminoácido L-Cys, el cual contiene grupos tioles [162]. La acción antioxidante de este fármaco se basa en que capta radicales de oxígeno [163], además de ser capaz de penetrar en el citoplasma celular induciendo la síntesis de GSH, ya que NAC aporta el reactivo limitante en la síntesis del mismo, la L- Cys[164]. NAC ha demostrado cierta eficacia clínica en pacientes con fibrosis pulmonar [118, 165], EPOC [166] y otras patologías.

Vista la función del CSE en la activación del sistema NADPH oxidasa, se planteó estudiar el papel que dicho sistema podría tener en la regulación la expresión de mucinas en vías aéreas humanas. En concreto, se estudió la implicación del CSE en la

expresión de la mucina MUC5AC. El gen codificante para esta mucina tiene diferentes elementos *cis* de NFκB en su promotor, por ejemplo, *Pseudomonas aeruginosa* regula positivamente la expresión de MUC5AC siguiente a la activación de la vía MAPK p42/44 a través de una cascada de señalización que implica al EGFR [58]. De este modo, la expresión de dicho gen en respuesta a diferentes estímulos aparece regulada por la cascada del EGFR[60], cuya activación dependiente de ligando del EGFR aumenta la transcripción de MUC5AC[60, 61]. A pesar de que es infrecuente en vías respiratorias de adultos humanos saludables, la expresión de EGFR está regulada positivamente por citocinas proinflamatorias en enfermedades respiratorias crónicas como el asma, sugiriendo que tiene un papel en la patogénesis de la hipersecreción mucosa en estas condiciones, aunque hay otras moléculas implicadas, como EGF, TGF, TNF, MMPs, así como el estrés oxidativo [57, 62], que realizan dicha regulación via el factor de transcripción Sp1 consiguiente a la activación de las vías EFGR/Ras/RAF/ERK 1/2.

Con los datos obtenidos, el CSE produce un aumento de la expresión de mucinas en cultivo de células epiteliales de bronquio humano. Además, el bloqueo de la actividad NADPH oxidasa mediante el DPI, además de disminuir la cantidad de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> liberada al medio, también inhibe la expresión de mucinas en el cultivo, con lo que se sugeriría que el bloqueo de la NADPH oxidasa inhibe la liberación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al medio, y en consecuencia, disminuye el estrés oxidativo que conduce a la activación de EGFR.

A nivel farmacológico, se vió el efecto inhibitorio que tiene sobre este aumento de expresión de mucinas el antioxidante, NAC. A este respecto ya se había demostrado que tanto su administración oral como intravenosa tenía la capacidad de mejorar la protección de antioxidantes en el pulmón mediante la elevación de niveles de glutatión, además de restablecer los test de función pulmonar con una menor incidencia de efectos adversos [165, 173-175]. Además de promover la producción de glutatión, NAC podría reducir los niveles de especies reactivas de oxígeno, ya que tiene la propiedad de secuestrar radicales de oxígeno[176]. Está descrito que las especies reactivas de oxígeno provocan síntesis de MUC5AC vía la transactivación del EGFR [177] y NAC se ha descrito como un agente que interfiere con la activación del NFκB y otras citocinas inflamatorias [176, 178]. Además, previene la hiperplasia de células caliciformes[179] y la hipersecreción mucosa[180]. Por ello, el antioxidante disminuye las especies reactivas de oxígeno, y con ello, inhibe la sobreexpresión de mucinas inducida por CSE.

Otro aspecto destacado de la activación del sistema NADPH oxidasa es la inducción de la expresión génica y de la liberación al medio del mediador inflamatorio TNFα. Se ha demostrado que el tabaco sobrerregula la expresión de TNFα e IL8, ambos definidos como mediadores proinflamatorios asociados con EPOC [181, 182]. Estímulos relacionados con la patogénesis de EPOC, como el humo del cigarrillo y sus componentes, estrés oxidativo, exoproductos bacterianos y citocinas proinflamatorias [54, 61, 181, 183-186], han mostrado inducción de la expresión y producción de mucinas respiratorias *in vitro* e *in vivo*. Baginski et al,



en 2006, [187] demostraron que el CSE utilizado para mimetizar los efectos del humo de tabaco, aumentaba sinérgicamente la inducción de la mucina respiratoria MUC5AC debida a TNF $\alpha$ , tanto a nivel de expresión génica como de producción proteica. Esto es debido a que la activación de la vía del EGFR es un denominador común en la inducción de MUC5AC por varios estímulos proinflamatorios [184-186]. Ravid y colaboradores, en 2002 [188], mostraron que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> prolongaba la activación del EGFR por no promover la regulación por debajo mediada por c-CBL. La liberación de ligandos de EGFR como TGF $\alpha$  está estimulada por oxidantes y TNF $\alpha$ , resultando en una señal de amplificación que implica un bucle de retroalimentación autocrina.

Visto el papel del sistema NADPH oxidasa en la síntesis de mucinas, se pasó a estudiar el papel del AMPc y las PDE4 en dicho proceso. El CSE inhibe los niveles de AMPc intracelular, y dicha inhibición es revertida por el DPI. Por su parte, se aprecia un aumento de expresión en las isoenzimas PDE4 al estimular el cultivo con CSE, el cual es inhibido en presencia del inhibidor no selectivo de la NADPH oxidasa DPI. Además, el inhibidor selectivo de PDE4 piclamilast, inhibe la actividad del sistema NADPH oxidasa inducido por CSE, así como la expresión génica de la mucina MUC5AC, y la expresión génica y liberación proteica de TNF $\alpha$ . También disminuye la inhibición de los niveles de AMPc inducida por CSE.

Las PDE (en este caso concreto las PDE4), catalizan la hidrólisis de AMPc en AMP, su metabolito inactivo. El AMPc actúa como segundo mensajero en la regulación de diversas funciones

celulares como la secreción, contracción, metabolismo y crecimiento [189]. Las PDE4 son especialmente abundantes en cerebro así como en células inmunocompetentes, siendo la isoforma predominante en eosinófilos, considerados como las células efectoras del asma. La inhibición de esta isoenzima tiene como consecuencia una reducción en la respuesta antiinflamatoria, y además, al inducir broncodilatación *in vivo* convierte a los inhibidores PDE4 en una alternativa a los tratamientos clásicos de patologías respiratorias[65, 120, 190].

Dichos inhibidores han sido desarrollados a lo largo del tiempo, distinguiendo entre inhibidores de primera generación (rolipram) y los de segunda generación (cilomilast, roflumilast, piclamilast). El hecho de que existan dos generaciones de inhibidores PDE4 es debido a que los de primera generación inhibían selectivamente la PDE4 pero tenían muchos efectos secundarios como náuseas, vómitos, acidez estomacal, debido a la inhibición de la PDE4 en el sistema nervioso central y en glándulas parietales, respectivamente.

En este caso particular, el piclamilast, es un inhibidor selectivo de la PDE4, comparable a otros inhibidores PDE4 por sus efectos antiinflamatorios. Inhibe selectivamente a las cuatro isoformas de PDE4 (PDE4A, PDE4B, PDE4C y PDE4D), y no presenta inhibición frente a otras PDE.

