

VNIVERSITAT D VALÈNCIA

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOMEDICINA Y FARMACIA



**PAPEL DE LA TRANSICIÓN EPITELIAL
MESENQUIMAL EN EL REMODELADO
BRONQUIOLAR DE PACIENTES CON EPOC:
APROXIMACIÓN CLÍNICA Y FARMACOLÓGICA.**

TESIS DOCTORAL

PRESENTADA POR:

TERESA PEIRÓ SALVADOR

DIRIGIDA POR:

DR. JULIO CORTIJO GIMENO

DR. JAVIER MILARA PAYÁ

VALENCIA, 2013.



DR. D. JULIO CORTIJO GIMENO

Catedrático Numerario de Universidad

Departamento de Farmacología

Universidad de Valencia

Certifica:

Que la Tesis Doctoral presentada por Dña. Teresa Peiró Salvador, con el título:

**“PAPEL DE LA TRANSICIÓN EPITELIAL MESENQUIMAL EN EL REMODELADO BRONQUIOLAR DE
PACIENTES CON EPOC: APROXIMACIÓN CLÍNICA Y FARMACOLÓGICA”**

ha sido realizada bajo mi dirección y reúne los requisitos necesarios para su juicio y calificación

Y para que conste a los efectos oportunos, firmo el presente certificado.

En Valencia, 16 de abril de 2013.

Dr. Julio Cortijo Gimeno



DR. D. JAVIER MILARA PAYÁ

Doctor por la Universidad de Valencia

Investigador Miguel Servet

Certifica:

Que la Tesis Doctoral presentada por Dña. Teresa Peiró Salvador, con el título:

**“PAPEL DE LA TRANSICIÓN EPITELIAL MESENQUIMAL EN EL REMODELADO BRONQUIOLAR DE
PACIENTES CON EPOC: APROXIMACIÓN CLÍNICA Y FARMACOLÓGICA”**

ha sido realizada bajo mi dirección y reúne los requisitos necesarios para su juicio y calificación

Y para que conste a los efectos oportunos, firmo el presente certificado.

En Valencia, 16 de abril de 2013.

Dr. Javier Milara Payá.

La presente Tesis Doctoral, realizada en la Fundación de Investigación del Hospital General Universitario de Valencia, ha sido posible gracias a las siguientes ayudas:

- “Programa VALi+d para investigadores en formación” (Expediente: ACIF/2010/114). Consellería d’Educació, Cultura i Esport. Generalitat Valenciana.
- “Becas para estancias de becarios y contratados predoctorales en centros de investigación fuera de la Comunitat Valenciana” (Expediente: BEFPI/2012/062). Consellería d’Educació, Cultura i Esport. Generalitat Valenciana.
- “Ayuda para grupos de excelencia” (Expediente: Prometeo/2008/045). Consellería d’Educació, Cultura i Esport. Generalitat Valenciana.
- “Programa Nacional de Proyectos de Investigación Fundamental: Subprograma de Proyectos de Investigación Fundamental no Orientada” (Expediente: SAF2011-26443). Secretaría de Estado de Investigación, Desarrollo e Innovación. Secretaría General de Ciencia, Tecnología e Innovación. Dirección General de Investigación Científica y Técnica. Subdirección General de Proyectos de Investigación. Ministerio Español de Economía y Competitividad.

La presente tesis doctoral ha sido posible gracias a la colaboración y el apoyo de una serie de personas, a las que quiero expresar mi más sincero agradecimiento.

Mención muy especial merecen el Dr. Julio Cortijo Gimeno y el Dr. Javier Milara Payá, directores de este trabajo, por sus enseñanzas, guía y apoyo, y por la confianza depositada en mí durante este tiempo. Al Dr. Cortijo quiero agradecerle la gran oportunidad de formar parte de su equipo así como el apoyo mostrado en todo momento. Su experiencia, conocimientos y consejos han sido muy importantes para mi formación como investigadora. Al Dr. Javier Milara Payá mi gratitud por el entusiasmo que muestra y contagia en la investigación y por su capacidad de trabajo. A lo largo de estos años he aprendido mucho con él y quiero agradecerle sus sugerencias y aportaciones en la realización de este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio, por su ayuda, compañerismo y por todos los momentos de trabajo, de discusión y de ilusiones que han contribuido al día a día del laboratorio y a una buena amistad: Pilar, Adela, Patricia, Javi, Sonia, Gracia, Lucia. También a todos aquellos que formaron parte del grupo: David, Titi, Kaya, Silvia, Nerea, y a las nuevas incorporaciones, Pablo, Anselm, Esteban y Cristina.

A los investigadores de la Fundación de Investigación del Hospital General de Valencia (FIHGUV): al Dr. Manuel Mata e Irene; a la Dra. M^ª Dolores Miñana y a Amparo; a la Dra. Eloisa Jantus y a Sandra, Elena y Marta; a la Dra. Carmen Ivorra y a Sisco; así como a los compañeros de administración y servicios de la FIHGUV, por su ayuda y compañerismo en todo momento, contribuyendo al gran ambiente de trabajo de la FIHGUV.

También quiero manifestar aquí mi agradecimiento a los investigadores del Imperial College. Al Prof. Templer, Dr. Ces y Dr. Seddon, por la oportunidad que me brindaron durante una primera estancia y por el estímulo que ello supuso para iniciar los estudios de doctorado. Posteriormente, a la Prof. Lloyd, y a los Drs. Snelgrove y Gregory, porque durante mi estancia en su grupo me brindaron una excelente oportunidad de seguir aprendiendo; el trabajo y la colaboración con ellos durante mi doctorado ha supuesto un estímulo para continuar mi formación como investigadora.

A mi familia, especialmente a mis padres por su apoyo incondicional y por su estímulo constante. Al resto de mi familia, y en especial a mi hermana y a mi iaia, por estar siempre ahí, y por su interés en mi trabajo. A todos mis amigos por su interés, apoyo y respeto.

Y finalmente, aunque por supuesto no en último lugar, a Carlos, por su apoyo, comprensión y ánimo en todo momento.

A mis padres

A mi familia

A Carlos

ÍNDICE:

1. INTRODUCCIÓN.....	17
1.1 ENFERMEDAD PULMONAR OBSTRUCTIVA CRÓNICA: DEFINICIÓN.....	19
1.2 EPIDEMIOLOGÍA.....	20
1.2.1 PREVALENCIA.....	20
1.2.2 MORBILIDAD.....	23
1.2.3 MORTALIDAD.....	25
1.3 FACTORES DE RIESGO.....	26
1.3.1 EXPOSICIÓN A SUSTANCIAS INHALADAS.....	27
1.3.1.1 Tabaco.....	27
1.3.1.2 Exposición a otras sustancias inhaladas.....	28
1.3.2 FACTORES GENÉTICOS.....	29
1.3.3 ESTRÉS OXIDATIVO.....	30
1.3.4 OTROS FACTORES DE RIESGO.....	30
1.4 DIAGNÓSTICO Y DESARROLLO.....	32
1.4.1 DIAGNÓSTICO MEDIANTE ESPIROMETRÍA.....	34
1.4.2 ESTADIOS BASADOS EN LA SEVERIDAD DE LA ENFERMEDAD.....	35
1.5 PATOGENIA: CAMBIOS PATOLÓGICOS Y FISIOPATOLÓGICOS.....	36
1.6 APROXIMACIONES FARMACOLÓGICAS.....	41
1.6.1 APROXIMACIONES FARMACOLÓGICAS CLÁSICAS.....	42
1.6.2 NUEVAS APROXIMACIONES FARMACOLÓGICAS ANTI-INFLAMATORIAS.....	44
1.6.3 INHIBIDORES DE FOSFODIESTERASA 4: ROFLUMILAST.....	45
1.7 EL REMODELADO.....	51
1.7.1 REMODELADO DE LOS BRONQUIOLOS: FIBROSIS PERI-BRONQUIOLAR.....	53
1.7.2 TRANSICIÓN EPITELIAL MESENQUIMAL.....	56
1.7.2.1 Definición.....	56
1.7.2.2 Mecanismos implicados en la TEM.....	58
1.8 IMPORTANCIA DEL HUMO DE TABACO EN EL REMODELADO.....	60
1.8.1 COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL HUMO DE TABACO.....	61
1.8.2 HUMO DE TABACO Y CÉLULAS EPITELIALES: PAPEL DE LA TEM.....	62
1.9 POSIBLE PAPEL DE LA TEM EN EL REMODELADO BRONQUIOLAR ASOCIADO A LA EPOC.....	64
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	67
2.1 HIPÓTESIS.....	69
2.2 OBJETIVOS.....	70

3. METODOLOGÍA.....	71
3.1 MATERIAL.....	73
3.1.1 FÁRMACOS.....	73
3.1.2 ESTÍMULO: EHT.....	75
3.1.3 REACTIVOS UTILIZADOS.....	76
3.1.4 TEJIDO PULMONAR HUMANO.....	77
3.2 MÉTODOS.....	78
3.2.1 CULTIVOS CELULARES.....	78
3.2.1.1 Aislamiento y cultivo primario de células epiteliales bronquiales.....	78
3.2.1.2 Cultivo de células epiteliales bronquiales en ALL.....	80
3.2.2. HISTOLOGÍA.....	82
3.2.2.1 Tinción de <i>transwell inserts</i> con hematoxilina eosina.....	82
3.2.2.2 Inmunohistoquímica.....	83
3.2.2.3 Inmunofluorescencia.....	84
3.2.2.4 Tinción de F-actina.....	85
3.2.3 DISEÑO EXPERIMENTAL.....	85
3.2.3.1 Preparación del EHT.....	85
3.2.3.2 Estimulación <i>in vitro</i> de CEBH.....	86
3.2.4 ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN GÉNICA: TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR.....	88
3.2.4.1 Extracción de ARN total y cuantificación.....	88
3.2.4.2 Retrotranscripción inversa.....	89
3.2.4.3 RT-PCR a tiempo real.....	90
3.2.5 ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN PROTEICA.....	92
3.2.5.1 Tecnología de microchips de proteínas Zeptosens.....	92
3.2.5.2 Western Blot.....	95
3.2.6 RESISTENCIA TRANS-EPITELIAL.....	97
3.2.7 MEDIDA DE LA PRODUCCIÓN INTRACELULAR DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO.....	97
3.2.8 ENSAYOS ELISA PARA TGF- β 1, AMPc y MMP-9.....	98
3.2.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	99
4. RESULTADOS	101
4.1 ESTUDIO I. EVALUACIÓN DE LA PRESENCIA DE TEM EN EL REMODELADO BRONQUIOLAR ASOCIADO A LA EPOC: APROXIMACIÓN CLÍNICA.....	103
4.1.1. LOS MARCADORES CELULARES DE TEM ESTÁN AUMENTADOS EN CÉLULAS EPITELIALES BRONQUIALES PRIMARIAS DE FUMADORES Y PACIENTES EPOC.....	103
4.1.2. EL EHT INDUCE TEM EN CEBH.....	110

4.1.3. LA TEM INDUCIDA POR EHT ESTÁ PARCIALMENTE MEDIADA POR UN AUMENTO DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO Y UNA DISMINUCIÓN DE AMPc.....	113
4.1.4. TGF-β1, ERK1/2 y SMAD3 MEDIAN LA TEM INDUCIDA POR EHT EN CEBH.....	117
4.2 ESTUDIO II. APROXIMACIÓN FARMACOLÓGICA A LA TEM ASOCIADA AL REMODELADO BRONQUIOLAR EN LA EPOC UTILIZANDO EL iPDE4 RNO.	120
4.2.1 RNO INHIBE LA TEM INDUCIDA POR EHT EN CEBH.....	120
4.2.2 RNO INHIBE LAS RUTAS DE SEÑALIZACIÓN INVOLUCRADAS EN LA TEM INDUCIDA POR EHT EN CEBH.	122
4.2.3 LAS CÉLULAS EPITELIALES BRONQUIALES PRIMARIAS AISLADAS DE FUMADORES Y PACIENTES EPOC MUESTRAN UN AUMENTO DE LOS MARCADORES MESENQUIMALES QUE CORRELACIONA CON LA FUNCIÓN PULMONAR.	124
4.2.4 EL TRATAMIENTO <i>IN VITRO</i> DE CÉLULAS EPITELIALES BRONQUIALES PRIMARIAS DE FUMADORES Y PACIENTES EPOC CON RNO ATENÚA LOS MARCADORES DE TEM.....	126
5. DISCUSIÓN.....	129
5.1 ESTUDIO I. LA TEM ESTÁ AUMENTADA EN PACIENTES CON EPOC E INDUCIDA POR EL EHT.	131
5.2 ESTUDIO II: RNO INHIBE LA TEM INDUCIDA POR HUMO DE TABACO EN LA EPOC.	137
6. CONCLUSIONES	141
7. BIBLIOGRAFÍA.....	145
8. ÍNDICE DE ABREVIATURAS	157
9. ANEXO.....	165
9.1 DICTAMENES: COMISION DE INVESTIGACIÓN Y COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLINICA CEIC.	167
9.2 PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS DOCTORAL.....	175

1. INTRODUCCIÓN

1.1 ENFERMEDAD PULMONAR OBSTRUCTIVA CRÓNICA: DEFINICIÓN.

La Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC) se caracteriza principalmente por una limitación en el flujo aéreo progresiva, no completamente reversible y asociada a una serie de cambios patológicos en el pulmón. Además de un componente pulmonar principal, presenta también una serie de efectos extra-pulmonares significativos que contribuyen a que sea considerada una enfermedad heterogénea con diversas manifestaciones clínicas, tanto pulmonares como sistémicas [1].

La iniciativa *Global para la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (Global Obstructive Lung Disease, GOLD)*, en la que colaboran tanto el *National Heart, Lung and Blood Institute (NHLBI)* de Estados Unidos (EEUU) como la *Organización Mundial de la Salud (OMS)*, fue creada para promover el conocimiento de la EPOC, mejorar tanto su prevención como su tratamiento y crear una guía de directrices para su manejo.

En el último informe del proyecto GOLD, revisado en 2011, se define la EPOC como “una enfermedad común, prevenible y tratable, caracterizada por una limitación persistente en el flujo aéreo que es normalmente progresiva y está asociada a una respuesta inflamatoria crónica aumentada, en las vías aéreas y en el pulmón, a partículas nocivas o gases. Las exacerbaciones y comorbilidades contribuyen a la severidad global de la enfermedad en pacientes individuales”[2].

Es importante resaltar que, a pesar de que la EPOC se define como una enfermedad prevenible y tratable, las opciones terapéuticas existentes tienen un limitado efecto en su progresión y, por ello, la búsqueda de nuevas estrategias para prevenir su desarrollo constituye una prioridad.

Actualmente existen importantes evidencias que apuntan a un papel clave de las vías aéreas periféricas en el desarrollo y en las manifestaciones clínicas de la EPOC, ya que los cambios patológicos de los bronquiolos tienen consecuencias críticas en la progresión de la enfermedad [3]. De hecho, los bronquiolos (con diámetro interno inferior a 2 mm) son responsables del 60% de la resistencia total en la EPOC y las terapias inhaladas actuales tienen una limitada eficacia ya que se depositan mayoritariamente en las vías aéreas proximales [4-7]. Por ello, el estudio del origen y de los mecanismos implicados en el desarrollo del remodelado bronquiolar y, en particular, de la fibrosis peribronquiolar, podría mejorar el entendimiento de este proceso clave en la EPOC. Además, este conocimiento podría contribuir al desarrollo de opciones terapéuticas dirigidas al remodelado bronquiolar, que mejorasen la limitación del

flujo aéreo y tuviesen un impacto importante en el desarrollo y en el carácter progresivo de la EPOC.

1.2 EPIDEMIOLOGÍA.

La EPOC es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad global [2]. De hecho, aunque actualmente ocupa el cuarto lugar en cuanto a mortalidad, la OMS prevé que se convertirá en la tercera causa de muerte en el año 2030 [8]. Estas previsiones, así como el aumento en la carga social y económica asociada [9], sugieren que la EPOC se convertirá en uno de los principales desafíos sanitarios de las próximas décadas.

Estas previsiones se basan en indicadores actuales como la continua exposición a factores de riesgo, entre los que destaca el tabaco principalmente pero también otras sustancias inhaladas especialmente en países en desarrollo [10]. Cabe resaltar que, debido al lento desarrollo de esta enfermedad, aunque se evitase la exposición actual a los factores de riesgo se estima que el daño de la EPOC continuaría durante décadas [1].

Otro indicador está relacionado con el cambio actual en el perfil demográfico, que se caracteriza por el progresivo incremento en la proporción de población de edad avanzada [2]. Este envejecimiento de la población tiene y tendrá un impacto en la epidemiología de esta enfermedad, ya que se ha descrito que la EPOC puede ser consecuencia de una exposición acumulada durante años a los distintos factores de riesgo [11].

1.2.1 PREVALENCIA.

En general, la prevalencia de la EPOC está directamente relacionada con el consumo de tabaco, que hoy en día es considerable ya que el número de fumadores se estima en aproximadamente 1,1 mil millones en todo el mundo [12]. Este aumento de la prevalencia afecta especialmente a países en desarrollo, donde ha aumentado el consumo de tabaco y han disminuido otras causas de muerte, como las infecciones severas [13]. En estos países también se debe tener en cuenta la creciente exposición a otras sustancias inhaladas, que también contribuye al aumento en la prevalencia [10].

Con respecto al tabaquismo, existen estudios que describen una mayor prevalencia de la EPOC en fumadores y ex-fumadores en comparación a no fumadores. Además, también se describe una mayor prevalencia en hombres que en mujeres y en personas mayores de 40 años, comparado con personas más jóvenes [14, 15]. De hecho, la prevalencia de la EPOC en la

población general está estimada en un 1%, pero aumenta considerablemente a valores de 8-10% en personas de 40 años en adelante [14].

Existen distintos estudios que han investigado la prevalencia y la distribución global de la EPOC, entre los que destacan el estudio *Burden of Obstructive Lung Disease* (BOLD) [16] y el *Proyecto Latinoamericano de Investigación en Obstrucción Pulmonar* (Proyecto PLATINO) [17]. Los resultados del estudio BOLD, llevado a cabo en distintos países, muestran importantes diferencias en cuanto a la prevalencia de la EPOC, con datos que oscilan entre un 9% en Reykjavik y un 22% en Ciudad del Cabo (en hombres) y entre un 4% en Hannover y un 17% en Ciudad del Cabo (en mujeres) [16].