Un inhibidor de PDE4 tiene como consecuencia principal un aumento del AMPc, además de tener cierto potencial antioxidante, pues está descrito que los inhibidores de PDE4 inhiben la liberación

de aniones superóxido[191]. Este efecto se ha visto en neutrófilos humanos, donde los inhibidores selectivos PDE4 reducen potentemente la liberación de radicales superóxido consiguiente a la estimulación de los mismos con fMLP [192]. Además, en la línea celular epitelial alveolar humana A-549, un inhibidor selectivo de PDE4, abolió la formación de especies reactivas inducida por TGF- $\beta$  [111]. Debido al potencial antioxidante, el inhibidor de la PDE4 piclamilast, a la dosis de  $10^{-7}$  M, inhibía significativamente el aumento de liberación al medio de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, al ser estimulado el cultivo con CSE al 10%, ya que inhibe la acumulación de radicales superóxido que dismutan en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, la cual es liberada al medio.

En cuanto a síntesis de mucinas inducida por CSE, se observa una inhibición de la misma debida a piclamilast. Hay evidencias que indican que el funcionamiento de la vía del AMPc/PKA está relacionada con la vía ERK/MAPK; de este modo, agentes que incrementan la concentración intracelular de AMPc bloquean factores de crecimiento estimulados por la activación de ERK en gran cantidad de tipos celulares mediante la inhibición de la activación de proteínas Raf [66, 67]. En este laboratorio se ha visto que en este mismo modelo el roflumilast, otro inhibidor PDE4, inhibe la vía ERK 1/2 (datos no publicados). Además, las isoenzimas PDE4 pueden proveer un punto de integración entre el AMPc y la señalización de ERK en células[193]. La acción inhibitoria de los inhibidores PDE4 parece ser ejercida a diferentes niveles de la cascada de señalización del EGFR, por ejemplo, roflumilast disminuye una fosforilación inducida por EGF de la MAP cinasa p38 y ERK 1/2 [65]. Como se observa, el CSE disminuye la concentración

intracelular de AMPc, mientras que el tratamiento con piclamilast aumenta la concentración de este segundo mensajero. Estos datos refuerzan la hipótesis de la conexión de la vía AMPc/PKA con la vía ERK/MAPK, la cual tiene como último efecto la inhibición de la hiperproducción mucosa.

Llegados a este punto, se observó que el extracto de humo de tabaco activaba el sistema NADPH oxidasa; dicha activación en último término conllevaba mediante la vía del EGFR inducción de la síntesis de mucinas, por lo que se planteó estudiar el mecanismo por el cual el CSE conducía a la activación del EGFR. En 1999, Takeyama et al [60] describieron que cuando las células NCI-H292 crecían en cultivos densos, se diferenciaban en células mucosas y producían mucinas vía activación del EGFR, y posteriormente [185] vieron que el CSE provocaba síntesis de mucinas vía EGFR. Más adelante, Richter et al [182], en 2002, demostraron que el CSE inducía la expresión y liberación de ligandos de EGFR, entre ellos el TGF $\alpha$ . Todos estos estudios sugirieron que el CSE provocaría activación de EGFR debido al aumento de la disponibilidad de ligandos solubles de EGFR, que se unen y activan al mismo. Otro hallazgo más reciente mostró que PMA inducía la fosforilación de EGFR y la producción de mucinas vía la activación del enzima convertidor del factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TACE) y la subsiguiente liberación proteolítica del proligando del EGFR pro-TGF $\alpha$  en células NCI-H292 [184]. Finalmente, Shao et al en 2004 [183], mostraron que el CSE activa TACE, una metaloproteasa, la cual escinde proteolíticamente a pro-TGF $\alpha$ , provocando la liberación del TGF $\alpha$  soluble, que conduce a la fosforilación del EGFR, y en

último término lleva a la sobreproducción de mucinas en células NCI-H292, sugiriendo que los radicales libres de oxígeno son los responsables de la activación de TACE por humo de tabaco. Es por ello que en el cultivo de células epiteliales de bronquio humano el CSE aumenta la cantidad de radicales libres de oxígeno y aumenta la expresión génica de TGF $\alpha$ , y dicho efecto se traduce a nivel de cantidad de proteína liberada al medio. El bloqueo del sistema NADPH oxidasa inhibe el aumento en la expresión génica de TGF $\alpha$ , y tanto el inhibidor específico de PDE4 piclamilast, debido a que actúa como antioxidante, como el antioxidante NAC disminuyen la cantidad de radicales libres producidos por el CSE, inhibiendo también el aumento de dicha expresión génica.

Además, con el propósito de corroborar la implicación del EGFR en la síntesis de mucinas, se estudió el efecto del tirfostín AG1478 en el cultivo de células epiteliales de bronquio humano estimuladas con CSE. El tirfostín es un inhibidor selectivo del EGFR [194] que induce una inhibición dosis dependiente de la autofosforilación de éste (no se altera el nivel de EGFR en las células [195]), y en consecuencia de su actividad. Esta inhibición es amplificada en presencia de ligando. La transactivación del EGFR en las células caliciformes conduce a la secreción mucosa [57], [62], [196], con lo que aumenta la secreción mucosa en dichas células. Al inhibir el tirfostín AG1478 al EGFR, se produce una inhibición en el aumento de MUC5AC inducida por CSE al 10%.

La Figura 34 muestra el esquema propuesto de producción de mucinas inducido por CSE. El tabaco mediante

activación de la PKC, provoca la activación del sistema NADPH oxidasa, en concreto la isoforma Duox1, y como consecuencia, se liberan protones al medio que favorecen la formación de  $H_2O_2$ . La exposición de  $H_2O_2$  genera un estrés oxidativo que promueve la activación de la metaloproteasa TACE, con lo que se produce la escisión proteolítica de pro-TGF $\alpha$  con la consiguiente liberación de TGF $\alpha$ . Esta molécula es un ligando del EGFR, y al unirse al mismo, activa la vía ERK 1/2 que tiene como punto final la transcripción de MUC5AC.

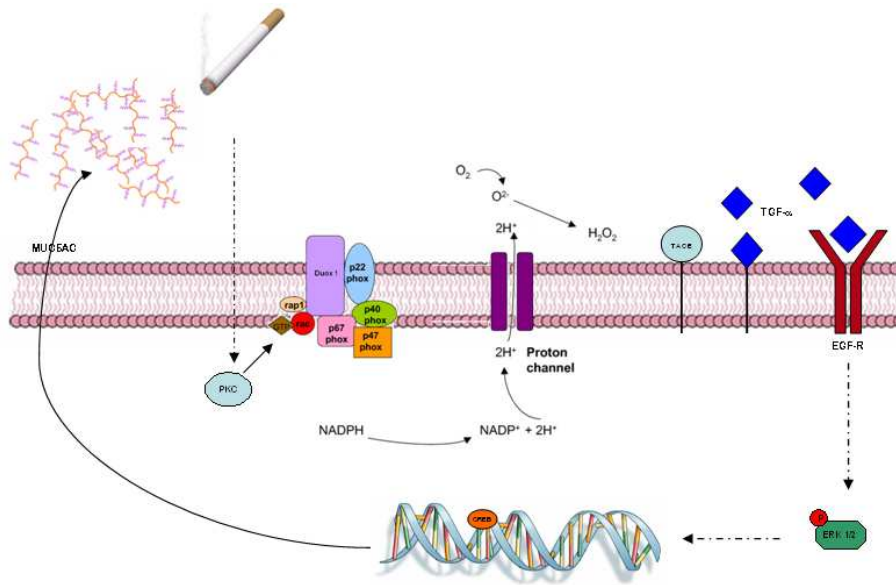


Figura 34. Mecanismo propuesto de producción de mucinas inducido por CSE, en el que está implicado el complejo NADPH oxidasa, el TGF $\alpha$  y el EGFR.

## **VI. CONCLUSIONES**





1. La actividad NADPH oxidasa en cultivo de células epiteliales de bronquio humano recae en las oxidasas duales, siendo mucho mayor la expresión de la isoforma Duox 1 que de la isoforma Duox 2.
2. El extracto de humo de tabaco, tras activar el complejo NADPH oxidasa produce un aumento de especies reactivas de oxígeno en cultivo de células epiteliales de bronquio humano, siendo inhibido dicho aumento por la acción del inhibidor selectivo de PDE4 piclamilast y por el antioxidante NAC.
3. La activación del complejo NADPH oxidasa conduce a una sobreexpresión de mucinas en cultivo de células epiteliales de bronquio humano vía la transactivación del EGFR. El proceso es inhibido por el inhibidor selectivo de la PDE4 piclamilast, el cual produce un aumento del AMPc que inhibe la cascada de señalización de EGFR a diferentes niveles, y por el antioxidante NAC, que disminuye los niveles de especies reactivas de oxígeno.
4. La sobreexpresión de mucinas inducida por especies reactivas de oxígeno en cultivo de células epiteliales de bronquio humano es debida a que las mismas activan la metaloproteasa TACE, que escinde proteolíticamente a pro-TGF $\alpha$ , con lo que se libera TGF soluble, el cual fosforila EGFR y desencadena la sobreexpresión de mucinas.



## VII. BIBLIOGRAFÍA



1. Rogers, D.F., Physiology of airway mucus secretion and pathophysiology of hypersecretion. *Respir Care*, 2007. **52**(9): p. 1134-46; discussion 1146-9.
2. Gosens, R., et al., Muscarinic receptor signaling in the pathophysiology of asthma and COPD. *Respir Res*, 2006. **7**: p. 73.
3. Crystal, R.G., et al., Airway epithelial cells: current concepts and challenges. *Proc Am Thorac Soc*, 2008. **5**(7): p. 772-7.
4. Corfield, A.P., et al., Mucins and mucosal protection in the gastrointestinal tract: new prospects for mucins in the pathology of gastrointestinal disease. *Gut*, 2000. **47**(4): p. 589-94.
5. Guyonnet Duperat, V., et al., Characterization of the human mucin gene MUC5AC: a consensus cysteine-rich domain for 11p15 mucin genes? *Biochem J*, 1995. **305 ( Pt 1)**: p. 211-9.
6. Rose, M.C., Characterization of human tracheobronchial mucin glycoproteins. *Methods Enzymol*, 1989. **179**: p. 3-17.
7. Leikauf, G.D., et al., Mucin apoprotein expression in COPD. *Chest*, 2002. **121**(5 Suppl): p. 166S-182S.
8. Voynow, J.A., What does mucin have to do with lung disease? *Paediatr Respir Rev*, 2002. **3**(2): p. 98-103.
9. Rose, M.C., Mucins: structure, function, and role in pulmonary diseases. *Am J Physiol*, 1992. **263**(4 Pt 1): p. L413-29.
10. Rose, M.C. and J.A. Voynow, Respiratory tract mucin genes and mucin glycoproteins in health and disease. *Physiol Rev*, 2006. **86**(1): p. 245-78.

11. Blyth, D.I., The homeostatic role of bronchoconstriction. *Respiration*, 2001. **68**(2): p. 217-23.
12. Kaliner, M., et al., Human respiratory mucus. *Am Rev Respir Dis*, 1986. **134**(3): p. 612-21.
13. Rogers, D.F., Airway mucus hypersecretion in asthma: an undervalued pathology? *Curr Opin Pharmacol*, 2004. **4**(3): p. 241-50.
14. Rose, M.C., T.J. Nickola, and J.A. Voynow, Airway mucus obstruction: mucin glycoproteins, MUC gene regulation and goblet cell hyperplasia. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2001. **25**(5): p. 533-7.
15. Vestbo, J., E. Prescott, and P. Lange, Association of chronic mucus hypersecretion with FEV1 decline and chronic obstructive pulmonary disease morbidity. Copenhagen City Heart Study Group. *Am J Respir Crit Care Med*, 1996. **153**(5): p. 1530-5.
16. Adler, K.B. and Y. Li, Airway epithelium and mucus: intracellular signaling pathways for gene expression and secretion. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2001. **25**(4): p. 397-400.
17. Chen, Y., Y.H. Zhao, and R. Wu, Differential regulation of airway mucin gene expression and mucin secretion by extracellular nucleotide triphosphates. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2001. **25**(4): p. 409-17.
18. Davis, C.W., Regulation of mucin secretion from in vitro cellular models. *Novartis Found Symp*, 2002. **248**: p. 113-25; discussion 125-31, 277-82.
19. Verdugo, P., Mucin exocytosis. *Am Rev Respir Dis*, 1991. **144**(3 Pt 2): p. S33-7.

20. Levine, S.J., et al., Tumor necrosis factor-alpha induces mucin hypersecretion and MUC-2 gene expression by human airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1995. **12**(2): p. 196-204.
21. Moniaux, N., et al., Alternative splicing generates a family of putative secreted and membrane-associated MUC4 mucins. *Eur J Biochem*, 2000. **267**(14): p. 4536-44.
22. Kamio, K., et al., Promoter analysis and aberrant expression of the MUC5B gene in diffuse panbronchiolitis. *Am J Respir Crit Care Med*, 2005. **171**(9): p. 949-57.
23. Axelsson, M.A., N. Asker, and G.C. Hansson, O-glycosylated MUC2 monomer and dimer from LS 174T cells are water-soluble, whereas larger MUC2 species formed early during biosynthesis are insoluble and contain nonreducible intermolecular bonds. *J Biol Chem*, 1998. **273**(30): p. 18864-70.
24. Rose, M.C., et al., Structural features of human tracheobronchial mucus glycoprotein. *Biochem J*, 1984. **222**(2): p. 371-7.
25. Sheehan, J.K., K. Oates, and I. Carlstedt, Electron microscopy of cervical, gastric and bronchial mucus glycoproteins. *Biochem J*, 1986. **239**(1): p. 147-53.
26. Dekker, J., et al., The MUC family: an obituary. *Trends Biochem Sci*, 2002. **27**(3): p. 126-31.
27. Brockhausen, I., O-linked chain glycosyltransferases. *Methods Mol Biol*, 2000. **125**: p. 273-93.
28. Schachter, H. and D. Williams, Biosynthesis of mucus glycoproteins. *Adv Exp Med Biol*, 1982. **144**: p. 3-28.