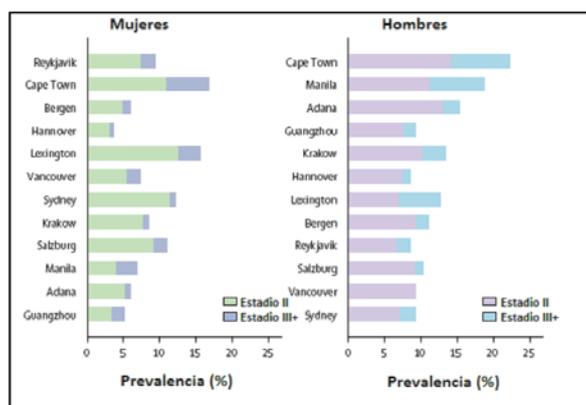


Figura 1. Análisis internacional de la variación en la prevalencia de la EPOC según el estudio BOLD (Tabla adaptada de Buist AS, 2007 [16]). Prevalencia de los estadios II y III (o mayores) de la EPOC por género y lugar.

El proyecto PLATINO examinó la prevalencia de la limitación en el flujo aéreo post-broncodilatación en personas mayores de 40 años en cinco ciudades sudamericanas. Los resultados mostraron diferencias de prevalencia entre países, entre individuos de edades diferentes (con mayor prevalencia por encima de los 60 años), y también entre hombres y mujeres (mayor en hombres) [17].

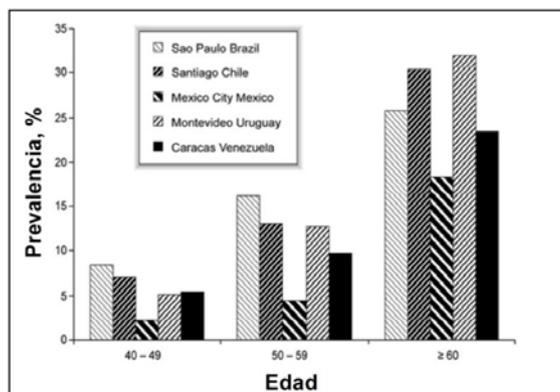


Figura 2. Análisis de la prevalencia de la EPOC según el estudio PLATINO (Tabla adaptada de Menezes AM, 2005 [17]). El proyecto PLATINO examinó la prevalencia de la limitación en el flujo aéreo post-broncodilatación en personas mayores de 40 años en cinco ciudades sudamericanas.

Éstos y otros estudios están aportando nuevos datos en relación a la prevalencia de la EPOC pero se debe tener en cuenta una serie de consideraciones que reflejan la complejidad del análisis de la prevalencia de esta enfermedad.

Por una parte, la existencia de definiciones imprecisas y variables de la EPOC dificulta la estimación de la incidencia así como la comparación entre diferentes países. También se debe tener en cuenta que existen muchas zonas del mundo, especialmente en África y Asia, de las que se dispone de datos limitados. Por todo ello, los datos de prevalencia pueden mostrar importantes variaciones debido a diferencias en definiciones, métodos de encuesta, criterios diagnósticos y aproximaciones analíticas [14].

En línea con estas ambigüedades también cabe resaltar que actualmente se considera que la EPOC es una enfermedad infradiagnosticada [18]. De hecho, se ha descrito que aproximadamente un 60-85% de individuos, en su mayoría con EPOC leve y moderada, no han sido diagnosticados [19]. Un estudio llevado a cabo en España describe que un 10% de los adultos de edades comprendidas entre 40 y 80 años de este país presentan EPOC pero sólo un 27% de ellos ha sido previamente diagnosticado [19]. Éstos datos, y otros similares de otros países [14], reflejan el problema extendido de la falta de reconocimiento de la EPOC y, por consiguiente, del infradiagnóstico que esto conlleva [20].

Otro inconveniente relacionado con los datos de prevalencia de la EPOC se refiere a la definición GOLD, aceptada actualmente. Esta definición, utilizada por la mayoría de los

estudios, establece la limitación del flujo aéreo presente en la EPOC con un valor umbral de 0,70 que corresponde al ratio VEF_1/CVF postbroncodilatador (VEF_1 : Volumen espiratorio forzado en el primer segundo; CVF : Capacidad vital forzada) [2]. Sin embargo, la utilización de este ratio es controvertida ya que el ratio disminuye con la edad y puede llevar a un sobrediagnóstico de EPOC en personas de edad avanzada [21].

Por ello, aunque actualmente se acepta que alrededor de 210 millones de personas en todo el mundo padecen EPOC [22], esta estimación debe ser considerada con cautela por las limitaciones existentes en los análisis de prevalencia.

1.2.2 MORBILIDAD.

Las graves consecuencias de la EPOC en la salud del paciente afectan negativamente a su calidad de vida [1], lo que conlleva una importante morbilidad asociada que incluye visitas al médico, a urgencias y hospitalizaciones [2]. Los datos de morbilidad actuales apuntan a que la EPOC ocupará el séptimo lugar en el año 2030 en cuanto a enfermedades con una mayor morbilidad y carga asociada [11]. La morbilidad asociada a la EPOC aumenta con la edad [16, 17], siendo considerada la enfermedad más cara de las enfermedades crónicas que afectan a pacientes de edad avanzada [1]. Además, los costes directos aumentan con la severidad, evaluada con valores de VEF_1 [23].

El transcurso crónico y progresivo de la EPOC se ve alterado por episodios de empeoramiento clínico, que afectan negativamente a la progresión de la enfermedad, conocidos como exacerbaciones. Las exacerbaciones, frecuentemente desencadenadas por infecciones víricas o bacterianas [24], representan una amplificación de la respuesta inflamatoria. Durante estos episodios de agudización se produce una mayor hiperinsuflación y una reducción del flujo aéreo que contribuyen a una mayor disnea [25]. Además de esta variación en la disnea basal, también hay un aumento de tos y/o producción de esputo, suficientes para requerir un cambio en el tratamiento e incluso la hospitalización. Las exacerbaciones constituyen una de las principales causas de morbilidad relacionadas con la EPOC ya que aceleran la progresión de la enfermedad y, por ello, conllevan un gran coste [13]. De hecho, las hospitalizaciones debidas a episodios agudos de exacerbación son responsables de la mayor parte del gasto relacionado con la EPOC [1].

Introducción

La EPOC, que afecta principalmente al pulmón, también se caracteriza por presentar manifestaciones sistémicas que pueden desencadenar o empeorar condiciones de comorbilidad, como: problemas cardiovasculares, disfunción y pérdida muscular, anemia, osteoporosis, problemas gastrointestinales y depresión o ansiedad [26].

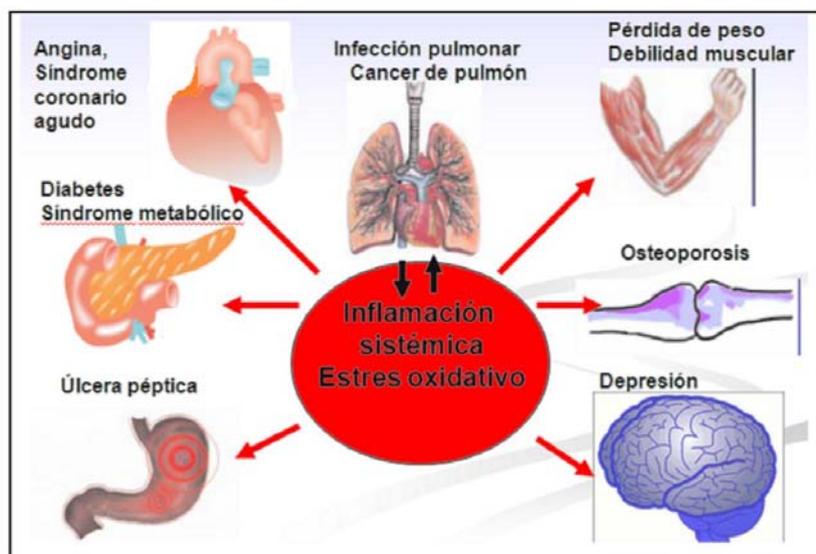


Figura 3. Principales manifestaciones sistémicas de la EPOC. La EPOC se caracteriza por un componente pulmonar principal y también por una serie de efectos extrapulmonares significativos que contribuyen a que sea considerada una enfermedad heterogénea con diversas manifestaciones clínicas, tanto pulmonares como sistémicas. En la figura se muestran las principales manifestaciones sistémicas así como los distintos órganos afectados.

Además, la morbilidad de la EPOC puede estar afectada por otra condición crónica, conocida como comorbilidad, que puede tener un impacto en la salud del paciente o puede interferir negativamente en el manejo de la EPOC. Actualmente se considera que la enfermedad cardiovascular y el cáncer de pulmón son las principales comorbilidades de la EPOC [27]. De hecho, aunque la principal causa de mortalidad de pacientes con EPOC severa suele ser el fallo respiratorio [27], las causas más comunes de mortalidad en los pacientes con EPOC leve y moderada son: enfermedad cardiovascular (25%), cáncer de pulmón (20-33%) y otras causas (30%) [28]. Por tanto, la EPOC está muy asociada a la enfermedad cardiovascular, en concreto a la insuficiencia cardíaca crónica y existen evidencias que apuntan al valor VEF_1 como un marcador importante de morbilidad y mortalidad, particularmente cardiovascular [28]. La EPOC también ha sido asociada con el cáncer de pulmón, ya que ambas enfermedades comparten el tabaco como factor de riesgo principal. La presencia de enfermedad pulmonar

obstructiva moderada o severa se considera un indicador de un posible cáncer de pulmón a largo plazo [1]. Estos trastornos afectan al desarrollo de la enfermedad, aumentan el riesgo de hospitalización y son responsables de un porcentaje importante del gasto sanitario relacionado con la EPOC [27, 29].

1.2.3 MORTALIDAD.

En los últimos años, la EPOC ha adquirido relevancia como causa de mortalidad, escalando posiciones desde un sexto lugar en 1990 al cuarto en el año 2000 y, según las estimaciones actuales, ocupará un previsible tercer lugar en el año 2030 [8].

De hecho, tal y como se muestra en la siguiente figura, la tasa de mortalidad debida a la EPOC aumentó de manera considerable en Estados Unidos, entre los años 1970 y 2002, a diferencia de otras enfermedades que presentan una disminución en la mortalidad a lo largo de ese mismo periodo [30].

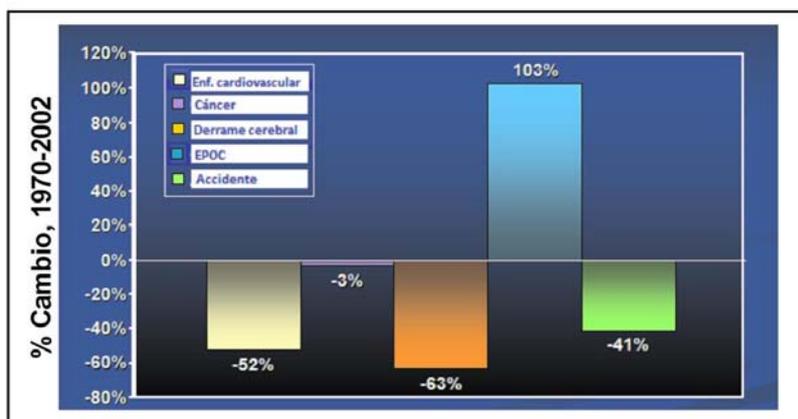


Figura 4. Porcentaje de cambio en los datos de mortalidad atribuidos a las seis principales causas de muerte en EEUU entre 1970-2002. (Figura adaptada de Jemal A, 2005 [30]). En la tabla se reflejan los cambios en mortalidad atribuidos a las seis principales causas de mortalidad en EEUU: Enfermedad cardiovascular, cáncer, derrame cerebral, EPOC y accidentes.

Estas estimaciones apuntan a que en el año 2030 la EPOC será la causa directa subyacente de un 7,8% de todas las muertes. Además, representará un 27% de las muertes relacionadas con el tabaco, sólo superado por el cáncer (33%) y por las enfermedades cardiovasculares (29%) [12]. Este previsible aumento de la mortalidad se justificaría por un aumento del tabaquismo, la reducción de otras enfermedades mortales, la creciente

exposición a otros factores de riesgo y el envejecimiento de la población, tal y como se ha descrito anteriormente [2].

En el estudio *Global Burden of Disease Study* (GBD) se estimó que la EPOC causa la muerte de 2,9 millones de personas anualmente [31], pero se debe tener en cuenta que, en general, los datos de mortalidad subestiman la EPOC como causa de muerte [1]. Esta subestimación se debe a que, tal y como se ha descrito anteriormente, las causas de muerte más frecuentes en pacientes con EPOC son enfermedad cardiovascular, cáncer de pulmón y fallo respiratorio. Por ello, en ocasiones, se subestima a la EPOC atribuyendo la mortalidad por ejemplo a *cor pulmonale*, cuando en realidad esta condición ha sido desencadenada por la EPOC [1].

1.3 FACTORES DE RIESGO.

En general, existe consenso en considerar que el tabaco es el factor de riesgo principal y más habitual de la EPOC [32]. Sin embargo, no todos los fumadores desarrollan una EPOC clínicamente significativa, lo que sugiere la existencia de factores genéticos que pueden modificar los riesgos de cada individuo [33]. Además, existen estudios que describen EPOC en personas no fumadoras [10, 34] por lo que otros factores de riesgo pueden contribuir a esta enfermedad y actualmente se está resaltando su relevancia, ya que son responsables de un número creciente de casos especialmente en países en desarrollo [10, 35].

Por ello, actualmente se considera la EPOC una enfermedad compleja, consecuencia de una interacción entre factores genéticos y ambientales, a la que contribuyen tanto la predisposición genética del individuo a la enfermedad como la exposición que éste ha sufrido a diversos estímulos a lo largo de su vida.

La identificación de los factores de riesgo es clave para el desarrollo de estrategias de prevención y tratamiento. En la siguiente figura se resaltan los principales factores de riesgo de la EPOC [36]. Éstos y otros factores se detallan a continuación.

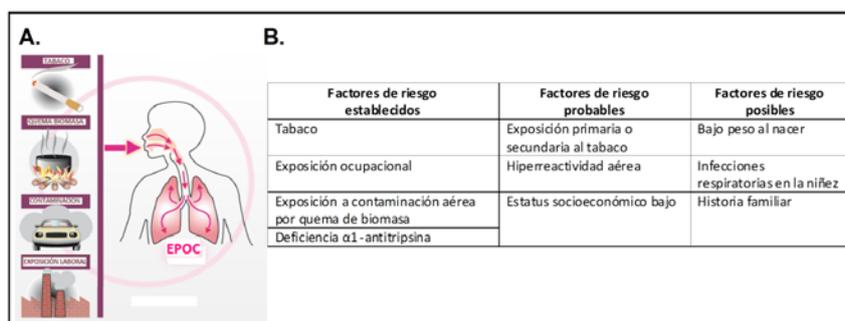


Figura 5. Factores de riesgo que pueden contribuir a la EPOC (Tabla adaptada de Tager IB et al, 1988 [36]). A. Factores de riesgo debidos a la exposición a partículas inhaladas: tabaco, contaminación en espacios confinados, contaminación ambiental y contaminación ocupacional. B. Clasificación de los factores de riesgo de la EPOC como: factores de riesgo establecidos, factores de riesgo probables y factores de riesgo posibles.

1.3.1 EXPOSICIÓN A SUSTANCIAS INHALADAS.

Dentro de la amplia variedad de sustancias inhaladas a las que puede estar expuesto un individuo a lo largo de su vida, se ha descrito que la exposición al humo de tabaco [37] y la exposición ocupacional a agentes químicos [38, 39] pueden causar EPOC por si solas. Además, una exposición conjunta a estos dos factores multiplica el riesgo de EPOC [40, 41].

1.3.1.1 Tabaco.

El tabaco es el factor de riesgo más importante de la EPOC [32]. Aproximadamente la mitad de los fumadores desarrollan cierta obstrucción del flujo aéreo y alrededor de un 10-20% desarrollan una EPOC clínicamente significativa [42]. Sin embargo, y aunque es un dato muy citado, recientemente se ha indicado que puede llevar a error ya que una mayor proporción de fumadores podría clasificarse como EPOC según los criterios actuales [43]. En esta línea, existe evidencia de que individuos, con un hábito de fumar continuo y prolongado y que vivan lo suficiente, desarrollarán una limitación en el flujo aéreo así como una anomalía en la función pulmonar, cumpliendo así los criterios diagnósticos de EPOC [43, 44].

La probabilidad de muerte por EPOC en fumadores es 12-13 veces mayor que en no fumadores, siendo más del 80% de las muertes de EPOC directamente atribuidas al tabaquismo [32]. Los fumadores presentan una mayor prevalencia de síntomas respiratorios y, en consecuencia, una mayor disfunción pulmonar, que se refleja en una mayor mortalidad [45]. En la mayoría de los fumadores, la tasa de disminución de VEF₁ es de 30-45 mL/año,

durante la vida adulta, comparada con la de 20-30 mL/año para no fumadores. Sin embargo, existe un porcentaje de fumadores especialmente susceptibles, por presentar una tasa de disminución de 80-100 mL/año [46], que apunta también a la influencia de factores genéticos en el desarrollo de EPOC en fumadores [47].

Además, el riesgo de desarrollo de EPOC en fumadores está relacionado con la dosis, ya que existe evidencia de una relación dosis-respuesta entre la severidad de la enfermedad pulmonar y el número de paquetes fumados por año [37]. Otros factores que también influyen en la mortalidad son la edad a la que se comienza a fumar o la continuidad en el hábito de fumar. Además, también se ha descrito que una exposición pasiva al humo de tabaco puede contribuir a la EPOC [48].

1.3.1.2 Exposición a otras sustancias inhaladas.

Existen otros factores de riesgo considerados cada vez más relevantes, como la exposición laboral a agentes químicos y la contaminación del aire por la quema de biomasa, que han sido asociados con el desarrollo de obstrucción del flujo aéreo y síntomas respiratorios crónicos [49].