29. Aust, M.R., et al., Mucin mRNA expression in normal and vasomotor inferior turbinates. *Am J Rhinol*, 1997. **11**(4): p. 293-302.
30. Chen, Y., et al., Genome-wide search and identification of a novel gel-forming mucin MUC19/Muc19 in glandular tissues. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2004. **30**(2): p. 155-65.
31. Gendler, S.J. and A.P. Spicer, Epithelial mucin genes. *Annu Rev Physiol*, 1995. **57**: p. 607-34.
32. Higuchi, T., et al., Molecular cloning, genomic structure, and expression analysis of MUC20, a novel mucin protein, up-regulated in injured kidney. *J Biol Chem*, 2004. **279**(3): p. 1968-79.
33. Pallesen, L.T., et al., Isolation and characterization of MUC15, a novel cell membrane-associated mucin. *Eur J Biochem*, 2002. **269**(11): p. 2755-63.
34. Piludu, M., et al., Electron microscopic immunogold localization of salivary mucins MG1 and MG2 in human submandibular and sublingual glands. *J Histochem Cytochem*, 2003. **51**(1): p. 69-79.
35. Reid, C.J., S. Gould, and A. Harris, Developmental expression of mucin genes in the human respiratory tract. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1997. **17**(5): p. 592-8.
36. Voynow, J.A., et al., Neutrophil elastase induces mucus cell metaplasia in mouse lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2004. **287**(6): p. L1293-302.
37. Williams, S.J., et al., Muc13, a novel human cell surface mucin expressed by epithelial and hemopoietic cells. *J Biol Chem*, 2001. **276**(21): p. 18327-36.



38. Kirkham, S., et al., Heterogeneity of airways mucus: variations in the amounts and glycoforms of the major oligomeric mucins MUC5AC and MUC5B. *Biochem J*, 2002. **361**(Pt 3): p. 537-46.
39. Henke, M.O., et al., MUC5AC and MUC5B Mucins Are Decreased in Cystic Fibrosis Airway Secretions. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2004. **31**(1): p. 86-91.
40. Bernacki, S.H., et al., Mucin gene expression during differentiation of human airway epithelia in vitro. Muc4 and muc5b are strongly induced. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1999. **20**(4): p. 595-604.
41. Hovenberg, H.W., et al., MUC5AC, but not MUC2, is a prominent mucin in respiratory secretions. *Glycoconj J*, 1996. **13**(5): p. 839-47.
42. Penia, M.T., et al., Localization and expression of MUC5B and MUC7 mucins in pediatric sinus mucosa. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 2007. **116**(5): p. 389-97.
43. Hollingsworth, M.A. and B.J. Swanson, Mucins in cancer: protection and control of the cell surface. *Nat Rev Cancer*, 2004. **4**(1): p. 45-60.
44. Folkerts, G., et al., Virus-induced airway hyperresponsiveness and asthma. *Am J Respir Crit Care Med*, 1998. **157**(6 Pt 1): p. 1708-20.
45. Caramori, G., et al., Mucin expression in peripheral airways of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Histopathology*, 2004. **45**(5): p. 477-84.
46. Davies, J.R., et al., Identification of MUC5B, MUC5AC and small amounts of MUC2 mucins in cystic fibrosis airway secretions. *Biochem J*, 1999. **344 Pt 2**: p. 321-30.

47. Lamblin, G., et al., Human airway mucin glycosylation: a combinatory of carbohydrate determinants which vary in cystic fibrosis. *Glycoconj J*, 2001. **18**(9): p. 661-84.
48. Borchers, M.T., S.E. Wert, and G.D. Leikauf, Acrolein-induced MUC5ac expression in rat airways. *Am J Physiol*, 1998. **274**(4 Pt 1): p. L573-81.
49. Borchers, M.T., et al., Monocyte inflammation augments acrolein-induced Muc5ac expression in mouse lung. *Am J Physiol*, 1999. **277**(3 Pt 1): p. L489-97.
50. Shimizu, T., et al., Hypertrophic and metaplastic changes of goblet cells in rat nasal epithelium induced by endotoxin. *Am J Respir Crit Care Med*, 1996. **153**(4 Pt 1): p. 1412-8.
51. Yanagihara, K., M. Seki, and P.W. Cheng, Lipopolysaccharide Induces Mucus Cell Metaplasia in Mouse Lung. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2001. **24**(1): p. 66-73.
52. Basbaum, C., et al., Control of mucin transcription by diverse injury-induced signaling pathways. *Am J Respir Crit Care Med*, 1999. **160**(5 Pt 2): p. S44-8.
53. Li, J.D., et al., Transcriptional activation of mucin by *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide in the pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(3): p. 967-72.
54. Li, J.D., et al., Activation of NF-kappaB via a Src-dependent Ras-MAPK-pp90rsk pathway is required for *Pseudomonas aeruginosa*-induced mucin overproduction in epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(10): p. 5718-23.
55. Pigny, P., et al., The MUC5AC gene: RFLP analysis with the Jer58 probe. *Hum Genet*, 1995. **96**(3): p. 367-8.

56. Thornton, D.J., K. Rousseau, and M.A. McGuckin, Structure and function of the polymeric mucins in airways mucus. *Annu Rev Physiol*, 2008. **70**: p. 459-86.
57. Takeyama, K., J.V. Fahy, and J.A. Nadel, Relationship of epidermal growth factor receptors to goblet cell production in human bronchi. *Am J Respir Crit Care Med*, 2001. **163**(2): p. 511-6.
58. Kohri, K., et al., Pseudomonas aeruginosa induces MUC5AC production via epidermal growth factor receptor. *Eur Respir J*, 2002. **20**(5): p. 1263-70.
59. Wang, B., et al., Novel cytoplasmic proteins of nontypeable Haemophilus influenzae up-regulate human MUC5AC mucin transcription via a positive p38 mitogen-activated protein kinase pathway and a negative phosphoinositide 3-kinase-Akt pathway. *J Biol Chem*, 2002. **277**(2): p. 949-57.
60. Takeyama, K., et al., Epidermal growth factor system regulates mucin production in airways. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(6): p. 3081-6.
61. Takeyama, K., et al., Oxidative stress causes mucin synthesis via transactivation of epidermal growth factor receptor: role of neutrophils. *J Immunol*, 2000. **164**(3): p. 1546-52.
62. Polosa, R., et al., Expression of c-erbB receptors and ligands in the bronchial epithelium of asthmatic subjects. *J Allergy Clin Immunol*, 2002. **109**(1): p. 75-81.
63. Longphre, M., et al., Allergen-induced IL-9 directly stimulates mucin transcription in respiratory epithelial cells. *J Clin Invest*, 1999. **104**(10): p. 1375-82.
64. Giembycz, M.A., Development status of second generation PDE4 inhibitors for asthma and COPD: the story so far. *Monaldi Arch Chest Dis*, 2002. **57**(1): p. 48-64.

65. Mata, M., et al., Phosphodiesterase 4 inhibition decreases MUC5AC expression induced by epidermal growth factor in human airway epithelial cells. *Thorax*, 2005. **60**(2): p. 144-52.
66. Severson, B.R., X. Kong, and J.C. Lawrence, Jr., Increasing cAMP attenuates activation of mitogen-activated protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. **90**(21): p. 10305-9.
67. Piiper, A., et al., Pertussis toxin inhibits cholecystokinin- and epidermal growth factor-induced mitogen-activated protein kinase activation by disinhibition of the cAMP signaling pathway and inhibition of c-Raf-1. *Mol Pharmacol*, 2000. **58**(3): p. 608-13.
68. Dekhuijzen, P.N., et al., Increased exhalation of hydrogen peroxide in patients with stable and unstable chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*, 1996. **154**(3 Pt 1): p. 813-6.
69. Jobsis, Q., et al., Hydrogen peroxide in exhaled air of healthy children: reference values. *Eur Respir J*, 1998. **12**(2): p. 483-5.
70. Kinnula, V.L., et al., Release of reactive oxygen species by guinea pig tracheal epithelial cells in vitro. *Am J Physiol*, 1992. **262**(6 Pt 1): p. L708-12.
71. Lansing, M.W., et al., Oxygen radicals contribute to antigen-induced airway hyperresponsiveness in conscious sheep. *Am Rev Respir Dis*, 1993. **147**(2): p. 321-6.
72. Edens, W.A., et al., Tyrosine cross-linking of extracellular matrix is catalyzed by Duox, a multidomain oxidase/oxidoreductase with homology to the phagocyte oxidase subunit gp91phox. *J Cell Biol*, 2001. **154**(4): p. 879-91.
73. Cross, A.R. and A.W. Segal, The NADPH oxidase of professional phagocytes--prototype of the NOX electron