- La **exposición laboral** a agentes químicos, polvo y vapores es un factor de riesgo subestimado [38, 39]. Los resultados del análisis *Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III)*, basado en la población de EEUU, señalaron que la EPOC debida a una exposición laboral a sustancias inhaladas era del 19% en general, y del 31% en personas no fumadoras [50]. Se calcula que la exposición laboral podría explicar hasta un 10-20% de discapacidad pulmonar o síntomas relacionados con la EPOC [51].
- La **contaminación del aire en espacios confinados**, debido a la quema de madera, estiércol, restos de poda o carbón en hogueras o estufas para fines domésticos, es un factor de riesgo importante. Aproximadamente 3 mil millones de personas utilizan biomasa o carbón como su fuente principal de energía para cocinar, para la calefacción u otras necesidades domésticas por lo que la población en riesgo es muy alta [52]. En particular, está asociada con un aumento del riesgo de EPOC en países en desarrollo y especialmente en mujeres. En estos países aproximadamente un 50% de las muertes debidas a EPOC son atribuidas a esta contaminación y, de este porcentaje, un 75% de los casos son en mujeres [53].
- El papel de la **contaminación urbana del aire** como causa de EPOC parece un factor de riesgo bajo comparado con el tabaco. Sin embargo, la polución del aire debida

principalmente a las emisiones de vehículos de motor en las ciudades ha sido asociada con un detrimento en la función respiratoria [54]. Aunque existen evidencias de una asociación entre concentraciones elevadas de contaminación urbana y exacerbaciones o empeoramiento en EPOC ya existente [55], no hay aun evidencias que la asocien con nuevos casos de EPOC.

1.3.2 FACTORES GENÉTICOS.

El factor de riesgo genético mejor establecido es la deficiencia en α -1 antitripsina, un trastorno genético que predispone a la EPOC y está presente en 1-2% de individuos con esta enfermedad [56]. La α -1 antitripsina pertenece a una familia de proteínas que desempeñan un papel fundamental en el mantenimiento del balance proteasa-antiproteasa [57]. Concretamente, la α -1 antitripsina inhibe la elastasa neutrofílica (NE), constituyendo un importante mecanismo de defensa frente al daño proteolítico producido en el pulmón por esta enzima. La mutación de α -1 antitripsina produce su polimerización y retención, disminuyendo su concentración en el suero y, por tanto, la protección frente a la actividad proteolítica, resultando en un mayor riesgo de enfisema [58]. Esta severa deficiencia está asociada con un desarrollo prematuro y acelerado de enfisema y un empeoramiento en la función pulmonar tanto en fumadores como en no fumadores, aunque el declive de la función pulmonar es mayor en fumadores [56].

Existe evidencia de una importante influencia de los factores genéticos en el desarrollo de EPOC en personas fumadoras [47], ya que se ha descrito un riesgo significativo de limitación en el flujo aéreo en hermanos fumadores de pacientes con EPOC severa, sugiriendo que la genética así como factores ambientales podrían influir en esta susceptibilidad [59].

En los últimos años se han desarrollado múltiples iniciativas para identificar genes implicados en la EPOC [60-62], identificándose regiones asociadas con la susceptibilidad o con fenotipos específicos, que contribuyen a considerar a la EPOC como una enfermedad de etiología variable, poligénica y caracterizada por la presencia de diversos fenotipos.

Tabla 1. Genes asociados con índices espirométricos de función pulmonar (Tabla adaptada de Hall IP, 2013 [62]). Aquellos genes resaltados en negrita han sido asociados a la EPOC *per se*.

Genes asociados con índices espirométricos de función pulmonar.			
MF	ARMC2	MMP15	AGER
AP2	NCR3	CFDP1	HHIP
TGFB2	ZKSCAN3	KCNE2	FAM13A
HDAC4	CDC123	TNS1	ADAM19
RARB	C10orf11	THSD4	GPR126
MECO	LRP1	GSTCD	PITCH1
SPATA9	CCDC38	HTR4	IREB2/CHRNA3/CHRNA5

1.3.3 ESTRÉS OXIDATIVO.

El estrés oxidativo juega un papel importante en la patogenia de la EPOC [63]. Los pulmones están expuestos a oxidantes exógenos del tabaco y endógenos, liberados por células inflamatorias activadas como macrófagos y neutrófilos [64]. La existencia de un desequilibrio en el balance entre oxidantes y antioxidantes provoca estrés oxidativo, que daña directamente al pulmón y también activa mecanismos moleculares que inician un proceso de inflamación.

1.3.4 OTROS FACTORES DE RIESGO.

Edad. El envejecimiento está asociado a diversas enfermedades crónicas, entre las que destacan las enfermedades respiratorias crónicas por su frecuencia y severidad en personas de edad avanzada [1]. La edad está asociada a un envejecimiento de las vías aéreas y del parénquima que presenta similitudes con alguno de los cambios estructurales de la EPOC [65]. Sin embargo, no está claro si la edad es un factor de riesgo por sí mismo o porque refleja la suma de las exposiciones sufridas a lo largo de toda la vida del individuo.

Género. En el pasado, muchos estudios indicaban una mayor prevalencia y mortalidad en hombres que en mujeres. Actualmente, los datos en países desarrollados son más parecidos; como ejemplo, en EEUU un 50,3% de las muertes atribuidas a EPOC en el año 2000 fueron mujeres [66]. Aunque la tasa de mortalidad sigue siendo algo inferior, estos datos seguramente reflejen un aumento del tabaquismo en mujeres así como de otros factores de riesgo normalmente atribuidos al género femenino. Por ejemplo, en países en desarrollo las

mujeres están más expuestas al humo causado por la quema de biomasa con fines domésticos [53].

Existen estudios que incluso sugieren que las mujeres son más susceptibles a los efectos del tabaco [67], describiéndose una relación dosis-respuesta diferente entre hombres y mujeres, especialmente en bajos niveles de tabaquismo [68]. Las mujeres podrían sufrir un mayor daño y declive en la función pulmonar ya que, debido a diferencias en el tamaño pulmonar y en la mecánica, sus vías aéreas podrían ser más reactivas [69].

Estatus socioeconómico. El riesgo de desarrollar EPOC está inversamente relacionado con el estatus socioeconómico [70]. Actualmente es un factor a tener en cuenta y, a pesar de ser considerado un factor de riesgo independiente, se piensa que probablemente sea indicativo de factores relacionados con esta condición (exposición a sustancias inhaladas, mala nutrición, infecciones respiratorias durante la infancia etc.) que contribuyan de forma colectiva.

Crecimiento y desarrollo pulmonar. Existen factores de la edad temprana (procesos que ocurren durante la gestación o nacimiento y exposiciones en la infancia o adolescencia) que afectan al crecimiento pulmonar y tienen el potencial de aumentar el riesgo de EPOC, siendo tan importantes como un intenso tabaquismo en la predicción de la función pulmonar en la vida adulta [71]. Por ejemplo, un bajo peso en el nacimiento es un factor de riesgo independiente, asociado con un pobre crecimiento y función pulmonar durante la infancia y la etapa adulta [72] y confirmándose una asociación positiva con el VEF_1 en la etapa adulta [73]. Otros factores como fumar durante el embarazo o sufrir asma o infecciones respiratorias durante la infancia han sido asociados significativamente con un VEF_1 reducido [71].

Presencia de otras enfermedades respiratorias.

- El **asma** es la enfermedad que más similitudes clínicas presenta con la EPOC, aunque la respuesta inflamatoria tiene marcadas diferencias [74]. El asma ha sido asociada con la obstrucción en el flujo aéreo y la pérdida de función pulmonar que pueden desencadenar EPOC [10], describiéndose que individuos fumadores con asma presentan un mayor declive en la función pulmonar que aquellos sin asma [75].
- Las **infecciones** pueden también contribuir a la patogenia y progresión de la EPOC [76], en la colonización bacteriana asociada con la inflamación de las vías aéreas [77] y, especialmente, durante las exacerbaciones [78].

- En la **tuberculosis** se desarrolla una obstrucción del flujo aéreo con manifestaciones clínicas similares a la EPOC [79]. Resultados del estudio Platino indicaron que tanto la prevalencia como el riesgo de EPOC eran mayores en pacientes con una historia de tuberculosis previa [17]. También puede formar parte del diagnóstico diferencial de la EPOC en áreas de alta prevalencia [80], así como constituir una potencial comorbilidad.

1.4 DIAGNÓSTICO Y DESARROLLO.

En los últimos años, la definición de la EPOC ha sufrido diversas modificaciones. Desde definiciones previas, basadas en la bronquitis crónica y en el enfisema, a la actual, que excluye estos términos y se centra en la limitación irreversible del flujo aéreo como la anormalidad principal de la EPOC [2]. De hecho, desde la publicación de Fletcher y Peto, donde se describía el declive acelerado en VEF_1 y su utilidad diagnóstica en fumadores susceptibles a esta enfermedad [81], esta característica ha ido adquiriendo relevancia hasta considerarse clave en la definición actual de la EPOC.

La EPOC es una enfermedad progresiva que puede ser diagnosticada en cualquier etapa de la enfermedad [2]. En general, los síntomas clave de la EPOC son: disnea crónica y progresiva, tos y producción de esputo [32]. La tos y la producción de esputo son consecuencia de un aumento en la producción de moco y de una disminución del aclaramiento mucociliar. También se desencadena una progresiva obstrucción del flujo aéreo que contribuye a la disnea [32].

La presencia de esta sintomatología, especialmente si ha habido exposición a los factores de riesgo, es suficiente para considerar la posibilidad de EPOC en el diagnóstico [82]. Por tanto, también se debe tener en cuenta: la exposición a factores de riesgo (especialmente tabaco y sustancias inhaladas ambientales u ocupacionales), asma o alergias, antecedentes de EPOC u otras enfermedades respiratorias, comorbilidades y pérdida de peso no explicada [83]. La sintomatología asociada a la EPOC requiere atención médica pero muchas veces la enfermedad progresa durante años antes de ser diagnosticada o tratada [32], bien porque los pacientes no reconocen los síntomas o porque aún existe un cierto infradiagnóstico, especialmente en las etapas iniciales donde las anormalidades en la espirometría pueden ser muy sutiles [84].

Cabe destacar que existen evidencias que apuntan a que VEF_1 representa de forma incompleta las complejas consecuencias clínicas de la EPOC, que presenta otros efectos en el

pulmón además de la limitación en el flujo aéreo así como efectos sistémicos. Por ello se piensa que la aproximación diagnóstica debe incluir, además de la evaluación de la sintomatología y de la espirometría, otras valoraciones, al considerarse que no puede conseguirse una caracterización adecuada de los pacientes únicamente con el uso de VEF_1 [85], a pesar de que sea la técnica diagnóstica aceptada actualmente. Por tanto, es adecuado incluir valoraciones adicionales como, por una parte, la evaluación de la disnea, de la capacidad de ejercicio y del índice de masa corporal, y por otra, técnicas de imagen para la mejora del diagnóstico diferencial. De esta forma se evitan diagnósticos equivocados, mejorando tanto el diagnóstico temprano como el diferencial [28]. De hecho, en aquellos pacientes que presenten la sintomatología característica, el diagnóstico diferencial de la EPOC es amplio e incluye: asma, insuficiencia cardiaca congestiva, bronquiectasias, cáncer de pulmón, enfermedad pulmonar intersticial, fibrosis pulmonar, hipertensión pulmonar, sarcoidosis, tuberculosis y displasia broncopulmonar [32].

La EPOC es una enfermedad progresiva, especialmente si la exposición perdura. En cambio si se logra detener la exposición, puede mejorar el declive en la función pulmonar y el riesgo de exacerbaciones e incluso puede ralentizarse o detenerse el progreso de la enfermedad [2]. Por ejemplo, el cese del tabaquismo puede alterar favorablemente el declive del flujo aéreo y el deterioro causado por la sintomatología [85].

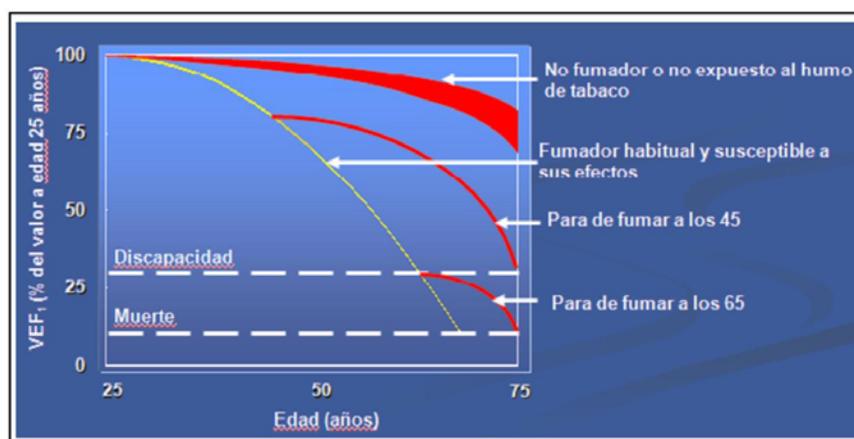


Figura 6. El cese del tabaquismo ralentiza el declive de la función pulmonar característico de la EPOC (Figura adaptada de Fletcher C et al, 1977 [81]). En la figura se representa el declive en la función pulmonar, representado por el VEF_1 , asociado a la edad.

Aún así, los efectos del cese del tabaquismo son menores cuanto más severa sea la enfermedad [85]. Por tanto, el diagnóstico temprano de la EPOC es relevante y para ello es

importante aumentar el conocimiento de la enfermedad, tanto de la sintomatología como de las técnicas diagnósticas.

1.4.1 DIAGNÓSTICO MEDIANTE ESPIROMETRÍA.

La espirometría, una prueba de función pulmonar fiable y no invasiva, permite realizar una medida objetiva de la limitación en el flujo aéreo y de su grado de reversibilidad [32], siendo actualmente la técnica diagnóstica de EPOC. La espirometría proporciona el VEF_1 y su ratio (VEF_1/CVF) con CVF , considerados valores clave en la definición actual de la EPOC según los criterios GOLD [2]. Aunque esta prueba es algo criticada, por presentar el inconveniente de que sólo puede determinar una de las consecuencias de una enfermedad compleja, actualmente es considerada la técnica estándar para el diagnóstico de la EPOC por su alta reproducibilidad y disponibilidad [82]. De hecho, la definición GOLD de la EPOC está basada en criterios de espirometría, así como su diagnóstico y posterior clasificación en el estadio de severidad correspondiente [2].

La definición GOLD está basada en los parámetros VEF_1 y el ratio VEF_1/CVF post broncodilatación obtenidos mediante la espirometría. VEF_1 es la cantidad de aire que un paciente puede espirar durante el primer segundo de la espiración máxima, tras una inspiración máxima. CVF es el volumen máximo de aire total que un paciente puede exhalar tras una inspiración completa. El criterio principal de la EPOC es el ratio $VEF_1/CVF < 0,7$ post broncodilatación, que ha sido establecido como valor umbral en el diagnóstico de EPOC [2]. Sin embargo, este ratio es controvertido ya que, como se ha mencionado anteriormente, disminuye con la edad pudiendo causar un sobrediagnóstico [21]. Por ello, además de estos valores también debe tenerse en cuenta en el diagnóstico tanto la exposición a factores de riesgo como la presencia de síntomas respiratorios con VEF_1 inferior a 80% del valor predicho. La comparación del VEF_1 del paciente con valores predichos de VEF_1 (en individuos de edad, género y altura similar) caracteriza el grado de obstrucción del flujo aéreo [32]. Este ratio VEF_1/CVF post broncodilatación inferior a 0,7 asociado a su vez con un VEF_1 inferior a 80% del valor predicho es diagnóstico de limitación en el flujo aéreo y confirma la presencia de EPOC, tal y como se refleja en la siguiente tabla.

Tabla 2. Diagnóstico GOLD de la EPOC y clasificación basada en la severidad de la limitación en el flujo aéreo (Tabla adaptada de Revisión GOLD, 2011 [2]).

Estadio	Grado de Severidad	VEF ₁ /CVF	VEF ₁
I	Leve	< 0,70	VEF ₁ ≥ 80% predicho
II	Moderada	< 0,70	50% ≤ VEF ₁ < 80% predicho
III	Severa	< 0,70	30% ≤ VEF ₁ < 50% predicho
IV	Muy Severa	< 0,70	VEF ₁ < 30% predicho o VEF ₁ < 50% predicho y fallo respiratorio crónico

Fallo respiratorio: Presión parcial arterial de O₂ (PaO₂) menor de 8,0 kPa (60 mmHg) con o sin hipercapnia (PaCO₂) mayor que 6,7 kPa (50mmHg) mientras se respira al nivel del mar.

La espirometría se realiza tras administración de una dosis adecuada de broncodilatador inhalado porque se ha descrito que se minimiza la variabilidad y que es un método eficaz para identificar individuos con EPOC [86], ya que la limitación en el flujo aéreo no completamente reversible se caracteriza por unos valores de VEF₁ y VEF₁/CVF que permanecen disminuidos tras la administración del broncodilatador.

El NHLBI recomienda la realización de espirometría a los fumadores, a partir de 45 años, especialmente a aquellos que presenten falta de aire, tos, sibilancia o una producción de esputo persistente [32]. Las anomalías en estas pruebas reflejan tanto la reducción en la fuerza para expulsar el aire, consecuencia de la destrucción del parénquima pulmonar por enfisema, como la obstrucción del flujo aéreo en los bronquiolos [3].

1.4.2 ESTADIOS BASADOS EN LA SEVERIDAD DE LA ENFERMEDAD.

La iniciativa GOLD ha publicado una serie de directrices para la clasificación de la severidad de la EPOC basada en los resultados de la espirometría. Esta clasificación es esencial para determinar la terapia apropiada para cada paciente individual [32]. Sin embargo, esta clasificación no está exenta de dificultades ya que, el grado de limitación en el flujo aéreo de la EPOC está débilmente relacionado con la severidad de la sintomatología. Además, en muchas ocasiones, la presencia de EPOC no es evidente hasta los estadios 3 y 4, dificultando el diagnóstico en etapas iniciales [82].

La clasificación espirométrica de la EPOC distingue cuatro estadios en base a la severidad de la obstrucción del flujo aéreo: leve, moderada, severa y muy severa. Los cortes establecidos para definir los distintos estadios son valores utilizados por su simplicidad. Un estudio en una población aleatoria encontró que el VEF₁/CVF postbroncodilatador excedía 0,70 en todos los grupos de edad, apoyando el uso de este ratio fijo [87].

Introducción

En la siguiente tabla se presentan los cuatro estadios junto con la sintomatología asociada y los rasgos a destacar, ya que se debe tener en cuenta que el impacto de la EPOC en un paciente individual depende no sólo del grado de limitación en el flujo aéreo sino también de la severidad de los síntomas asociados, especialmente la falta de respiración y la disminución de la capacidad de ejercicio, que afectan de manera considerable la calidad de vida de los pacientes [2].

Tabla 3. Clasificación GOLD de los estadios de la EPOC basada en la severidad de la limitación en el flujo aéreo y en la sintomatología asociada (Tabla adaptada de Revisión GOLD, 2011 [2]).

Estadio EPOC	I (Leve)	II (Moderada)	III (Severa)	IV (Muy severa)
VEF ₁ /CVF	< 0,70	< 0,70	< 0,70	< 0,70
VEF ₁	≥ 80%	50% ≤ VEF ₁ < 80%	30% ≤ VEF ₁ < 50%	VEF ₁ < 30% o VEF ₁ < 50% y fallo respiratorio crónico
Limitación del flujo aéreo	Leve	Empeorada	Mayor empeoramiento	Severa
Síntomas	Tos crónica. Producción ocasional de esputo.	Falta de aire tras esfuerzo. Tos y producción de esputo ocasional.	Mayor falta de aire, capacidad de ejercicio reducida, fatiga y reiteradas exacerbaciones.	Efectos en el corazón (<i>cor pulmonale</i>)
Rasgos	Se desconoce anomalía en función pulmonar.	Se busca atención médica debido a los síntomas respiratorios crónicos o a exacerbaciones.	Exacerbaciones reiteradas con impacto en la calidad de vida.	Calidad de vida muy disminuida. Exacerbaciones ponen en riesgo la vida.

Fallo respiratorio: Presión parcial arterial de O₂ (PaO₂) menor de 8,0 kPa (60 mmHg) con o sin hipercapnia (PaCO₂) mayor que 6,7 kPa (50mmHg) mientras se respira al nivel del mar.

1.5 PATOGENIA: CAMBIOS PATOLÓGICOS Y FISIOPATOLÓGICOS.

Este apartado presenta una visión global de la patogenia de la EPOC, describiendo de forma general los cambios patológicos observados. En apartados posteriores se profundizará en la descripción del remodelado de la EPOC, en el que se centra el presente trabajo.

El proceso de inflamación crónica asociado a la EPOC es complejo, ya que involucra una amplia variedad de células y mediadores inflamatorios. Además, el epitelio de las vías aéreas también contribuye activamente en esta respuesta inflamatoria.

El humo de tabaco y otras sustancias nocivas inician un proceso inflamatorio, que en individuos con EPOC está anormalmente amplificado [2]. El humo de tabaco daña directamente el epitelio bronquial causando la liberación de factores endógenos, que desencadenan una respuesta inflamatoria caracterizada por la infiltración de células inflamatorias en la mucosa, submucosa y tejido glandular [13]. Además, también aumenta la liberación de especies reactivas de oxígeno, a la que contribuyen el tabaco y células inflamatorias activadas. En el epitelio pulmonar existe una serie de mecanismos antioxidantes para neutralizar los efectos perjudiciales de las especies reactivas de oxígeno. Sin embargo, estos mecanismos pueden estar inhibidos y, en ausencia de un equilibrio, las especies reactivas de oxígeno causan un daño adicional en el pulmón así como una amplificación de la respuesta inflamatoria [88]. Las consecuencias adversas del estrés oxidativo en los pulmones incluyen: activación de genes inflamatorios, inactivación de antiproteasas y estimulación de la secreción de moco, entre otras [2, 89].

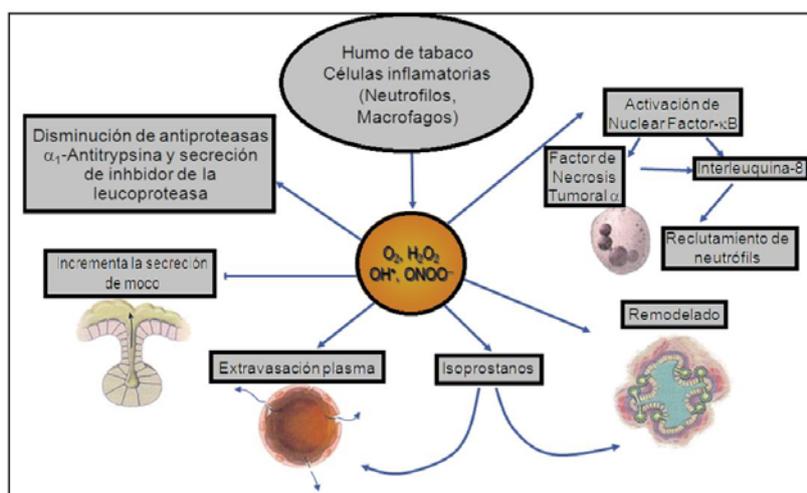


Figura 7. Las consecuencias adversas del estrés oxidativo en la EPOC (Figura adaptada de Barnes PJ, 2000 [89]).

Las células inflamatorias infiltradas también liberan enzimas proteolíticas que, en caso de no existir un equilibrio con factores antiproteolíticos, contribuyen a la formación de enfisema a través de la destrucción de componentes del tejido conectivo del parénquima. Tanto la NE como las metaloproteinasas de matriz (MMP) destacan como importantes proteasas que contribuyen a la patogenia de la EPOC [90].

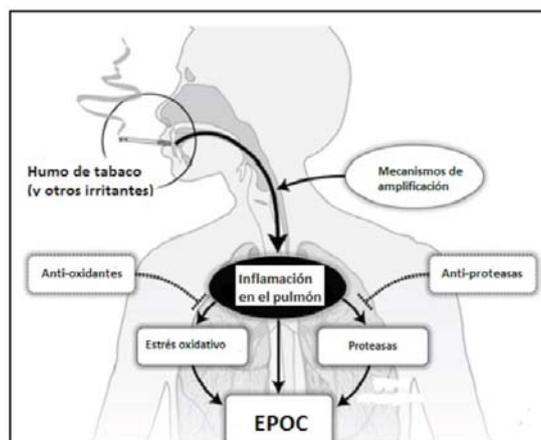


Figura 8. Patogenia en la EPOC (Figura adaptada de Revisión GOLD, 2011 [2]). El humo de tabaco y otros estímulos desencadenan una respuesta inflamatoria que, junto al estrés oxidativo y al daño proteolítico, contribuyen a los cambios patológicos que caracterizan a la EPOC.

Al considerar las células inflamatorias presentes en la EPOC, existen evidencias que indican que los neutrófilos son las principales células efectoras en esta enfermedad [91]. De hecho, el patrón inflamatorio de los pulmones de individuos con EPOC se caracteriza por la presencia de un número aumentado de neutrófilos (en el lumen bronquial) pero también de macrófagos (en el lumen y en la pared bronquial y en el parénquima) y linfocitos CD8⁺ (en la pared bronquial y parénquima). El reclutamiento de estas células inflamatorias está controlado por una serie de quimiocinas, como interleuquina 8 (CXCL8) y quimiocina CXC ligando 1 (CXCL1) en el caso de los neutrófilos. Estas células son las principales responsables de la respuesta inflamatoria y de su amplificación mediante la liberación de una serie de mediadores [2], descritos a continuación:

- **Factores quimiotácticos** liberados por macrófagos alveolares, células epiteliales y neutrófilos que atraen células inflamatorias de la circulación. Ambos mediadores están aumentados en las vías aéreas de pacientes EPOC [91].
 - Leucotrieno B₄ (LTB₄): Atrae neutrófilos y linfocitos T.
 - Interleuquina-8 (IL-8): Atrae neutrófilos y monocitos y juega un papel principal en el inicio y la amplificación de la respuesta inflamatoria en la EPOC [91].
- **Citoquinas pro-inflamatorias** que amplifican el proceso inflamatorio.

- Factor α de necrosis tumoral (TNF- α): Considerado un mediador crucial en la EPOC, es secretado por una amplia variedad de células. Ejerce múltiples acciones pro-inflamatorias como activación de moléculas de adhesión, degranulación de neutrófilos, activación de macrófagos y transcripción de genes inflamatorios mediante el factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- κ B) y proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPK) [91].
 - Interleuquina-1 β (IL-1 β): Secretada por una amplia variedad de células, incluyendo las células epiteliales. Aumentada en sujetos con EPOC.
 - Interleuquina-6 (IL-6): Secretada por una amplia variedad de células. Aumentada en sujetos con EPOC, aunque su rol en la enfermedad no está del todo claro.
- **Factores de crecimiento** que interaccionan con células estructurales de las vías aéreas y del parénquima induciendo cambios estructurales. Destaca:
- Factor de crecimiento transformante β 1 (TGF- β 1): Juega un papel central en el remodelado de las vías aéreas, descrito en apartados posteriores.

En la siguiente tabla se representan las principales células y mediadores inflamatorios implicados en la EPOC, según el estadio de severidad.

Tabla 4. Patrón inflamatorio en los diferentes estadios de la EPOC (Figura adaptada de Barnes PJ, 2011 [74]).

	EPOC LEVE	EPOC SEVERA	EXACERBACIÓN EPOC
Neutrófilo	++	+++	++++
Eosinófilo	0	0	+
Mastocito	0	0	?
Macrófago	+++	++++	++++
Linfocito T	Tc1+	Th1+++ , Tc1+++ , Th17?	?
Linfocito B	+	+++	?
Célula dendrítica	+?	+?	?
Quimioquinas	CXCL8+, CXCL1+, MCP1	CXCL8++	CXCL8+++
Citoquinas	TNF- α +	TNF- α ++	TNF- α +++
Mediador lipídico	LTB ₄ +	LTB ₄ ++	TNF- α +++
Estrés oxidativo	++	+++	++++

*Patrón de inflamación: 0: no hay respuesta; + a ++++: grado de magnitud; ?: incierto.

Introducción

En la siguiente figura se representan las células inflamatorias y los mediadores implicados en la respuesta inflamatoria de la EPOC, así como las principales consecuencias patológicas.

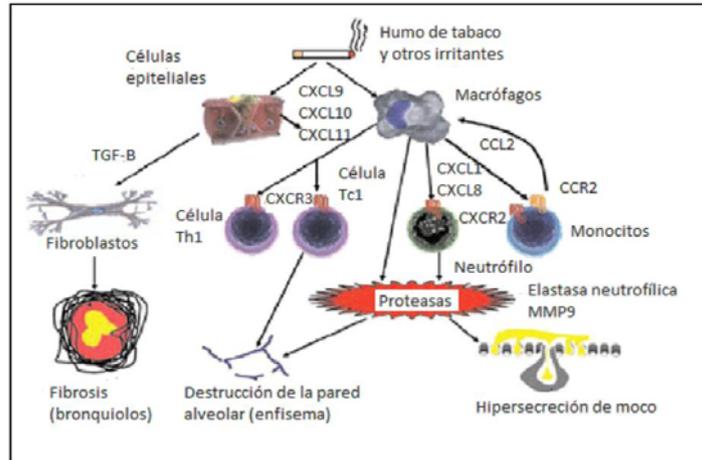


Figura 9. Mecanismos implicados en la inflamación presente en la EPOC. (Figura extraída de Barnes PJ, 2011 [74]). El humo de tabaco y otros irritantes activan a células epiteliales y macrófagos, que liberan diversos factores quimiotácticos que atraen células inflamatorias como: monocitos, neutrófilos y células Th1 y Tc1, a los pulmones. Estas células inflamatorias, junto a macrófagos y células epiteliales, liberan proteasas como MMP-9 que origina el enfisema. La NE también causa la hipersecreción de moco. Además, las células epiteliales y los macrófagos también liberan TGF-β1 que contribuye a la fibrosis de los bronquiolos.

Los cambios patológicos que se desarrollan en la EPOC afectan a las vías aéreas proximales y periféricas, al parénquima y a los vasos pulmonares [92], tal y como se muestra en la figura. Estos cambios patológicos incluyen inflamación crónica, con un aumento de células inflamatorias específicas, y cambios estructurales que resultan de procesos repetidos de reparación y lesión.

CAMBIOS PATOLÓGICOS EN LA EPOC
<p>Vías aéreas proximales: Tráquea y bronquios (diámetro interno > 2mm). Células inflamatorias: ↑ Macrófagos, ↑ linfocitos T CD8⁺, neutrófilos o eosinófilos escasos. Cambios estructurales: ↑ Células caliciformes, glándulas submucosas alargadas (hipersecreción de moco), metaplasia escamosa del epitelio.</p>
<p>Vías aéreas periféricas: Bronquiolos (diámetro interno < 2mm). Células inflamatorias: ↑ Macrófagos, ↑ linfocitos T (CD8⁺ > CD4⁺), ↑ linfocitos B, folículos linfoides, ↑ fibroblastos, neutrófilos o eosinófilos escasos. Cambios estructurales: Engrosamiento de la pared bronquiolar, fibrosis peri-bronquiolar, presencia de exudados inflamatorios en el lumen, estrechamiento de los bronquiolos. Respuesta inflamatoria y exudado aumentados correlacionado con la severidad de la enfermedad.</p>
<p>Parénquima pulmonar: Bronquiolos respiratorios y alveolos. Células inflamatorias: ↑ Macrófagos, ↑ linfocitos T CD8⁺. Cambios estructurales: Destrucción de la pared alveolar, apoptosis de células epiteliales y endoteliales. Enfisema.</p>
<p>Vasos pulmonares: Células inflamatorias: ↑ Macrófagos, ↑ linfocitos T. Cambios estructurales: Engrosamiento de la íntima, disfunción endotelial, ↑ músculo liso → hipertensión pulmonar.</p>

Figura 10. Cambios patológicos en la EPOC (Figura adaptada de Revisión GOLD, 2011 [2]). Estos cambios patológicos afectan a las vías periféricas, al parénquima y a los vasos pulmonares y son resultado de una respuesta inflamatoria crónica así como de procesos repetidos de lesión y reparación.

Los cambios patológicos descritos conllevan cambios fisiológicos, que contribuyen a la sintomatológica característica [2], como:

- Limitación del flujo aéreo, por obstrucción de las vías aéreas, que origina la hiperinsuflación de los pulmones por un vaciado inadecuado durante el proceso de espiración. El enfisema también contribuye en este proceso.
- Anormalidades en el intercambio gaseoso que resultan en hipoxemia e hipercapnia.
- Hipersecreción de moco que causa tos crónica y productiva.
- Hipertensión pulmonar debida a vasoconstricción y cambios estructurales de las arteriolas.

1.6 APROXIMACIONES FARMACOLÓGICAS.

Las aproximaciones farmacológicas en la EPOC tienen como objetivo reducir la sintomatología y el progreso de la enfermedad así como evitar la frecuencia y severidad de las exacerbaciones, con el fin de conseguir una mejora en la calidad de vida del paciente [2]. Por ello, el tratamiento de la EPOC incluye una combinación de: cese del tabaquismo, actividad física y tratamiento farmacológico. El control y la reducción de los factores de riesgo constituyen un paso esencial en la prevención de cualquier enfermedad y, por ello, se resalta

Introducción

la importancia del cese del tabaquismo en la EPOC, ya que es la única intervención que, además de reducir el riesgo de desarrollo, también influye en su progresión [93]. En cuanto al tratamiento farmacológico, a pesar del fuerte impacto de la EPOC, no existen terapias farmacológicas que prevengan significativamente su desarrollo o reduzcan la mortalidad asociada [94]. Por ello, la consecución de terapias que ralenticen o reviertan el curso de la enfermedad representaría un avance importante en la terapéutica de la EPOC [93].

En este apartado se describe de forma general el tratamiento farmacológico de la EPOC y de forma más detallada a los inhibidores de fosfodiesterasa 4 (iPDE4), específicamente el roflumilast, por ser el fármaco objeto de estudio de la presente tesis doctoral.

1.6.1 APROXIMACIONES FARMACOLÓGICAS CLÁSICAS.

La aproximación farmacológica generalmente aceptada está basada en las directrices GOLD para el manejo de la EPOC:

Tabla 5. Terapia farmacológica en cada estadio GOLD de la EPOC (Figura adaptada de Revisión GOLD, 2011 [2]).

	I (leve)	II (moderada)	III (severa)	IV (muy severa)
VEF ₁ /CVF	<0,70	<0,70	<0,70	<0,70
VEF ₁	≥80% predicho	50-80% predicho	30-50% predicho	<30% predicho <50% predicho y fallo respiratorio crónico
Tratamiento	Vacuna para la gripe y broncodilatador de corta duración, cuando sea necesario (agonista β ₂ o anticolinérgico)	Vacuna para la gripe, broncodilatador de corta y ≥ 1 larga duración cuando sea necesario, considerar rehabilitación respiratoria.	Vacuna para la gripe, broncodilatador de corta y ≥ 1 larga duración cuando sea necesario, corticoide inhalado si exacerbaciones repetidas, considerar rehabilitación respiratoria.	Vacuna para la gripe, broncodilatador de corta y ≥ 1 larga duración cuando sea necesario, corticoide inhalado si exacerbaciones repetidas, administración de oxígeno a largo plazo y en caso de fallo respiratorio considerar rehabilitación respiratoria y operación quirúrgica.

Fallo respiratorio: Presión parcial arterial de O₂ (PaO₂) menor de 8,0 kPa (60 mmHg) con o sin hipercapnia (PaCO₂) mayor que 6,7 kPa (50mmHg) mientras se respira al nivel del mar.

Tal y como se observa en la tabla, los broncodilatadores inhalados de larga duración (agonistas β_2 y anti-colinérgicos) constituyen el pilar de la terapia farmacológica en la EPOC [80].