- transport chain systems. *Biochim Biophys Acta*, 2004. **1657**(1): p. 1-22.
74. Doussiere, J., F. Bouzidi, and P.V. Vignais, The S100A8/A9 protein as a partner for the cytosolic factors of NADPH oxidase activation in neutrophils. *Eur J Biochem*, 2002. **269**(13): p. 3246-55.
75. Cross, A.R. and O.T. Jones, Enzymic mechanisms of superoxide production. *Biochim Biophys Acta*, 1991. **1057**(3): p. 281-98.
76. Emmendorffer, A., et al., Production of oxygen radicals by fibroblasts and neutrophils from a patient with x-linked chronic granulomatous disease. *Eur J Haematol*, 1993. **51**(4): p. 223-7.
77. Lambeth, J.D., et al., Novel homologs of gp91phox. *Trends Biochem Sci*, 2000. **25**(10): p. 459-61.
78. Su, Y., et al., Effect of cigarette smoke extract on nitric oxide synthase in pulmonary artery endothelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1998. **19**(5): p. 819-25.
79. Banfi, B., et al., A mammalian H<sup>+</sup> channel generated through alternative splicing of the NADPH oxidase homolog NOH-1. *Science*, 2000. **287**(5450): p. 138-42.
80. Krause, K.H., Tissue distribution and putative physiological function of NOX family NADPH oxidases. *Jpn J Infect Dis*, 2004. **57**(5): p. S28-9.
81. Banfi, B., et al., A Ca<sup>(2+)</sup>-activated NADPH oxidase in testis, spleen, and lymph nodes. *J Biol Chem*, 2001. **276**(40): p. 37594-601.
82. Suh, Y.A., et al., Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1. *Nature*, 1999. **401**(6748): p. 79-82.

83. Geiszt, M., et al., Dual oxidases represent novel hydrogen peroxide sources supporting mucosal surface host defense. *Faseb J*, 2003. **17**(11): p. 1502-4.
84. Forteza, R., et al., Regulated hydrogen peroxide production by Duox in human airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2005. **32**(5): p. 462-9.
85. Schwarzer, C., et al., NADPH oxidase-dependent acid production in airway epithelial cells. *J Biol Chem*, 2004. **279**(35): p. 36454-61.
86. Ameziane-El-Hassani, R., et al., Dual oxidase-2 has an intrinsic Ca<sup>2+</sup>-dependent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-generating activity. *J Biol Chem*, 2005. **280**(34): p. 30046-54.
87. Rotrosen, D., et al., Cytochrome b558: the flavin-binding component of the phagocyte NADPH oxidase. *Science*, 1992. **256**(5062): p. 1459-62.
88. Segal, A.W., et al., Cytochrome b-245 is a flavocytochrome containing FAD and the NADPH-binding site of the microbicidal oxidase of phagocytes. *Biochem J*, 1992. **284** ( Pt 3): p. 781-8.
89. Sumimoto, H., et al., Cytochrome b558, a component of the phagocyte NADPH oxidase, is a flavoprotein. *Biochem Biophys Res Commun*, 1992. **186**(3): p. 1368-75.
90. De Deken, X., et al., Cloning of two human thyroid cDNAs encoding new members of the NADPH oxidase family. *J Biol Chem*, 2000. **275**(30): p. 23227-33.
91. Harper, R.W., et al., Differential regulation of dual NADPH oxidases/peroxidases, Duox1 and Duox2, by Th1 and Th2 cytokines in respiratory tract epithelium. *FEBS Lett*, 2005. **579**(21): p. 4911-7.

92. Brown, R.K., et al., Pulmonary dysfunction in cystic fibrosis is associated with oxidative stress. *Eur Respir J*, 1996. **9**(2): p. 334-9.
93. Loukides, S., et al., Elevated levels of expired breath hydrogen peroxide in bronchiectasis. *Am J Respir Crit Care Med*, 1998. **158**(3): p. 991-4.
94. Repine, J.E., A. Bast, and I. Lankhorst, Oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. Oxidative Stress Study Group. *Am J Respir Crit Care Med*, 1997. **156**(2 Pt 1): p. 341-57.
95. Witko-Sarsat, V., et al., Neutrophil-derived long-lived oxidants in cystic fibrosis sputum. *Am J Respir Crit Care Med*, 1995. **152**(6 Pt 1): p. 1910-6.
96. Weiss, S.J., Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med*, 1989. **320**(6): p. 365-76.
97. Weissmann, G., J.E. Smolen, and H.M. Korchak, Release of inflammatory mediators from stimulated neutrophils. *N Engl J Med*, 1980. **303**(1): p. 27-34.
98. Yamaya, M., et al., Oxidants affect permeability and repair of the cultured human tracheal epithelium. *Am J Physiol*, 1995. **268**(2 Pt 1): p. L284-93.
99. Lander, H.M., An essential role for free radicals and derived species in signal transduction. *Faseb J*, 1997. **11**(2): p. 118-24.
100. Lander, H.M., et al., Redox regulation of cell signalling. *Nature*, 1996. **381**(6581): p. 380-1.
101. Sen, C.K. and L. Packer, Antioxidant and redox regulation of gene transcription. *Faseb J*, 1996. **10**(7): p. 709-20.

102. Goldkorn, T., et al., EGF-Receptor phosphorylation and signaling are targeted by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> redox stress. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1998. **19**(5): p. 786-98.
103. Hocker, M., et al., Oxidative stress activates the human histidine decarboxylase promoter in AGS gastric cancer cells. *J Biol Chem*, 1998. **273**(36): p. 23046-54.
104. Kinnula, V.L. and J.D. Crapo, Superoxide dismutases in the lung and human lung diseases. *Am J Respir Crit Care Med*, 2003. **167**(12): p. 1600-19.
105. McCord, J.M. and I. Fridovich, Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem*, 1969. **244**(22): p. 6049-55.
106. Tsan, M.F., Superoxide dismutase and pulmonary oxygen toxicity: lessons from transgenic and knockout mice (Review). *Int J Mol Med*, 2001. **7**(1): p. 13-9.
107. Ilizarov, A.M., et al., Overexpression of manganese superoxide dismutase protects lung epithelial cells against oxidant injury. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2001. **24**(4): p. 436-41.
108. Carlsson, L.M., et al., Mice lacking extracellular superoxide dismutase are more sensitive to hyperoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. **92**(14): p. 6264-8.
109. Cosio, M.G., M. Saetta, and A. Agusti, Immunologic aspects of chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med*, 2009. **360**(23): p. 2445-54.
110. Devereux, G., ABC of chronic obstructive pulmonary disease. Definition, epidemiology, and risk factors. *BMJ*, 2006. **332**(7550): p. 1142-4.