- **Broncodilatadores.** Los broncodilatadores mejoran la limitación del flujo aéreo que caracteriza a la EPOC, ejerciendo un efecto sobre el tono del músculo liso bronquial de las vías aéreas y, en general, son el tratamiento de elección inicial en la EPOC. Los broncodilatadores de acción larga son convenientes por ser más efectivos en la mejora sintomática que los de acción corta. Además, la combinación de broncodilatadores de distintas clases farmacológicas puede mejorar la eficacia y disminuir los efectos adversos, comparada con el aumento de dosis de un único broncodilatador [2]. Por ello, actualmente se trabaja en la mejora de los broncodilatadores existentes así como en posibles combinaciones con anti-colinérgicos ya que se han descrito efectos aditivos entre ambos [95].
 - **Agonistas β_2 :** Los agonistas β_2 producen una relajación del músculo liso bronquial mediante la estimulación de los receptores β_2 -adrenérgicos, que aumentan el monofosfato de adenosina cíclico (AMPC) intracelular [96], produciendo un efecto antagonista sobre la broncoconstricción. Se distingue dos subtipos: acción corta (Fenoterol, Levalbuterol, Salbutamol, Terbutalina) y acción larga (Formoterol, Arformoterol, Indacaterol, Salmeterol, Tulobuterol). Tal y como se observa en la tabla 5, los β -agonistas de acción corta se recomiendan como tratamiento inicial de la EPOC, utilizándose los de acción larga para el tratamiento de los pacientes en estadios más avanzados que no responden adecuadamente al tratamiento con los anteriores.
 - **Anti-colinérgicos:** Los agentes anticolinérgicos producen broncodilatación al reducir la contracción de la musculatura lisa, antagonizando el tono colinérgico endógeno. Su principal efecto es el bloqueo del efecto de la acetilcolina en los receptores muscarínicos [97]. Se distinguen dos subtipos: acción corta (Bromuro de Ipratropio, Bromuro de Oxitropio) y acción larga (Tiotropio).
 - **Metilxantinas:** En este subgrupo destaca la teofilina, que constituye un tratamiento clásico de la EPOC. La teofilina presenta un efecto positivo sobre la fuerza del diafragma, un aumento del rendimiento de los músculos respiratorios, una reducción del atrapamiento aéreo y una

reducción de las agudizaciones [98]. Sin embargo la teofilina, utilizada inicialmente como broncodilatador, ha sido relegada por sus modestos efectos comparados con otros broncodilatadores actuales, utilizándose como tratamiento principalmente de la EPOC severa. La teofilina ejerce su efecto actuando como inhibidor no selectivo de fosfodiesterasa, sin embargo su utilidad es limitada dada su menor eficacia y sus efectos adversos.

- **Corticosteroides.** Los corticosteroides inhalados constituyen el principal tratamiento anti-inflamatorio de pacientes con asma. En la EPOC se utilizan en combinación con broncodilatadores de larga duración. Sus efectos en pacientes con EPOC son controvertidos y, por ello, están limitado a indicaciones específicas, como en el caso de pacientes con EPOC avanzada por su utilidad en el tratamiento de las exacerbaciones [99]. Se distinguen corticoides inhalados (Beclometasona, Budesonida, Fluticasona) y sistémicos (Prednisona, Metilprednisolona).

Sin embargo, actualmente existen dudas de si realmente el tratamiento de la EPOC con broncodilatadores, corticoides o ambos modifica el curso de la enfermedad. Se piensa que su principal beneficio radica en la mejora de la sintomatología, especialmente en la limitación en el flujo aéreo, pero no parece que tengan un efecto sustancial en la modificación del progreso de la EPOC. Por ello, actualmente se están investigando otras aproximaciones farmacológicas dirigidas a los mediadores inflamatorios como diana terapéutica.

1.6.2 NUEVAS APROXIMACIONES FARMACOLÓGICAS ANTI-INFLAMATORIAS.

En los últimos años ha mejorado considerablemente el conocimiento de los mecanismos celulares y moleculares implicados en la inflamación, en los cambios estructurales y en los mecanismos de lesión y reparación que caracterizan la fisiopatología de la EPOC. Esto ha contribuido a la identificación de nuevas dianas terapéuticas. En este apartado se presenta una visión global de la amplia variedad de nuevos tratamientos antiinflamatorios actualmente en desarrollo para la EPOC, representados en la siguiente figura.

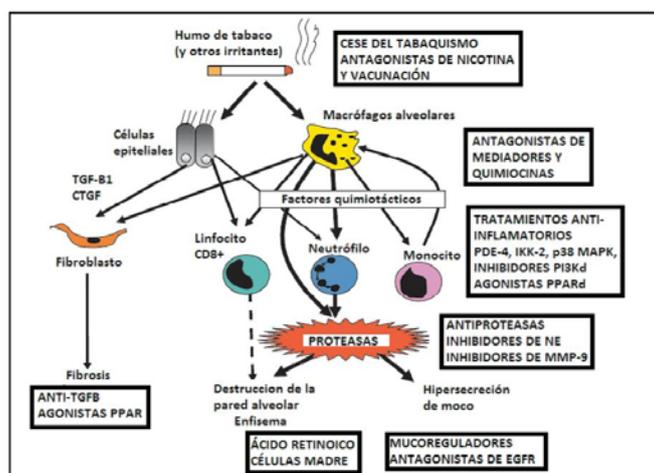


Figura 11. El conocimiento de los mecanismos moleculares y celulares implicados en la respuesta inflamatoria de la EPOC es clave para la identificación de nuevas dianas y el desarrollo de nuevas terapias (Figura adaptada de Barnes PJ, 2010 [94]). En la figura se resaltan algunos de los nuevos tratamientos anti-inflamatorios en desarrollo para la EPOC.

1.6.3 INHIBIDORES DE FOSFODIESTERASA 4: ROFLUMILAST.

Los iPDE4 constituyen una de las clases farmacológicas utilizadas en la aproximación terapéutica a la EPOC. En particular, el roflumilast es el primer, y único, iPDE4 aprobado para el tratamiento de la EPOC severa. El roflumilast, desarrollado, patentado y comercializado por *Nycomed GmbH* (Alemania), fue aprobado para su comercialización en la Unión Europea en julio del 2010, con el nombre de Daxas®, indicado como tratamiento complementario para reducir el riesgo de exacerbaciones en pacientes con EPOC estadio GOLD 3-4 y con exacerbaciones recurrentes. En EEUU fue aprobado por la *Food and Drug Administration* (FDA) en febrero de 2011 y lo comercializa *Forest Pharmaceuticals Inc.* (St. Louis, EEUU), con el nombre de Daliresp®, como tratamiento dirigido a reducir el riesgo de exacerbaciones en pacientes con EPOC severa asociada a bronquitis crónica o a un historial de exacerbaciones [100]. El roflumilast es un comprimido que se administra por vía oral con una dosis aprobada de 500 µg/día.

El roflumilast ejerce su mecanismo de acción molecular mediante la inhibición de la fosfodiesterasa 4 (PDE4) en diversos tipos celulares [101], con una elevada selectividad sobre esta isoenzima PDE4 frente a otras isoenzimas de la misma familia [102].

Tabla 6. Familia de PDE y su distribución (Tabla adaptada de Lugnier C, 2006 [102]).

Familia	Sustrato	Propiedad	Distribución		
			Pulmón	Células inflamatorias *	Otros tejidos [‡]
PDE1	AMPc, GMPc	Activada Ca ²⁺ /Calmodulina	Sí		Cerebro Corazón
PDE2	AMPc, GMPc	GMPc-activada	Sí		Corazón
PDE3	AMPc, GMPc	GMPc-inhibida	Sí	Sí	Corazón
PDE4	AMPc	AMPc específica	Sí	Sí	Riñón
PDE5	GMPc	Fosforilada PKA, PKG	Sí		Células de músculo liso
PDE6	GMPc				Fotoreceptores
PDE7	AMPc		Sí	Sí	Células de músculo esquelético
PDE8	AMPc			Sí	Testículos
PDE9	GMPc		Sí		Riñón
PDE10	Especificidad dual				Testículos, cerebro
PDE11	Especificidad dual				Próstata

*Neutrófilos, monocitos/macrófagos, linfocitos y eosinófilos; ‡ Tejidos primarios además del pulmón y células inflamatorias.

La PDE4 está compuesta por cuatro subtipos (PDE4A-D) codificados por diferentes genes que, mediante un proceso de *splicing* alternativo, se expresan como diversas variantes proteicas que difieren en el dominio N-terminal [103, 104]. La PDE4 muestra un papel fundamental, a través de diversos mecanismos, en prácticamente todos los tipos celulares relacionados con la EPOC [101, 105].

LEUCOCITO	ISOFORMA PDE	CÉLULAS ESTRUCTURALES	ISOFORMA PDE
 Mastocitos	4, 7	 Células de músculo liso	1, 2, 3, 4, 5, 7
 Eosinófilos	4, 7	 Células epiteliales bronquiales	1, 2, 3, 4, 5, 7, 8
 Neutrófilos	4, 7	 Células endoteliales	2, 3, 4, 5
 Monocitos	1, 3, 4, 7	 Nervio sensitivo	1, 3, 4
 Macrófagos	1, 3, 4, 5, 7	 Nervio colinérgico	1, 3, 4
 Linfocitos T (CD4 ⁺ y CD8 ⁺)	3, 4, 7		

Figura 12. La PDE4 se expresa en múltiples células inflamatorias y estructurales relacionadas con la EPOC (Figura adaptada de Giembycz MA, 2002 [105]).

Esta enzima muestra especificidad sobre el AMPc y tiene como función la regulación de los niveles de este segundo mensajero, vía hidrólisis a su forma acíclica inactiva [106]. El AMPc es un importante segundo mensajero intracelular que tiene un amplio papel como mediador anti-inflamatorio en las vías aéreas [107], ya que su aumento inhibe células inflamatorias y desencadena una serie de procesos, como relajación de músculo liso, dilatación de las vías respiratorias o inhibición de la inflamación neutrofílica, entre otros.

El roflumilast se metaboliza rápidamente a N-óxido roflumilast (RNO), considerado el principal responsable de su eficacia clínica [101], y ejerce el efecto de inhibidor selectivo de la PDE4 sin mostrar selectividad por los distintos subtipos, a excepción de una menor potencia de inhibición para PDE4C [101]. Este efecto inhibitorio del roflumilast sobre la PDE4 resulta en un incremento del AMPc, por la imposibilidad de la PDE4 inhibida de inactivar el AMPc [108]. Los niveles aumentados de AMPc en las células inflamatorias reducen su activación con la consiguiente atenuación de la respuesta inflamatoria [107].

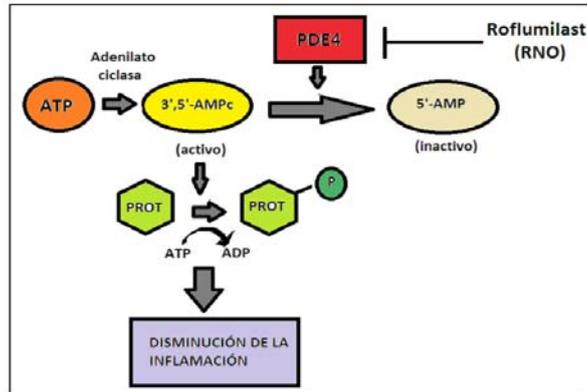


Figura 13. Mecanismo de acción molecular del RNO mediante la inhibición de la isoenzima de la PDE4. (Figura adaptada de Hatzelmann A et al, 2010 [101]). El consecuente aumento del AMPc ejerce efectos que contribuyen a la disminución de la inflamación, a través de la inhibición de los principales mediadores inflamatorios en la EPOC, así como inhibición de la fibrosis y relajación del músculo liso. *Prot: proteína; P: fosforilación de la proteína.

El beneficio clínico del roflumilast es consecuencia, principalmente, de su efecto anti-inflamatorio de amplio espectro [109]. Sin embargo, además, existen resultados obtenidos de estudios en cultivos celulares y en animales que indican que este iPDE4 también presenta un potencial para frenar o limitar otros mecanismos patológicos de la EPOC como: cambios estructurales debidos al remodelado de las vías aéreas, remodelado vascular, enfisema, disfunción mucociliar y la carga del estrés oxidativo abundante en la EPOC [101] (Ver Figura 14).

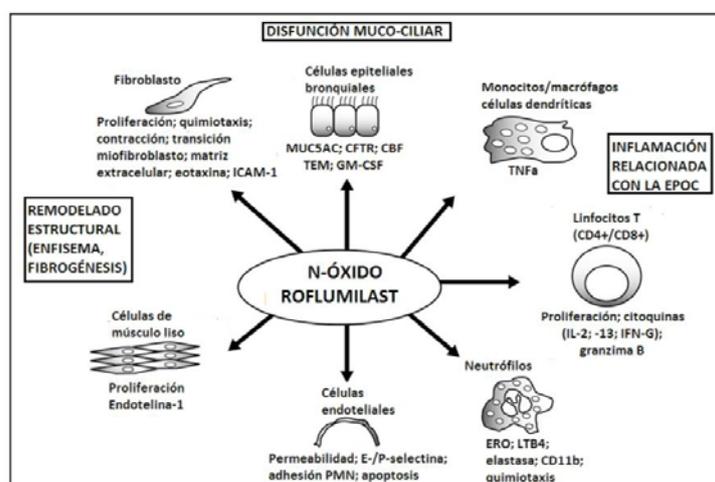


Figura 14. El metabolito activo del roflumilast, RNO, ejerce su efecto sobre células inflamatorias y estructurales involucradas en los mecanismos de la EPOC, lo que podría explicar su eficacia clínica. (Figura adaptada de Hatzelmann A et al, 2010 [101]). El roflumilast ejerce un efecto anti-inflamatorio pero también afecta a otros mecanismos patológicos de la EPOC, como el remodelado y la disfunción mucociliar, a través de diversas acciones como: la inhibición de la formación de especies reactivas de oxígeno en las células epiteliales, los neutrófilos y las células del músculo liso; la inhibición de la proliferación de las células del músculo liso de la arteria pulmonar, las células endoteliales y, probablemente, algunas células inflamatorias responsables del remodelado vascular pulmonar; la inhibición de los fibroblastos, con la consiguiente disminución del remodelado pulmonar; y la inhibición de la producción de moco y la mejora del batido ciliar.

En la siguiente tabla se presentan los principales resultados de estudios, realizados tanto *in vitro* como con modelos *in vivo*, con iPDE4 [101, 110-112].

Introducción

Tabla 7. Acción de los iPDE4 en células inflamatorias: Evidencias *in vitro* e *in vivo* (Figura adaptada de Hatzelmann H, 2010 [101]; Milara J et al, 2012 [110]; Mata M et al, 2005 [111]; Sanz MJ et al, 2005 [112]).

	Célula	Actividad
Evidencias <i>in vitro</i>	Neutrófilo	Inhíbe liberación de IL-8 y de la NE.
		Inhíbe quimiotaxis y adhesión.
		Inhíbe especies reactivas de oxígeno.
	Monocitos y macrófagos	Inhíbe la producción de TNF- α inducida por LPS.
		Inhíbe la producción de GMCSF inducida por LPS.
		Estimula la producción de PGE2.
		Inhíbe LTB ₄ y aumenta la liberación de IL-10.
	Linfocitos T	Inhíbe IL-2, IL-4, IL-5, IL-13, TNF- α y GMCSF.
		Inhíbe proliferación.
		Inhíbe liberación de granzima B.
	Eosinófilos	Inhíbe producción de LTC4.
		Inhíbe quimiotaxis.
	Basófilos	Inhíbe histamina, LTC4, liberación IL-4 e IL-13.
	Células de músculo liso.	Inhíbe liberación de tromboxano, GMCSF y RANTES.
		Inhíbe contracción de bronquio aislado.
		Inhíbe proliferación de células de músculo liso.
	Fibroblastos.	Inhíbe quimiotaxis
		Inhíbe contracción en gel de colágeno.
		Inhíbe liberación y activación de MMP-1, MMP-9.
		Inhíbe transición de fibroblasto a miofibroblasto
Células epiteliales bronquiales	Inhíbe liberación de IL-8, TNF- α , IL-6, TGF- β y MUC5AC.	
	Inhíbe IL-13 inducida por humo de tabaco	
	Inhíbe disfunción mucociliar.	
	Inhíbe especies reactivas de oxígeno generadas por humo de tabaco	
	Inhíbe TEM inducida por TGF- β 1	
Células endoteliales	Inhíbe la expresión de moléculas de adhesión.	
	Inhíbe hiperpermeabilidad	
	Inhíbe generación de citoquinas.	

	Célula	Actividad
Evidencias en modelos <i>in vivo</i>	Citoquinas	Inhíbe la síntesis de TNF- α en células sanguíneas.
		Disminuye TNF- α y aumenta IL-10 en lavado broncoalveolar.
		Reduce IL-4 e IL-5 en lavado broncoalveolar.
	Células inflamatorias	Inhíbe la neutrofilia en el pulmón.
		Inhíbe la eosinofilia en el pulmón.
		Inhíbe estrés oxidativo.
	Tejido pulmonar	Inhíbe la broncoconstricción.
		Inhíbe el edema pulmonar.
		Inhíbe la hiperplasia de células caliciformes.
		Inhíbe la proliferación de células tipo fibroblasto.
		Inhíbe el enfisema inducido por humo de tabaco
	Otros	Inhíbe la actividad de MMP en lavado broncoalveolar.
		Inhíbe la liberación de TGF- β en lavado broncoalveolar.

Además, se ha descrito una modulación de procesos inflamatorios en humanos *in vivo* por inhibición de PDE4, tal y como muestra un estudio que evidencia la reducción en el número de neutrófilos y eosinófilos en muestras de esputo de pacientes con EPOC tratados con roflumilast [113].

1.7 EL REMODELADO.

En la EPOC el término remodelado hace referencia a una serie de cambios estructurales, desencadenados por una respuesta inflamatoria anormal y crónica, que afectan principalmente a los bronquiolos y al parénquima [114] y cuya extensión está asociada con la severidad de la enfermedad [3]. Tanto el remodelado bronquiolar como la destrucción del parénquima contribuyen a un deterioro progresivo de la función pulmonar, un inadecuado vaciado del pulmón tras espiración y un subsiguiente proceso de hiperinsuflación característico de la EPOC [115].