111. Hatzelmann, A., et al., The preclinical pharmacology of roflumilast--a selective, oral phosphodiesterase 4 inhibitor in development for chronic obstructive pulmonary disease. *Pulm Pharmacol Ther*, 2010. **23**(4): p. 235-56.
112. Stephens, M.B. and K.S. Yew, Diagnosis of chronic obstructive pulmonary disease. *Am Fam Physician*, 2008. **78**(1): p. 87-92.
113. Rushton, L., Occupational causes of chronic obstructive pulmonary disease. *Rev Environ Health*, 2007. **22**(3): p. 195-212.
114. Currie, G.P., D.K. Lee, and B.J. Lipworth, ABC of chronic obstructive pulmonary disease. Pharmacological management--oral treatment. *BMJ*, 2006. **332**(7556): p. 1497-9.
115. Barnes, P.J., Reduced histone deacetylase in COPD: clinical implications. *Chest*, 2006. **129**(1): p. 151-5.
116. Barnes, P.J., Future treatments for chronic obstructive pulmonary disease and its comorbidities. *Proc Am Thorac Soc*, 2008. **5**(8): p. 857-64.
117. Biernacki, W.A., S.A. Kharitonov, and P.J. Barnes, Increased leukotriene B4 and 8-isoprostane in exhaled breath condensate of patients with exacerbations of COPD. *Thorax*, 2003. **58**(4): p. 294-8.
118. Mata, M., et al., Oral N-acetylcysteine reduces bleomycin-induced lung damage and mucin Muc5ac expression in rats. *Eur Respir J*, 2003. **22**(6): p. 900-5.
119. Barnes, P.J., ABC of chronic obstructive pulmonary disease. Future treatments. *BMJ*, 2006. **333**(7561): p. 246-8.

120. Barnes, P.J., Emerging pharmacotherapies for COPD. *Chest*, 2008. **134**(6): p. 1278-86.
121. Barnes, P.J., Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Nat Rev Immunol*, 2008. **8**(3): p. 183-92.
122. Maneechotesuwan, K., et al., Formoterol attenuates neutrophilic airway inflammation in asthma. *Chest*, 2005. **128**(4): p. 1936-42.
123. Barnes, N.C., et al., Antiinflammatory effects of salmeterol/fluticasone propionate in chronic obstructive lung disease. *Am J Respir Crit Care Med*, 2006. **173**(7): p. 736-43.
124. Bourbeau, J., et al., Effect of salmeterol/fluticasone propionate on airway inflammation in COPD: a randomised controlled trial. *Thorax*, 2007. **62**(11): p. 938-43.
125. Grando, S.A., et al., Recent progress in understanding the non-neuronal cholinergic system in humans. *Life Sci*, 2007. **80**(24-25): p. 2181-5.
126. Eglen, R.M., Muscarinic receptor subtypes in neuronal and non-neuronal cholinergic function. *Auton Autacoid Pharmacol*, 2006. **26**(3): p. 219-33.
127. Milic-Emili, J., Does mechanical injury of the peripheral airways play a role in the genesis of COPD in smokers? *Copd*, 2004. **1**(1): p. 85-92.
128. Tschumperlin, D.J. and J.M. Drazen, Chronic effects of mechanical force on airways. *Annu Rev Physiol*, 2006. **68**: p. 563-83.
129. Hansel, T.T., et al., Glycopyrrolate causes prolonged bronchoprotection and bronchodilatation in patients with asthma. *Chest*, 2005. **128**(4): p. 1974-9.

130. van Noord, J.A., et al., Effects of tiotropium with and without formoterol on airflow obstruction and resting hyperinflation in patients with COPD. *Chest*, 2006. **129**(3): p. 509-17.
131. Keddissi, J.I., et al., The use of statins and lung function in current and former smokers. *Chest*, 2007. **132**(6): p. 1764-71.
132. Mancini, G.B., et al., Reduction of morbidity and mortality by statins, angiotensin-converting enzyme inhibitors, and angiotensin receptor blockers in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J Am Coll Cardiol*, 2006. **47**(12): p. 2554-60.
133. Soyseth, V., et al., Statin use is associated with reduced mortality in COPD. *Eur Respir J*, 2007. **29**(2): p. 279-83.
134. Hothersall, E., C. McSharry, and N.C. Thomson, Potential therapeutic role for statins in respiratory disease. *Thorax*, 2006. **61**(8): p. 729-34.
135. Dandona, P., et al., Angiotensin II and inflammation: the effect of angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin II receptor blockade. *J Hum Hypertens*, 2007. **21**(1): p. 20-7.
136. Andreas, S., et al., Angiotensin II blockers in obstructive pulmonary disease: a randomised controlled trial. *Eur Respir J*, 2006. **27**(5): p. 972-9.
137. Conti, M., et al., Cyclic AMP-specific PDE4 phosphodiesterases as critical components of cyclic AMP signaling. *J Biol Chem*, 2003. **278**(8): p. 5493-6.
138. Fan Chung, K., Phosphodiesterase inhibitors in airways disease. *Eur J Pharmacol*, 2006. **533**(1-3): p. 110-7.
139. Giembycz, M.A., Could isoenzyme-selective phosphodiesterase inhibitors render bronchodilator therapy

- redundant in the treatment of bronchial asthma? *Biochem Pharmacol*, 1992. **43**(10): p. 2041-51.
140. Burnouf, C. and M.P. Pruniaux, Recent advances in PDE4 inhibitors as immunoregulators and anti-inflammatory drugs. *Curr Pharm Des*, 2002. **8**(14): p. 1255-96.
141. Sanz, M.J., J. Cortijo, and E.J. Morcillo, PDE4 inhibitors as new anti-inflammatory drugs: effects on cell trafficking and cell adhesion molecules expression. *Pharmacol Ther*, 2005. **106**(3): p. 269-97.
142. Souness, J.E., D. Aldous, and C. Sargent, Immunosuppressive and anti-inflammatory effects of cyclic AMP phosphodiesterase (PDE) type 4 inhibitors. *Immunopharmacology*, 2000. **47**(2-3): p. 127-62.
143. Torphy, T.J., Phosphodiesterase isozymes: molecular targets for novel antiasthma agents. *Am J Respir Crit Care Med*, 1998. **157**(2): p. 351-70.
144. Martorana, P.A., et al., Roflumilast fully prevents emphysema in mice chronically exposed to cigarette smoke. *Am J Respir Crit Care Med*, 2005. **172**(7): p. 848-53.
145. Cortijo, J., et al., Roflumilast, a phosphodiesterase 4 inhibitor, alleviates bleomycin-induced lung injury. *Br J Pharmacol*, 2009. **156**(3): p. 534-44.
146. Grootendorst, D.C., et al., Reduction in sputum neutrophil and eosinophil numbers by the PDE4 inhibitor roflumilast in patients with COPD. *Thorax*, 2007. **62**(12): p. 1081-7.
147. Calverley, P.M., et al., Effect of 1-year treatment with roflumilast in severe chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*, 2007. **176**(2): p. 154-61.