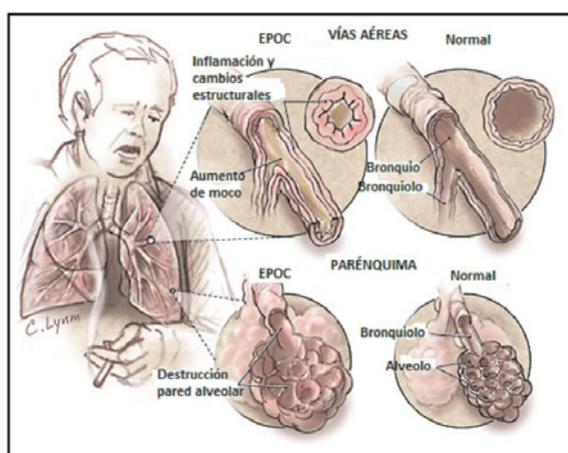


Figura 15. Remodelado en la EPOC. En la figura se representan las principales anomalías estructurales desencadenadas en la EPOC, que afectan tanto a las vías aéreas como al parénquima pulmonar.

El epitelio bronquial constituye la primera barrera anatómica expuesta a las partículas nocivas del humo de tabaco u otros estímulos ambientales. Las células epiteliales bronquiales están involucradas en la iniciación del remodelado de los bronquiolos a través de la liberación de diversos mediadores pro-inflamatorios, como TNF- α , TGF- β 1, IL-1 β e IL-8, y proteasas. Estos mediadores desencadenan una respuesta inflamatoria caracterizada por una infiltración de células inflamatorias, entre las que predominan neutrófilos, macrófagos y células T CD8⁺ [91],

con la subsiguiente formación de folículos linfoides. La presencia de los folículos linfoides ha sido descrita en las vías aéreas de pacientes con EPOC [3] y, aunque se requiere un estudio más profundo de su presencia y función, se piensa que son responsables de una respuesta inmune que contribuye a perpetuar la inflamación durante años tras el cese del tabaquismo [13].

La respuesta inflamatoria desencadena el remodelado de los bronquios de pequeño calibre, que sufren hipertrofia e hiperplasia de la musculatura lisa bronquial [116] y un proceso de fibrosis peri-bronquiolar. Estudios recientes han descrito que tanto la proliferación de células de músculo liso como la acumulación de miofibroblastos son procesos críticos que resultan en el estrechamiento de los bronquiolos asociado a la EPOC [93, 117]. Las células caliciformes y las glándulas submucosas del epitelio bronquial son las principales productoras del moco presente en el lumen de las vías aéreas. La presencia de estas células productoras de moco en los bronquiolos periféricos es escasa en condiciones no patológicas. Sin embargo, en los bronquiolos periféricos de los pacientes con EPOC, se produce un aumento del número de estas células, por un proceso conocido como hiperplasia de células caliciformes y glándulas submucosas [118]. Tanto la hiperplasia de estas células como la hiperproducción del moco resultante, que contribuye a la oclusión de los bronquiolos, son las principales características de la disfunción mucociliar de la EPOC [119, 120].

Además, también se produce una liberación de proteasas tipo elastasa, por los neutrófilos, o tipo granzima B, por los linfocitos CD8⁺ presentes en los folículos linfoides, que contribuye a la destrucción del parénquima alveolar y a la formación de enfisema [91], término patológico que implica lesión en los alveolos debido a un agrandamiento en los espacios distales a los bronquiolos acompañado de destrucción de la pared alveolar [32]. Esta destrucción del parénquima, por pérdida de estructuras alveolares, causa una disminución en la retracción elástica del pulmón [2].

También se ha descrito un remodelado vascular en pacientes EPOC, caracterizado por un aumento de la masa de músculo liso vascular y por la deposición de elastina y colágeno en la íntima de las arterias. Estas anomalías en las arterias han sido asociadas con deficiencias en el intercambio gaseoso [121] y, en algunos casos, con hipertensión pulmonar [122].

En la siguiente tabla se resumen las características del remodelado en la EPOC [114, 123].

Tabla 8. Características del remodelado en la EPOC (Tabla adaptada de Gosens et al, 2006 [123] y Jeffery PK, 2004 [114]).

Estructura afectada	Características del remodelado en la EPOC
Bronquiolos	Aumento de la masa de músculo liso bronquial.
	Aumento del grosor de la pared bronquial (broncoconstricción).
	Fibrosis de la pared (matriz extracelular).
Producción de moco	Hiperplasia de las células caliciformes.
	Hiperplasia de las glándulas submucosas.
Parénquima	Pérdida de pared alveolar (enfisema).
Arteria pulmonar	Remodelado en los vasos pulmonares.
	Aumento en la masa de músculo liso vascular, riesgo de hipertensión pulmonar.
Localización predominante	Bronquiolos y alveolos.

1.7.1 REMODELADO DE LOS BRONQUIOLOS: FIBROSIS PERI-BRONQUIOLAR.

El remodelado de los bronquiolos ha sido descrito como el indicador principal e independiente de la progresión de la EPOC, más que el proceso de inflamación [3]. Por tanto, el progreso de la EPOC está fuertemente asociado al engrosamiento de la pared bronquiolar por procesos de reparación y remodelado.

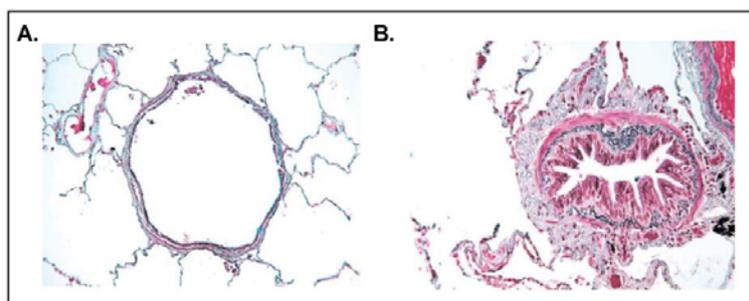


Figura 16. Remodelado bronquiolar en la EPOC: Comparación entre individuo sano y EPOC. (Figura extraída de Decramer M et al, 2012 [13]). (A) Bronquiolo normal. (B) En la EPOC los bronquiolos sufren un estrechamiento debido a la infiltración de células inflamatorias, la hiperplasia mucosa y la deposición de tejido conectivo en el espacio peribronquiolar.

La fibrosis peri-bronquiolar, proceso que contribuye a este engrosamiento, ha sido descrita como una de las lesiones patológicas más importantes en individuos con EPOC leve y moderada [124]. Los bronquiolos, caracterizados por la ausencia de cartílago y por un diámetro interno inferior a 2 mm, constituyen los conductos aéreos distales del pulmón y

Introducción

están formados por las siguientes capas: epitelio, lámina propia, músculo liso y adventicia [125]. En pacientes con EPOC, el epitelio bronquiolar presenta anomalías estructurales como un grosor aumentado por metaplasia escamosa e hiperplasia de células caliciformes [121]. Además de estas anomalías estructurales, el epitelio bronquiolar podría estar potencialmente implicado en el proceso de fibrosis peri-bronquiolar.

La fibrosis peri-bronquiolar es un proceso fibrótico asociado a la contracción del tejido, que causa el estrechamiento de la vía aérea y la consiguiente limitación del flujo aéreo. Este proceso fibrótico desencadena cambios estructurales en los bronquiolos mediante la acumulación de fibroblastos/miofibroblastos y de un denso tejido conectivo extracelular [93]. Actualmente no está del todo claro el factor exacto responsable de la producción de la matriz característica del remodelado así como el papel del epitelio activado en el proceso de remodelado y en la activación/diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos en la fibrosis peri-bronquiolar asociada a la EPOC.

Los miofibroblastos son células clave en el desarrollo de procesos fibróticos [126], pudiendo contribuir a la fibrosis peri-bronquiolar característica del remodelado bronquiolar. Estas células presentan características morfológicas y bioquímicas intermedias entre fibroblastos y células de músculo liso [127] y actualmente los marcadores específicos para diferenciarlas son limitados. Los miofibroblastos presentan una mayor capacidad de proliferación y migración y se localizan en los focos fibróticos. Comparten con las células de músculo liso la presencia de fibras de α -actina de músculo liso (α -SMA), que les confiere un fenotipo contráctil [126]. Además son células que sintetizan grandes cantidades de colágeno, considerado el principal componente de la matriz extracelular. Por tanto, los miofibroblastos, junto con los fibroblastos, son los principales responsables de la síntesis y deposición de matriz extracelular, desencadenando las alteraciones estructurales características del remodelado [126]. Tanto la presencia de α -SMA como la síntesis de colágeno se utilizan como indicadores para diferenciar a los miofibroblastos de los otros dos tipos celulares.

Tabla 9. Características de los miofibroblastos (Tabla adaptada de Singh SR et al, 2008 [127])

	Fenotipo Fibroblasto	Fenotipo Miofibroblasto	Fenotipo célula de músculo liso
Proliferación	+++	++++	+
Migración	++	+++	-
Contracción (α-SMA)	-	++++	++++
Secreción de matriz extracelular (COL tipo I)	+++	++++	+

**Características: + a ++++: grado de magnitud.*

Actualmente se postulan diversas vías para explicar el origen de los miofibroblastos, representadas en la siguiente figura.

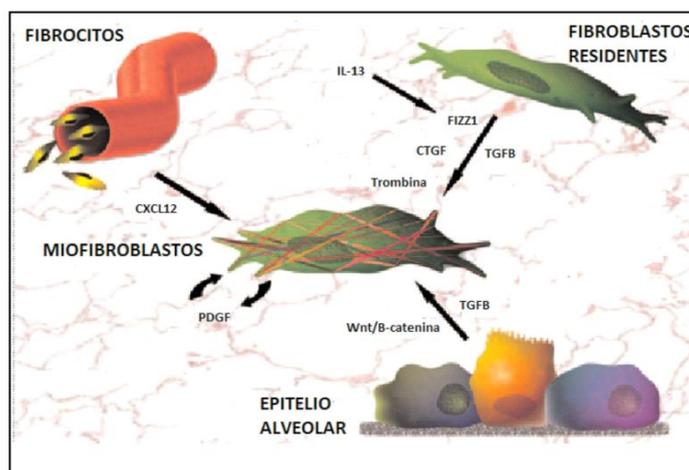


Figura 17. Posibles orígenes de los miofibroblastos. (Figura adaptada de Scotton CJ et al, 2007 [126]). Las posibles vías del origen de los miofibroblastos, células clave en procesos fibróticos, son: (1) Proliferación y diferenciación de fibroblastos residentes, (2) reclutamiento de fibrocitos circulantes y (3) transición epitelial mesenquimal. Diversas citoquinas, factores de crecimiento y rutas de señalización podrían mediar estas rutas (flechas negras).

Una posible ruta es la proliferación y diferenciación de fibroblastos residentes en los pulmones a miofibroblastos, bajo la influencia de un ambiente profibrótico [128]. Una segunda vía que se plantea es que los miofibroblastos deriven del reclutamiento de fibrocitos circulantes, un tipo de células progenitoras que provienen de la médula espinal [129]. Además se ha postulado otra vía descrita en la literatura reciente, no representada en esta figura, que sería la transición de células de músculo liso de las vías aéreas a miofibroblastos [130]. Por último, otra hipotética vía representada en la figura describe una diferenciación de células epiteliales a miofibroblastos mediante un proceso conocido como transición epitelial mesenquimal.

1.7.2 TRANSICIÓN EPITELIAL MESENQUIMAL.

1.7.2.1 Definición.

La transición epitelial mesenquimal (TEM) es un proceso de cambio de fenotipo de células epiteliales completamente diferenciadas a células mesenquimales. Las células epiteliales sufren una serie de cambios moleculares y celulares [131], que incluyen: disolución de uniones adherentes, reorganización del citoesqueleto, pérdida de polaridad apico-basal y transición a una morfología tipo miofibroblasto. Este cambio de fenotipo conlleva una mayor capacidad de migración, con la consiguiente adquisición de un fenotipo invasivo, y una mayor capacidad de producción de matriz extracelular [132]. En este proceso las células epiteliales pierden marcadores epiteliales característicos y adquieren marcadores mesenquimales. Estos marcadores son utilizados para evidenciar dicha transición, tal y como se refleja en la siguiente figura.

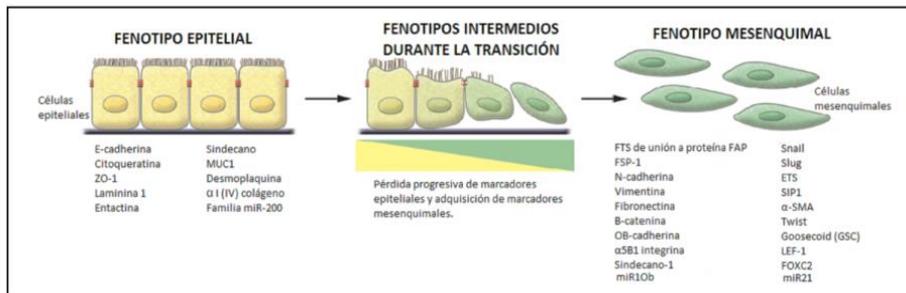


Figura 18. Transición epitelial mesenquimal (Figura adaptada de Kalluri R et al, 2009 [132]). La TEM es una transición funcional de células epiteliales polarizadas a células mesenquimales, caracterizadas por una mayor capacidad de secreción de matriz extracelular y por un fenotipo más invasivo. En la figura se enumeran los marcadores característicos y más utilizados para identificar la transición.

La TEM es un proceso de diferenciación celular inicialmente descrito durante el desarrollo embrionario y en la subsiguiente formación de los distintos órganos [132]. Sin embargo, en los últimos años esta transición también se ha visto implicada en procesos de inflamación crónica, fibrosis y cáncer [133]. De hecho, están aumentando las evidencias que apuntan a un papel fundamental de la TEM en procesos fibróticos de diversos órganos, entre los que se encuentra el pulmón [134]. La existencia de TEM en diversos contextos biológicos con consecuencias funcionalmente distintas ha llevado a algunos autores a clasificar distintos subtipos de TEM [132], cuyas características principales se detallan brevemente a continuación.

- **TEM tipo I: TEM asociada a procesos de embriogénesis y desarrollo de órganos.** En el contexto de la embriogénesis, el epitelio primitivo generaría células con un fenotipo mesenquimal para la creación de nuevos tejidos con funciones diversas.
- **TEM tipo II: TEM asociada a procesos de regeneración y fibrosis.** Inicialmente este proceso tendría una finalidad de reparación tras lesión pero, debido a una persistencia anormal de la respuesta inflamatoria, desencadenaría una fibrosis persistente y anómala que contribuiría potencialmente a la destrucción del tejido.
- **TEM tipo III: TEM asociada con la progresión del cáncer y metástasis.** En este caso, las células sufrirían una serie de cambios genéticos y moleculares que implicarían una transformación a células cancerígenas, caracterizadas por un fenotipo altamente invasivo asociado a metástasis.

En el caso del remodelado bronquiolar característico de la EPOC, y dada la existencia de un estímulo inflamatorio anormal y crónico, el proceso de TEM podría potencialmente contribuir al proceso de fibrosis bronquiolar. En este contexto, el cambio de célula epitelial a célula mesenquimal implicaría un cambio a célula tipo miofibroblasto, que se identificaría por las siguientes características [134]:

- Un cambio a una morfología de miofibroblasto (con una estructura alargada en forma de huso).
- La pérdida de proteínas de adhesión epitelial (como E-cadherina, zonula occludens-1 (ZO-1) y citoqueratinas, entre otras).
- La adquisición de marcadores específicos de miofibroblasto (expresión de α -SMA (de novo) y vimentina).
- La secreción de proteínas de la matriz extracelular (como COL tipo I).

Este cambio de fenotipo estaría asociado a una mayor capacidad migratoria y proliferativa, además de contráctil. En la siguiente tabla se muestran los marcadores más utilizados para caracterizar dicha transición [135].

Tabla 10. Regulación transcripcional de genes diana durante la TEM.

(Tabla adaptada de Guarino M et al, 2009 [135]). Las rutas de señalización características de la TEM convergen en la regulación de una serie de genes cuya regulación está reprimida (marcadores epiteliales) o activada (marcadores mesenquimales)

Marcadores epiteliales disminuidos	Marcadores mesenquimales aumentados
E-cadherina	α -SMA
ZO-1	Vimentina
Citoqueratina.	Colágeno tipo I/III
Desmoplaquina.	Metaloproteinasas
	Fibronectina
	FSP-1 o S100A4

1.7.2.2 Mecanismos implicados en la TEM.

La TEM puede inducirse por diversos estímulos y estar controlada por una variedad de rutas de señalización, dependiendo del contexto fisiológico preciso. La inducción de la TEM puede deberse bien a factores o estímulos ambientales como la hipoxia [136] y las especies reactivas de oxígeno [137] o a mediadores extracelulares como: TGF- β 1 [134], el factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF-2), el factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF) y el factor de crecimiento insulínico (IGF) [134]. Además, diversos mediadores han sido implicados en las cascadas de señalización asociadas a esta transición, tales como: la activación de MAPK, la señalización a través de Smad y un aumento de la PDE4, responsable de la degradación de AMPc, entre otros [138, 139].

➤ TEM y TGF- β 1.

El factor de crecimiento TGF- β 1 es una citoquina multifuncional que controla una variedad de procesos celulares, como: proliferación, diferenciación, apoptosis y producción de matriz extracelular [134]. El complejo rol que desempeña este factor de crecimiento en múltiples procesos está relacionado con la amplia variedad de rutas de señalización a las que está asociado, como: Smads, miembro A de la familia de genes homólogos a Ras (RhoA), guanosina trifosfatasa (GTPasas), fosfatidil inositol 3-quinasa (PI3K), Akt o protein quinasa B y MAPK [131]. Actualmente se considera que TGF- β 1 podría jugar un papel principal en el desarrollo de la fibrosis peribronquiolar presente en la EPOC, ya que está involucrado en la reparación del tejido tras lesión [93].

TGF- β 1 es considerado un inductor reconocido de TEM y, considerando específicamente el pulmón, se ha descrito como principal mediador de la TEM *in vitro* en diversas líneas celulares, incluyendo células epiteliales alveolares [140] y bronquiales [141] y

también en células epiteliales bronquiales primarias [142]. Recientemente, también se ha evidenciado su participación en la TEM de células epiteliales bronquiales pseudoestratificadas [143]. Además, se han aportado evidencias de TEM mediada por TGF- β 1 *in vivo*, confirmando su papel fundamental en este proceso [144].

El papel de TGF- β 1 en la TEM está muy relacionado con las especies reactivas de oxígeno, ya que éstas pueden participar en las cascadas de señalización asociadas al TGF- β 1, tal y como se describe en el siguiente apartado.

➤ TEM y especies reactivas de oxígeno.

Las especies reactivas de oxígeno son pequeñas moléculas derivadas de oxígeno con electrones desapareados, como el radical superóxido ($O_2^{\cdot -}$) y el radical hidroxilo ($\cdot OH$) entre otros. Además también engloban a otras moléculas que se convierten fácilmente en radicales, como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) [145]. Las especies reactivas de oxígeno se forman constantemente durante el metabolismo intracelular y en respuesta a estímulos externos a través de diversos mecanismos [146]. Uno de estos mecanismos involucra a la enzima nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidasa, un complejo formado por múltiples subunidades anclado en la membrana citoplasmática [145].

Las especies reactivas de oxígeno juegan un papel importante en la TEM, tanto por inducir la transición por estrés oxidativo como por su mediación intracelular en las cascadas de señalización implicadas. Un estudio reciente en cultivos de células epiteliales alveolares y bronquiales describe la inducción de TEM debida al estrés oxidativo exógeno, utilizando H_2O_2 como estímulo, y mediada por la generación (mitocondrial) de especies reactivas de oxígeno intracelulares y por la sobreexpresión de TGF- β 1 [138]. Las especies reactivas de oxígeno también juegan un papel importante en la TEM inducida por TGF- β 1 en células epiteliales renales, principalmente a través de rutas de señalización que implican MAPK, quinasas reguladas por señal extracelular (ERK) y Smad [137]. Además, en enfermedades fibróticas pulmonares se ha descrito la importancia de la liberación de TGF- β 1 y de las especies reactivas de oxígeno mediada por estrés oxidativo, así como de la subunidad de la NADPH oxidasa nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa 4 (NOX4), que ha sido implicada como mediadora en la transformación a miofibroblastos tras estimulación por TGF- β 1 [147].

Adicionalmente, se ha descrito la inhibición de TEM *in vitro* utilizando el agente antioxidante N-acetil-L cisteína (NAC), evidenciando así la participación de especies reactivas de oxígeno en la TEM inducida por TGF- β 1 en una línea celular epitelial y en células epiteliales

alveolares primarias de rata [148]. Los resultados de este estudio apuntan a la interacción entre TGF- β 1 y la generación de especies reactivas de oxígeno como inductores de TEM alveolar que, a su vez, podría contribuir a un proceso de fibrosis del parénquima pulmonar. Por consiguiente, se piensa que tratamientos antioxidantes [137, 148] y otros dirigidos a la atenuación de especies reactivas de oxígeno intracelulares, como el aumento de AMPc [149], podrían inhibir de forma efectiva la TEM inducida por TGF- β 1.

➤ TEM y AMPc. Papel de los iPDE4.

El AMPc también ha sido implicado como mediador en la TEM, ya que un aumento de AMPc contribuye a la disminución de especies reactivas de oxígeno intracelulares, siendo un inhibidor efectivo de la TEM inducida por TGF- β 1 [149]. Sin embargo, un aumento de la PDE4, responsable de la degradación de AMPc, podría contribuir a la TEM en el pulmón.

En relación a esto, se ha descrito que la inhibición de PDE4 abole la activación de fibroblastos pulmonares, la transición de fibroblasto a miofibroblasto y la TEM alveolar inducida por TGF- β 1 [139, 150, 151]. Además, resultados obtenidos en estudios con cultivos celulares y en animales apuntan a que el roflumilast podría potencialmente frenar o limitar la carga del estrés oxidativo y los cambios estructurales debidos al remodelado en la EPOC [101]. Estas evidencias apuntan a que los iPDE4, en particular el roflumilast, podrían desempeñar un papel importante en una posible TEM implicada en la fibrosis peribronquiolar. Por tanto, los iPDE4 podrían ser una herramienta prometedora para atenuar dicha fibrosis y también la obstrucción por estrechamiento de las vías aéreas presentes en el remodelado asociado a la EPOC.

1.8 IMPORTANCIA DEL HUMO DE TABACO EN EL REMODELADO.

El humo de tabaco, considerado el principal factor de riesgo en la EPOC, desencadena un aumento del estrés oxidativo y una respuesta inflamatoria crónica en el pulmón, que origina el remodelado de las vías aéreas y la destrucción del parénquima [152]. El efecto de humo de tabaco en los bronquiolos de pacientes con EPOC está siendo estudiado como diana para potenciales terapias [117], dado el creciente interés por el relevante papel de los bronquiolos en el desarrollo de esta enfermedad.

1.8.1 COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL HUMO DE TABACO.

El humo de tabaco está compuesto por dos fases, definidas como la fase vapor y la fase de partículas. La fase vapor se define como la porción del humo que atraviesa un filtro específico de fibra de vidrio. En cambio, la fase compuesta por partículas, con rangos de tamaño de $0,1 < 1,0 \mu\text{m}$ de diámetro, queda atrapada en dicho filtro [153].

La fase vapor, que representa el 90-96% del peso del humo, tiene los siguientes constituyentes: nitrógeno ~60%, oxígeno ~13%, dióxido de carbono 13%, monóxido de carbono 3,5%, agua 2%, argón 1%, hidrógeno 0,1-0,2%, acetona ~1%, óxidos de nitrógeno (NO, NO₂, N₂O) < 0,1%, y compuestos volátiles de azufre < 0.1% [153]. En cambio, la fase compuesta por partículas incluye: nicotina (0,2-0,6% del peso total del humo), alcaloides ~0,02%, n-hentriacontano (C₃₁H₆₄), solanesol (0,1-0,2%), catecol (~1%), hidrocarburos aromáticos no carcinogénicos (~0,0003- 0,007%) 3-7 ppm) y el hidrocarburo aromático policíclico (PAH) (0.00002-0.00007%) [153].

La complejidad del humo de tabaco se refleja en la tabla 11 que muestra 3794 componentes del tabaco agrupados según sus grupos funcionales [154]. Sin embargo, actualmente se piensa que el humo de tabaco contiene más de 6000 compuestos y que este número seguirá aumentando, con la mejora de las técnicas analíticas.

Tabla 11. Compuestos identificados en el tabaco y en el humo de tabaco. (Tabla adaptada de Stedman RL, 1968 [154]).

Grupos funcionales	Número de compuestos en el tabaco	Número de compuestos en el humo de tabaco	Número de compuestos en el cigarro
Ácidos carboxílicos	450	69	140
Aminoácidos	95	18	16
Lactonas	129	135	39
Ésteres	529	456	314
Amidas e imidas	205	227	32
Anhídridos	10	10	4
Aldehídos	111	106	48
Carbohidratos	138	30	12
Nitrilos	4	101	4
Cetonas	348	461	122
Alcoholes	334	157	69
Fenoles	58	188	40
Aminas	65	150	37
N-nitrosaminas	23	18	19
Compuestos de sulfuro	3	37	2
Piridinas N-heterocíclicas	63	324	46
Pirroles e indoles	9	88	3
Pirazinas	21	55	18
No-aromáticos	13	43	7
Policíclicos aromáticos	1	36	0
Otros	4	50	2
Éteres	53	88	15
Hidrocarburos alifáticos saturados	58	113	44
Hidrocarburos alifáticos insaturados	38	178	10
Monocíclicos aromáticos	33	138	25
Policíclicos aromáticos	55	317	35
Pesticidas	28	25	25
Miscelaneos	112	110	19
Inorgánicos y metales	105	111	69

1.8.2 HUMO DE TABACO Y CÉLULAS EPITELIALES: PAPEL DE LA TEM.

Tal y como se ha descrito anteriormente, el humo de tabaco tiene un efecto directo sobre el epitelio bronquial causando la liberación de factores endógenos que desencadenan una respuesta inflamatoria [13]. Además, existen estudios que han descrito la formación de especies reactivas de oxígeno en células epiteliales pulmonares tras exposición al humo de

Actualmente existen evidencias que apuntan a un papel del humo de tabaco en un potencial proceso de TEM relacionado con la EPOC. De hecho, se ha descrito que el humo de tabaco podría inducir TEM en la línea de células alveolares tipo II A549 [159] y en la línea de células epiteliales bronquiales BEAS2B [160]. También se ha descrito que la exposición al humo de tabaco daña las uniones entre las células epiteliales, evidenciado en dos líneas celulares epiteliales pulmonares [161]. Existe una hipótesis, generada a partir de modelos animales, que sugiere que el humo de tabaco es un mediador importante del remodelado de los bronquiolos por la inducción de factores de crecimiento pro-fibróticos (p.e. CTGF, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y TGF- β 1) de la pared bronquial [162].

Sin embargo, el efecto del humo de tabaco en la transición de células epiteliales bronquiales humanas primarias a células mesenquimales no está del todo claro, ni tampoco su posible papel en el remodelado bronquiolar asociado a la EPOC.

1.9 POSIBLE PAPEL DE LA TEM EN EL REMODELADO BRONQUIOLAR ASOCIADO A LA EPOC.

En los últimos años han aumentado considerablemente las publicaciones que atribuyen un papel fundamental de la TEM en otras enfermedades pulmonares, además del cáncer de pulmón. En estos estudios se destaca el carácter profibrótico de la TEM y su implicación en enfermedades fibróticas frente al subtipo de TEM asociado a un fenotipo más invasivo, relacionado con el cáncer [132].

La TEM ha sido implicada en el asma, ya que se ha descrito la inducción de TEM por alérgenos en células epiteliales bronquiales [163]. Más relevante es el hecho de que la TEM ha sido descrita en células epiteliales bronquiales de pacientes con asma, implicando a TGF- β 1 en su desarrollo [143].

Diversas publicaciones, de nuestro grupo [164] y de otros [165, 166], han descrito la presencia de TEM en enfermedades pulmonares que cursan con un componente fibrótico principal, como la fibrosis pulmonar idiopática (IPF), evidenciando la implicación de distintos mediadores. También se ha descrito TEM en otras enfermedades como la neumonía intersticial usual (UIP) [167] y la bronquiolitis obliterante asociada al trasplante pulmonar [168].

Estudios muy recientes han descrito un posible papel del humo de tabaco en la inducción de TEM en células epiteliales bronquiales [169, 170]. Además, recientemente Sohail y colaboradores han sugerido la existencia de TEM en los bronquios principales de fumadores y

pacientes con EPOC, aportando evidencias de la existencia de marcadores de TEM en la membrana basal reticular de los bronquios principales [171]. Sin embargo, hasta el momento se desconoce si la TEM está presente en los bronquiolos de fumadores y pacientes con EPOC y si el humo de tabaco directamente induce TEM en células epiteliales bronquiales humanas diferenciadas.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 HIPÓTESIS.

La hipótesis de la presente tesis doctoral está basada en las siguientes consideraciones, expuestas anteriormente, y resumidas a continuación:

- En primer lugar, se ha descrito la existencia de un subtipo de TEM [132], inicialmente atribuido a procesos de reparación tras lesión, que podría desencadenar un proceso de fibrosis debido a una respuesta inflamatoria anormal, como la que caracteriza a la EPOC.
- La TEM ha sido descrita en células epiteliales alveolares y bronquiales inducida por diversos factores [140-143] y además, ha sido implicada en otras enfermedades pulmonares con un importante componente fibrótico [164-168].
- El humo del tabaco es el principal agente causal de la EPOC [32] y contribuye a la inflamación crónica y a los cambios estructurales desencadenados en las vías aéreas [3]. El tabaco, o compuestos específicos del mismo, ha sido relacionado con la TEM en diversas líneas celulares epiteliales pulmonares [159-161].
- Diversos estudios han descrito la formación de especies reactivas de oxígeno en células epiteliales pulmonares tras exposición al humo de tabaco [131] así como el importante papel que juegan en la TEM inducida por TGF- β 1 en células epiteliales.
- Recientemente se ha descrito que el aumento de AMPc disminuye la TEM y que en células epiteliales alveolares esta transición, inducida por TGF- β 1, está inhibida por un iPDE4 [139].

En base a los antecedentes expuestos se establece la siguiente hipótesis: La TEM está presente en los bronquiolos de pacientes fumadores y EPOC y podría estar relacionada con la pérdida de función pulmonar asociada a la fibrosis peri-bronquiolar característica del proceso de remodelado en la EPOC. Además, el humo de tabaco *per se* puede inducir la TEM en epitelio bronquiolar diferenciado. El iPDE4 roflumilast, recientemente aprobado en la clínica para el tratamiento de la EPOC severa, puede atenuar dicha transición.

2.2 OBJETIVOS.

Con el fin de evaluar la validez de la hipótesis planteada, se establecen los siguientes objetivos, que se desarrollan en dos estudios diferenciados:

Estudio I. Evaluación de la presencia de TEM en el remodelado bronquiolar asociado a la EPOC: Aproximación clínica.

- i) Estudiar la presencia de marcadores epiteliales y mesenquimales característicos del proceso de TEM en células epiteliales bronquiales primarias obtenidas de bronquiolos de no fumadores, fumadores y pacientes EPOC, así como en el epitelio bronquiolar de tejido pulmonar.
- ii) Estudiar una potencial inducción de TEM por extracto de humo de tabaco (EHT) en cultivos de células epiteliales bronquiales primarias diferenciadas en interfase aire líquido (ALI).
- iii) Establecer los mecanismos y las rutas de señalización potencialmente implicadas en la TEM inducida por EHT, mediante modulación farmacológica.

Estudio II. Aproximación farmacológica a la TEM asociada al remodelado bronquiolar en la EPOC utilizando el iPDE4 4 RNO.

- iv) Explorar los efectos del RNO en una posible TEM inducida por EHT en células epiteliales bronquiales primarias diferenciadas.
- v) Estudiar los efectos del RNO en la presencia de marcadores epiteliales y mesenquimales característicos del proceso de TEM en células epiteliales bronquiales primarias obtenidas de bronquiolos de no fumadores, fumadores y pacientes EPOC.

3. METODOLOGÍA

3.1 MATERIAL.

3.1.1 FÁRMACOS.

En el **primer estudio** planteado en este trabajo se han utilizado diversas herramientas farmacológicas para el estudio de los mecanismos potencialmente implicados en la TEM, que se representan en la siguiente figura.

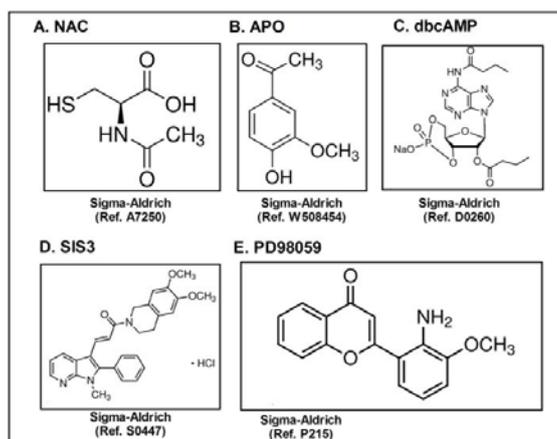


Figura 20. Herramientas farmacológicas utilizadas en la modulación de la TEM para el estudio de los mecanismos implicados en el proceso.

➤ N-acetil-L-cisteína.

La N-acetil-L-cisteína (NAC) es un agente antioxidante que inhibe el estrés oxidativo, con un efecto sobre el estado redox celular y actuando directamente como un secuestrador de especies reactivas de oxígeno. La NAC previene el aumento en la expresión de citoquinas y quimiocinas inflamatorias mitigando la estimulación de NF- κ B por especies reactivas de oxígeno [172-174]. Además, se ha demostrado que reduce la frecuencia de las exacerbaciones en la EPOC y podría tener un papel en el tratamiento de pacientes con exacerbaciones recurrentes [175]. En este trabajo se ha empleado la NAC como un agente antioxidante para el estudio de una potencial implicación de las especies reactivas de oxígeno como mediadoras en la TEM. La NAC se ha utilizado a una concentración de 1 mM, tal y como se ha descrito previamente [110].

➤ Apocinina.

La Apocinina (APO) es un inhibidor selectivo de la NADPH oxidasa y, como consecuencia, también tiene un efecto en la reducción de las especies reactivas de oxígeno. En

este trabajo se ha empleado la APO para evidenciar una posible participación de la NADPH oxidasa, y específicamente de su subunidad NOX4, en los mecanismos de la TEM mediados por especies reactivas de oxígeno. La APO se ha utilizado a una concentración de 100 μM , tal y como se ha descrito previamente [110].

➤ **Dibutiril adenosín monofosfato cíclico.**

El dibutiril adenosín monofosfato cíclico (dbcAMP), o sal sódica de N⁶, 2'-O-Dibutiril adenosín 3',5'-monofosfato cíclico, es un análogo sintético del AMPc. El dbcAMP se utiliza para emular los efectos directos del AMPc y estudiar así la consecuencia de la variación de sus niveles sobre la TEM. Además, el potencial efecto de esta modulación en el nivel de AMPc en la TEM podría reflejar el efecto producido por un iPDE4, planteando así su estudio en esta transición. El dbcAMP se ha utilizado a una concentración de 1 mM, tal y como se ha descrito previamente [110].

➤ **SIS3.**

SIS3 es un inhibidor específico de Smad3, en concreto de su activación por fosforilación. En este trabajo se ha empleado SIS3 para evidenciar una posible participación de la ruta de señalización de Smad3 como mecanismo implicado en la TEM. SIS3 se ha utilizado a una concentración de 10 μM , tal y como se ha descrito previamente [164].

➤ **PD98059.**

PD98059 es un inhibidor de ERK1/2, en concreto de su activación por fosforilación. En este trabajo se ha empleado PD98059 para evidenciar una posible participación de la ruta de señalización de ERK1/2 como mecanismo implicado en la TEM. PD98059 se ha utilizado a una concentración de 10 μM , tal y como se ha descrito previamente [176].

➤ **Anticuerpo anti-TGF- β 1.**

El anticuerpo monoclonal anti-TGF- β 1 humano (R&D Systems, Ref. AB-246-NA) se ha utilizado para bloquear la forma activa de TGF- β 1 presente en el sobrenadante del cultivo celular y así estudiar su posible liberación y los efectos que esto conlleva [177].

En la **segunda parte** de este trabajo se han estudiado los efectos del fármaco en ensayo sobre la TEM inducida por EHT en células epiteliales bronquiales humanas.