148. Rabe, K.F., et al., Roflumilast--an oral anti-inflammatory treatment for chronic obstructive pulmonary disease: a randomised controlled trial. *Lancet*, 2005. **366**(9485): p. 563-71.
149. Peter, D., et al., Differential expression and function of phosphodiesterase 4 (PDE4) subtypes in human primary CD4+ T cells: predominant role of PDE4D. *J Immunol*, 2007. **178**(8): p. 4820-31.
150. Smith, S.J., et al., Discovery of BRL 50481 [3-(N,N-dimethylsulfonamido)-4-methyl-nitrobenzene], a selective inhibitor of phosphodiesterase 7: in vitro studies in human monocytes, lung macrophages, and CD8+ T-lymphocytes. *Mol Pharmacol*, 2004. **66**(6): p. 1679-89.
151. Medicherla, S., et al., p38alpha-selective mitogen-activated protein kinase inhibitor SD-282 reduces inflammation in a subchronic model of tobacco smoke-induced airway inflammation. *J Pharmacol Exp Ther*, 2008. **324**(3): p. 921-9.
152. Medina-Tato, D.A., S.G. Ward, and M.L. Watson, Phosphoinositide 3-kinase signalling in lung disease: leucocytes and beyond. *Immunology*, 2007. **121**(4): p. 448-61.
153. Remels, A.H., et al., Peroxisome proliferator-activated receptors: a therapeutic target in COPD? *Eur Respir J*, 2008. **31**(3): p. 502-8.
154. Remels, A.H., et al., Peroxisome proliferator-activated receptor expression is reduced in skeletal muscle in COPD. *Eur Respir J*, 2007. **30**(2): p. 245-52.
155. Bowler, R.P., P.J. Barnes, and J.D. Crapo, The role of oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. *Copd*, 2004. **1**(2): p. 255-77.
156. Ito, K., et al., Oxidative stress reduces histone deacetylase 2 activity and enhances IL-8 gene expression: role of tyrosine

- nitration. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004. **315**(1): p. 240-5.
157. Barnes, P.J., Theophylline for COPD. *Thorax*, 2006. **61**(9): p. 742-4.
158. Cosio, B.G., et al., Theophylline restores histone deacetylase activity and steroid responses in COPD macrophages. *J Exp Med*, 2004. **200**(5): p. 689-95.
159. Kirkham, P. and I. Rahman, Oxidative stress in asthma and COPD: antioxidants as a therapeutic strategy. *Pharmacol Ther*, 2006. **111**(2): p. 476-94.
160. Cortijo, J., et al., Effects of taurine on pulmonary responses to antigen in sensitized Brown-Norway rats. *Eur J Pharmacol*, 2001. **431**(1): p. 111-7.
161. Santangelo, F., J. Cortijo, and E. Morcillo, Taurine and the lung: which role in asthma? *Adv Exp Med Biol*, 2003. **526**: p. 403-10.
162. De Caro, L., et al., Pharmacokinetics and bioavailability of oral acetylcysteine in healthy volunteers. *Arzneimittelforschung*, 1989. **39**(3): p. 382-6.
163. Aruoma, O.I., et al., The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. *Free Radic Biol Med*, 1989. **6**(6): p. 593-7.
164. Cotgreave, I.A., N-acetylcysteine: pharmacological considerations and experimental and clinical applications. *Adv Pharmacol*, 1997. **38**: p. 205-27.
165. Behr, J., et al., Antioxidative and clinical effects of high-dose N-acetylcysteine in fibrosing alveolitis. Adjunctive therapy to

- maintenance immunosuppression. *Am J Respir Crit Care Med*, 1997. **156**(6): p. 1897-901.
166. De Flora, S., C. Grassi, and L. Carati, Attenuation of influenza-like symptomatology and improvement of cell-mediated immunity with long-term N-acetylcysteine treatment. *Eur Respir J*, 1997. **10**(7): p. 1535-41.
167. Murohara, T., et al., Cigarette smoke extract contracts isolated porcine coronary arteries by superoxide anion-mediated degradation of EDRF. *Am J Physiol*, 1994. **266**(3 Pt 2): p. H874-80.
168. Ortiz, J.L., et al., Direct effect of cigarette smoke on human pulmonary artery tension. *Pulm Pharmacol Ther*, 2009.
169. Holland, P.M., et al., Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991. **88**(16): p. 7276-80.
170. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 2001. **25**(4): p. 402-8.
171. Baranova, H., et al., Peculiarities of the GSTM1 0/0 genotype in French heavy smokers with various types of chronic bronchitis. *Hum Genet*, 1997. **99**(6): p. 822-6.
172. Lavigne, M.C. and M.J. Eppihimer, Cigarette smoke condensate induces MMP-12 gene expression in airway-like epithelia. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005. **330**(1): p. 194-203.
173. Behr, J., et al., Intracellular glutathione and bronchoalveolar cells in fibrosing alveolitis: effects of N-acetylcysteine. *Eur Respir J*, 2002. **19**(5): p. 906-11.

174. Meyer, A., et al., Intravenous N-acetylcysteine and lung glutathione of patients with pulmonary fibrosis and normals. *Am J Respir Crit Care Med*, 1995. **152**(3): p. 1055-60.
175. Meyer, A., R. Buhl, and H. Magnussen, The effect of oral N-acetylcysteine on lung glutathione levels in idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J*, 1994. **7**(3): p. 431-6.
176. Serrano-Mollar, A., et al., In vivo antioxidant treatment protects against bleomycin-induced lung damage in rats. *Br J Pharmacol*, 2003. **138**(6): p. 1037-48.
177. Baughman, R.P., et al., Overexpression of transforming growth factor-alpha and epidermal growth factor-receptor in idiopathic pulmonary fibrosis. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis*, 1999. **16**(1): p. 57-61.
178. Hagiwara, S.I., Y. Ishii, and S. Kitamura, Aerosolized administration of N-acetylcysteine attenuates lung fibrosis induced by bleomycin in mice. *Am J Respir Crit Care Med*, 2000. **162**(1): p. 225-31.
179. Rogers, D.F., et al., Oral N-acetylcysteine speeds reversal of cigarette smoke-induced mucous cell hyperplasia in the rat. *Exp Lung Res*, 1988. **14**(1): p. 19-35.
180. Rogers, D.F., et al., Oral N-acetylcysteine or S-carboxymethylcysteine inhibit cigarette smoke-induced hypersecretion of mucus in rat larynx and trachea in situ. *Eur Respir J*, 1989. **2**(10): p. 955-60.
181. Hellermann, G.R., et al., Mechanism of cigarette smoke condensate-induced acute inflammatory response in human bronchial epithelial cells. *Respir Res*, 2002. **3**: p. 22.
182. Richter, A., et al., Autocrine ligands for the epidermal growth factor receptor mediate interleukin-8 release from bronchial epithelial cells in response to cigarette smoke. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2002. **27**(1): p. 85-90.



183. Shao, M.X., T. Nakanaga, and J.A. Nadel, Cigarette smoke induces MUC5AC mucin overproduction via tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme in human airway epithelial (NCI-H292) cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2004. **287**(2): p. L420-7.
184. Shao, M.X., I.F. Ueki, and J.A. Nadel, Tumor necrosis factor alpha-converting enzyme mediates MUC5AC mucin expression in cultured human airway epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(20): p. 11618-23.
185. Takeyama, K., et al., Activation of epidermal growth factor receptors is responsible for mucin synthesis induced by cigarette smoke. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2001. **280**(1): p. L165-72.
186. Perrais, M., et al., Induction of MUC2 and MUC5AC mucins by factors of the epidermal growth factor (EGF) family is mediated by EGF receptor/Ras/Raf/extracellular signal-regulated kinase cascade and Sp1. *J Biol Chem*, 2002. **277**(35): p. 32258-67.
187. Baginski, T.K., et al., Cigarette smoke synergistically enhances respiratory mucin induction by proinflammatory stimuli. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2006. **35**(2): p. 165-74.
188. Ravid, T., et al., Epidermal growth factor receptor activation under oxidative stress fails to promote c-Cbl mediated down-regulation. *J Biol Chem*, 2002. **277**(34): p. 31214-9.
189. Dal Piaz, V. and M.P. Giovannoni, Phosphodiesterase 4 inhibitors, structurally unrelated to rolipram, as promising agents for the treatment of asthma and other pathologies. *Eur J Med Chem*, 2000. **35**(5): p. 463-80.
190. Palfreyman, M.N. and J.E. Souness, Phosphodiesterase type IV inhibitors. *Prog Med Chem*, 1996. **33**: p. 1-52.

191. Schreiber, S., et al., A randomized, placebo-controlled, phase II study of tetomilast in active ulcerative colitis. *Gastroenterology*, 2007. **132**(1): p. 76-86.
192. Hatzelmann, A. and C. Schudt, Anti-inflammatory and immunomodulatory potential of the novel PDE4 inhibitor roflumilast in vitro. *J Pharmacol Exp Ther*, 2001. **297**(1): p. 267-79.
193. Baillie, G.S., et al., Sub-family selective actions in the ability of Erk2 MAP kinase to phosphorylate and regulate the activity of PDE4 cyclic AMP-specific phosphodiesterases. *Br J Pharmacol*, 2000. **131**(4): p. 811-9.
194. Shushan, A., et al., The AG1478 tyrosine kinase inhibitor is an effective suppressor of leiomyoma cell growth. *Hum Reprod*, 2004. **19**(9): p. 1957-67.
195. Levitzki, A., Protein tyrosine kinase inhibitors as novel therapeutic agents. *Pharmacol Ther*, 1999. **82**(2-3): p. 231-9.
196. Iwase, N., et al., Differential effect of epidermal growth factor on serous and mucous cells in porcine airway submucosal gland. *Respir Physiol Neurobiol*, 2002. **132**(3): p. 307-19.

## VIII. ABREVIATURAS



- **ADN:** Ácido Desoxirribonucleico.
- **ADNc:** Ácido Desoxirribonucleico complementario.
- **ALI:** *Air-liquid interface*. Interfase aire líquido.
- **AMP:** Adenosina monofosfato.
- **AMPc:** Adenosina monofosfato cíclica.
- **ARNm:** Ácido Ribonucleico mensajero.
- **AT:** Angiotensina.
- **ATP:** Adenosina trifosfato.
- **BEBM:** *Bronchial Epithelial Basal Medium*. Medio básico para epitelio bronquial.
- **c- CLB:** *Casitas B- lineage lymphoma*. Linfoma *Casitas* de la línea B.
- **CEIC:** Comité Ético de Investigaciones Clínicas.
- **CSE:** *Cigarette smoke extract*. Extracto de humo de tabaco.
- **Ct:** *Threshold cycle*. Ciclo umbral.
- **Cys:** Cisteína.
- **DMEM:** *Dulbecco's modified Eagle Medium*. Medio de Eagle modificado por Dulbecco.
- **DMSO:** Dimetilsulfóxido.
- **DPI:** Difenileneidonio.
- **DTNB:** 5'- ditio-bis-2-ácido nitrobenzoico.
- **EDTA:** *Etylen diamine tetraacetil acid*. Ácido etilendiaminotetraacético.
- **EEUU:** Estados Unidos.
- **EGF:** *Epidermal Growth Factor*. Factor de crecimiento epidérmico.

- **EGFR:** *Epidermal Growth Factor Receptor*. Receptor del factor de crecimiento epidérmico.
- **ELISA:** *Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay*. Ensayo inmunosorbente ligado a enzima.
- **EPOC:** Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica.
- **ERK:** Otra forma de denominar la vía MAPK.
- **FAD:** dinucleótido de flavina-adenina.
- **γ-GT:** *gamma* Glutamil Transpeptidasa.
- **GCLC:** Glutamato cistein ligasa, subunidad catalítica.
- **GCLM:** Glutamato cistein ligasa, subunidad modificadora.
- **GPX:** Glutation peroxidasa.
- **GSH:** Glutation reducido.
- **GSSG:** Glutation oxidado.
- **GST:** Glutation S- transferasa.
- **HDAC:** Histona deacetilasa.
- **HRP:** *Horseradish peroxidase*. Peroxidasa de rábano.
- **IECA:** Inhibidor de enzima convertidor de angiotensina.
- **IFN:** Interferon.
- **IKK:** Inhibidor de la cinasa de NFκB.
- **IL:** Interleucina.
- **IP3:** Inositol trifosfato.
- **IP3K:** *IP3 kinase*. Cinasa del IP3.
- **JAK-STAT:** *Janus kinases or and Signal Transducers and Activators of Transcription*. Cinasas Janus y/o transductores de señal y activadores de transcripción.
- **LPO:** Lactoperoxidasa.
- **LPS:** Lipopolisacárido.

- **MAPK:** *Mitogen-activated protein kinase*. Proteína cinasa activadas por mitógenos.
- **MES:** N-morfolino- etanesulfónico.
- **MMP:** *Matrix metalloprotease*. Metaloproteasa de matriz.
- **NAC:** N- acetil cisteína.
- **NADPH:** nicotinamida adenina dinucleótido fosfato, forma reducida.
- **NFκB:** *Nuclear factor kappa B*. Factor nuclear kappa B.
- **Nrf2:** *Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2*. Factor nuclear derivado de eritrocitos-2.
- **PBS:** *Phosphate buffered saline*. Tampón salino fosfato.
- **PDE:** Fosfodiesterasa.
- **PDGF:** *Plateled derived growth factor*. Factor de crecimiento derivado de plaquetas.
- **pI:** Punto isoelectrico.
- **PKA:** *Protein kinase A*. Proteína cinasa A.
- **PKC:** *Protein kinase C*. Proteína cinasa C.
- **PMA:** *Polymaleic acid* (ácido polimaleico o Forbol 12-miristato 13-acetato).
- **Pro:** Prolina.
- **RAPP:** Receptor activado de la proliferación de peroxisomas.
- **ROS:** *Reactive Oxygen Species*. Especies reactivas de oxígeno.
- **RPMI:** *Royal Park Memory Institute*.
- **RT-PCR:** *Real-Time Polymerase Chain Reaction*. Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real.
- **RT:** Retrotranscripción.
- **Ser:** Serina.
- **SMG:** *Submucosal glands*. Glándulas submucosas.

- **SOD:** Superóxido dismutasa.
- **SOD EC:** Superóxido dismutasa extracelular.
- **TACE:** *Tumor necrosis  $\alpha$  converting enzyme*. Enzima convertidor de TNF $\alpha$ .
- **TGF:** *Transforming growth factor*. Factor de crecimiento transformante.
- **Thr:** Treonina.
- **TNB:** 5-tio-2-ácido nitrobenzoico.
- **TNF:** *Tumor necrosis factor*. Factor de necrosis tumoral.
- **Trx:** Tiorredoxina.
- **Tyr:** Tirosina.
- **UK:** Reino Unido.
- **UTP:** Uracilo trifosfato.
- **VIH:** Virus de la inmunodeficiencia humana.
- **VNTR:** *Variable number tandem repeats*. Repeticiones en tándem de número variable.