➤ **Roflumilast.**

Tal y como se ha descrito anteriormente, el roflumilast (3-ciclopropilmetoxi-4-difluorometoxi-N-[3,5-di-cloro-4-piridil]-benzamida, $C_{17}H_{14}Cl_2F_2N_2O_3$) es un iPDE4 que ha sido recientemente aprobado para el tratamiento de la EPOC severa [109]. En este trabajo se ha empleado el metabolito activo del roflumilast, RNO (Nycomed GmbH, Konstanz, Alemania), considerado el principal responsable de su eficacia clínica [101], para estudiar sus posibles efectos sobre la TEM asociada al remodelado bronquiolar de la EPOC.

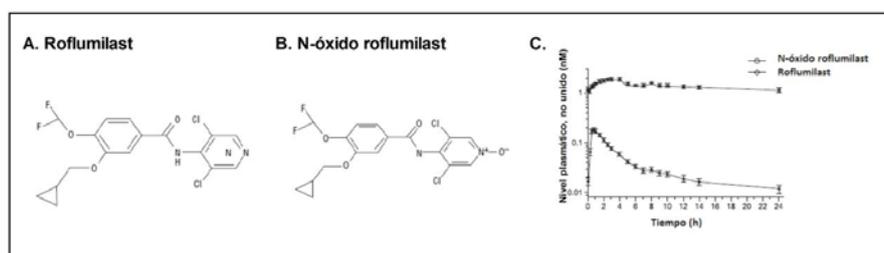


Figura 21. Roflumilast y RNO. (Figura adaptada de Hatzelmann A et al, 2010 [101]). (A) Estructura química del roflumilast y de su (B) metabolito activo, RNO y las (C) concentraciones plasmáticas de roflumilast y RNO tras dosis repetidas de 500 µg de roflumilast/día en humano.

El RNO se ha utilizado a las concentraciones de 1µM y 2nM. RNO 1µM corresponde a la concentración requerida para una inhibición total y selectiva de la PDE4. RNO 2nM corresponde a aproximadamente la mitad de la inhibición máxima de la PDE4 [178] y a la concentración plasmática libre en humanos tras la administración clínica de roflumilast, a una dosis de 500 µg/día [179]. Para utilizar las concentraciones requeridas, se preparó una concentración stock en dimetilsulfóxido (DMSO) y se realizaron diluciones posteriores en medio de cultivo.

3.1.2 ESTÍMULO: EHT.

El EHT se obtuvo a partir de los cigarrillos de investigación (2R4F; *Tobacco Health Research*, Universidad de Kentucky, KY, EEUU). Estos cigarrillos han sido desarrollados como cigarrillos estándares para su uso en investigación, de forma que permiten una mejor comparación de los resultados obtenidos en distintos estudios. Estos cigarrillos 2R4F, están compuestos por una mezcla de diferentes variedades de tabaco (*flue-cured* 32,51%, *Burley* 19,94%, *Oriental* 11,08%, *Maryland* 1,24%, reconstituyente 27,13%, glicerina 2,80% y azúcar 5,30%) y tienen una composición definida. El EHT obtenido a partir de estos cigarrillos de

Metodología

investigación fue utilizado como estímulo en los experimentos, tal y como se ha descrito previamente [180, 181].

3.1.3 REACTIVOS UTILIZADOS.

Reactivo	Casa comercial	Referencia
Ácido clorhídrico (HCl)	Panreac	Ref. 131020
Acrilamida	Sigma-Aldrich	Ref. A3574
Agua dietilpirocarbonato (DEPC)	Applied Biosystems	Ref. AM9906
Albúmina sérica bovina (BSA)	Sigma-Aldrich	Ref. A7906
Anfotericina B	Lonza Group LTD	Ref. 17-836E
Azul de tripano	Molecular Probes, Invitrogen	Ref. T10282
B-ALI™ Differentiation Basal Medium Medio basal de diferenciación para células epiteliales.	Lonza	Ref. 00193517
B-ALI™ Growth Basal Medium Medio basal de crecimiento para células epiteliales.	Lonza	Ref. 00193516
B-ALI™ Kit de suplementos para el medio Kit de alícuotas para suplementar el medio basal de crecimiento y el medio basal de diferenciación B-ALI™ para células epiteliales.	Lonza	Ref. 00193515
BB1 CeLyA Blocking Buffer Tampón de bloqueo BB1	Zeptosens	Ref.9040
BEBM Bronchial Epithelial Basal Medium. Medio basal de células epiteliales.	Lonza	Ref. CC-3171
BEGM Kit de suplementos para el medio BEBM. Kit de alícuotas para suplementar el medio basal de células epiteliales.	Lonza	Ref. CC-3170
BSA-Zenon Alexa Fluor 647	Invitrogen	Ref. A34785
CAB1 CeLyA Assay Buffer. Tampón de ensayo CAB1.	Zeptosens	Ref. 9031
CLB1 CeLyA Lysis Buffer. Tampón de lisis CLB1.	Zeptosens	Ref. 9000
Cloruro de magnesio (MgCl₂).	Panreac	Ref. 141396
Cloruro de sodio (NaCl).	Panreac	Ref.141659
Colágeno Rat type I collagen.	Sigma-Aldrich	Ref. C7661
DAKO Medio de montaje específico para fluorescencia	DAKO	Ref. S3023
Dimetilsulfóxido (DMSO)	Sigma-Aldrich	Ref. 34869
Dodecilsulfato sódico (SDS)	Sigma-Aldrich	Ref. L3771
DPX Medio de montaje rápido para microscopía óptica.	Panreac	Ref. 255254
ECL plus	Amersham GE Healthcare	Ref. RPN2132
Ensayos de Expresión Génica TaqMan®	Applied Biosystems	Tabla 16 (apartado 3.2.4.3)
Eosina	Panreac	Ref. 251299
Etanol	Panreac	Ref. 361086

Reactivo	Casa comercial	Referencia
Filtro "Millex-GS Syringe Driven Filter Unit MCE 0,22 μm ".	Millipore	Ref. SLGS033SS
Glicerol	Sigma-Aldrich	Ref. G5516
Hematoxilina	Sigma-Aldrich	Ref. GHS332
H ₂ DCF-DA (2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato) Indicador utilizado para monitorizar la generación intracelular de especies reactivas de oxígeno.	Molecular Probes	Ref. C6827
HEPES (Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazino etanosulfónico)	Sigma-Aldrich	Ref. H4034
Hidróxido sódico (NaOH)	Panreac	Ref. 131687
Isotiocianato de tetrametilrodamina (TRITC) conjugado a faloidina	Molecular Probes	
Coomassie Plus™ Protein Assay Reagent	Thermo Scientific	Ref. 1856210
Kit "Amersham cAMP Biotrak Enzymeimmunoassay (EIA) System"	GE Healthcare	Ref.RPN225
Kit BCA Protein Assay	Thermo Scientific	Ref. 23225
Kit "Enzyme-linked immunosorbent assay kit for MMP-9"	R&D Systems	Ref.LMP000 y LMP911
Kit "Lactato dehidrogenasa (LDH)"	Cayman Chemical	Ref. 10008882
Kit "Nuclear active motif kit"	Active Motif	Ref. 40010
Kit "Quantikine Human TGF- β 1 Immunoassay"	R&D Systems	Ref. 891124
Kit "Taq Man para la retrotranscripción inversa" <i>Taq Man Reverse Transcription Reagents Kit</i>	Applied Biosystems	Ref. N8080234
Marcador de peso molecular Amersham High-Range Rainbow Marcador de peso molecular para Western Blot.	GE Healthcare	Ref. RPN756E
Mowiol Medio de montaje específico para F-actina	Calbiochem, Merck Millipore	Ref. 475904
Opti-MEM	Invitrogen	Ref. 11058021
Parafina	Sigma-Aldrich	Ref.P3683
Paraformaldehído 4%	Panreac	Ref.252931
Sacarosa	Sigma-Aldrich	Ref. 16104
Tampón de lisis para la purificación de ácidos nucleicos <i>Nucleic Acid Purification Lysis Solution.</i>	Applied Biosystems	Ref. 4305895
Tampón salino fosfato (PBS)	Sigma-Aldrich	Ref.P4417
TaqMan® Gene Expression Master Mix	Applied Biosystems	Ref. 4369016
Transwell inserts	Merck Millipore	Ref. PIRP15R48
Triton X-100	Panreac	Ref. 142314
Tween20	Sigma-Aldrich	Ref.P1379
Xileno	Panreac	Ref. 131769

3.1.4 TEJIDO PULMONAR HUMANO.

El tejido pulmonar utilizado en este estudio se obtuvo de pacientes sometidos a operación quirúrgica por cáncer de pulmón en el Servicio de Cirugía Torácica del Consorcio Hospital General Universitario de Valencia (CHGUV) durante los años 2009 a 2012. Este proyecto fue aprobado previamente por la Comisión de Investigación y el Comité Ético de Investigaciones Clínicas (CEIC) del CHGUV y se obtuvo el consentimiento informado escrito de cada paciente participante.

Metodología

Los pacientes incluidos en este estudio fueron clasificados en tres grupos: controles no fumadores, fumadores y pacientes EPOC. Los pacientes EPOC fueron diagnosticados de acuerdo a las directrices GOLD [80] y todas las pruebas de función pulmonar fueron realizadas durante los tres meses previos a la operación. Los pacientes fueron clasificados en los distintos grupos de acuerdo a los valores de su función pulmonar. Además, los datos clínicos de todos los pacientes fueron examinados para evaluar posibles comorbilidades y el uso de medicación. Se establecieron los siguientes criterios para la inclusión de los pacientes en el estudio:

- 1) Pacientes no fumadores, fumadores y EPOC sin síntomas de infección en las vías respiratorias superiores y que no recibieron antibióticos durante el periodo perioperatorio.
- 2) Pacientes que no recibieron glucocorticoides, adrenérgicos β_2 o anti-muscarínicos durante los tres meses previos a la operación.

Los pacientes fueron sometidos a lobectomía o resección en cuña por lesión tumoral en el pulmón. Las muestras de tejido corresponden a tejido pulmonar no tumoral y fueron obtenidas de la parte distal del pulmón, lo más alejado posible del tumor. Además, todas las muestras de tejido utilizadas fueron revisadas histológicamente utilizando el siguiente criterio de exclusión:

- 1) Presencia de tumor.
- 2) Presencia de neumonía postestenótica.
- 3) Fibrosis del parénquima pulmonar.

El número de pacientes incluidos en los estudios, así como sus características clínicas, se detallan en los apartados 4.1 (Tabla 19) y 4.2 (Tabla 20).

3.2 MÉTODOS.

3.2.1 CULTIVOS CELULARES.

3.2.1.1 Aislamiento y cultivo primario de células epiteliales bronquiales.

El aislamiento y cultivo primario de células epiteliales bronquiales humanas (CEBH) a partir de fragmentos de bronquiolo se realizó tal y como se ha descrito previamente [110].

En primer lugar se escindió un fragmento de bronquiolo humano, con un diámetro interno de aproximadamente 0,5-1 mm, de una zona del pulmón considerada normal o no

patológica mediante microscopía. Este fragmento fue diseccionado cuidadosamente, para eliminar restos de parénquima pulmonar, y se lavó con medio de crecimiento para células epiteliales (BEGM). El medio BEGM está compuesto por medio basal para células epiteliales (BEBM) suplementado con: extracto de pituitaria bovina (52 $\mu\text{g}/\text{mL}$), hidrocortisona (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), factor de crecimiento epidérmico (EGF) humano recombinante (25 ng/mL), epinefrina (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), transferrina (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), insulina (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), triyodo-L-trionina (6,5 ng/mL), gentamicina (40 $\mu\text{g}/\text{mL}$), anfotericina B (50 ng/mL) y ácido retinoico (50 nM).

Tras la limpieza del fragmento, éste se cortó longitudinalmente y se obtuvieron explantes de aproximadamente 2 mm que se depositaron en placas de 6 pocillos tapizadas con colágeno (10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$), a razón de 4-5 explantes por pocillo. Los explantes se orientaron de forma que la capa epitelial estuviese en contacto con la superficie del pocillo. Se incubaron las placas durante 15 minutos en el incubador (37°C y 5% CO_2) para facilitar la adherencia del explante a la superficie colagenizada del pocillo y, pasado este tiempo, se añadió 1 mL de medio BEGM por pocillo. Las placas se incubaron a 37°C con 5% de CO_2 . Las CEBH crecieron alrededor de los explantes, alcanzando una confluencia adecuada tras un periodo de aproximadamente 7 a 12 días.

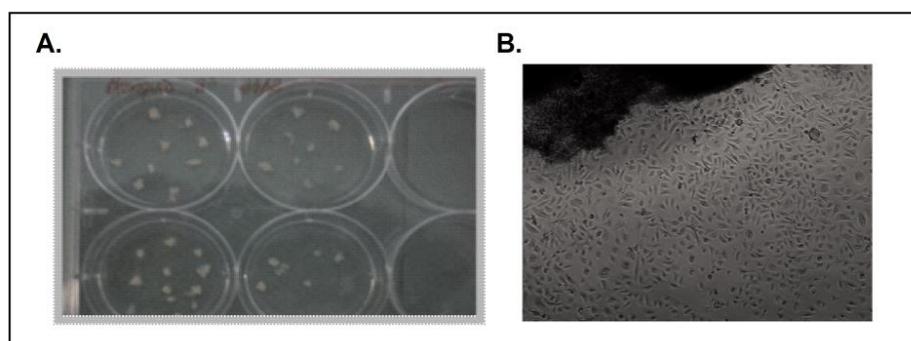


Figura 22. Aislamiento y cultivo primario de células epiteliales bronquiales. A. Explantes de bronquiolo humano colocados en pocillos de placas de cultivo. B. Células epiteliales creciendo alrededor del explante.

A partir de ese momento se retiraron los explantes y los cultivos celulares fueron utilizados para medir la expresión, tanto de ácido ribonucleico (ARN) como de proteína, de marcadores epiteliales y mesenquimales en distintos pacientes en presencia o ausencia de RNO durante 24 horas. Además, se tomaron fotografías de la superficie del cultivo celular con un microscopio de contraste de fases acoplado a cámara Nikon Eclipse TE200 (Nikon, Tokio,

Japón). También se utilizaron los cultivos celulares para realizar análisis por inmunofluorescencia de los distintos marcadores.

La identidad de la monocapa se confirmó como células epiteliales bronquiales, tanto por criterios morfológicos como por inmunofluorescencia de citoqueratina 5 (KRT5). Además, también se confirmó posteriormente mediante la diferenciación *in vitro* en ALI. Este tipo de cultivo celular permitió la diferenciación de la monocapa de células epiteliales a un epitelio bronquial pseudoestratificado caracterizado por la presencia de células basales, columnares, ciliadas y secretoras de moco o caliciformes.

La viabilidad celular fue evaluada mediante el método de tinción por exclusión del azul de tripano utilizando el contador celular automático *Countess® automated cell counter* (Life Technologies, Madrid, España). La viabilidad celular de todos los cultivos utilizados en este estudio fue superior al 98%.

3.2.1.2 Cultivo de células epiteliales bronquiales en ALI.

Las CEBH utilizadas en los distintos experimentos *in vitro*, obtenidas exclusivamente de pacientes no fumadores pertenecientes al grupo control, fueron cultivadas en ALI hasta su diferenciación formando un epitelio bronquial pseudoestratificado [110].

Las CEBH crecieron alrededor de los explantes y, en el momento en que se alcanzó una confluencia adecuada del cultivo primario, se retiraron los explantes y se amplió el cultivo celular en frascos de 75 cm² (tapizados con colágeno) con el medio BEGM descrito anteriormente. Cuando la confluencia del cultivo celular alcanzó el 90-100%, se tripsinizaron y sembraron las células sobre *transwell inserts* (Merck Millipore, Billerica, MA, EEUU) para obtener un cultivo ALI. Este tipo de cultivo representa un modelo experimental de utilidad para lograr la diferenciación del epitelio de las vías aéreas, resultando efectivo en la promoción de la diferenciación tanto de células ciliadas como de células secretoras.

Los *transwell inserts* son unos cestos de poliestireno cuyo fondo es una membrana microporosa de tereftalato de polietileno (PET). Estos cestos se encajan en los pocillos de las placas de 12 pocillos y de esta forma se delimitan dos compartimentos, el superior y el inferior, tal y como se representa en la siguiente figura.

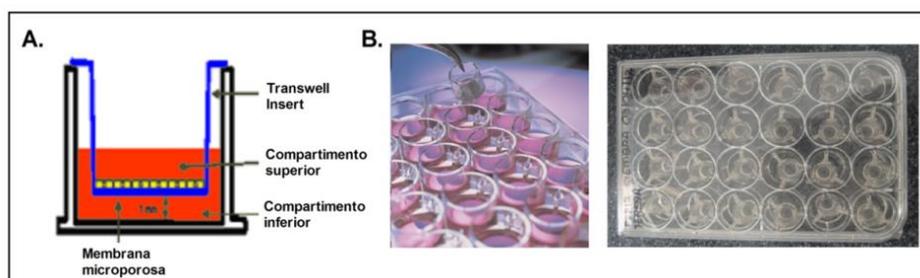


Figura 23. Cultivo de células epiteliales bronquiales en ALI. A. Esquema que representa los compartimentos delimitados por los transwell inserts. B. Colocación de los transwell inserts en los pocillos de las placas de cultivo.

Para formar el epitelio bronquial pseudoestratificado, primero se depositaron las células (150×10^3 células/insert) sobre la membrana porosa. Para aumentar la confluencia, se cultivaron con el medio de crecimiento B-ALITM, que se añadió tanto en la parte superior como en la parte inferior del insert.

En el momento en que se alcanzó una confluencia del 100%, se procedió a la diferenciación del cultivo, utilizando el medio basal de diferenciación B-ALITM suplementado con el *Kit de suplemento del medio B-ALITM*, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. A partir de este momento, se añadió el medio únicamente en el compartimento inferior del insert, debajo de la malla porosa. Las células epiteliales se diferenciaron sobre la membrana formando una lámina continua de células con la cara basal expuesta a medio de cultivo y la cara apical expuesta al aire. Las células se mantuvieron en el incubador (37°C y 5% CO₂) cambiando el medio cada dos días. Aproximadamente en el día 21 se produjo una completa diferenciación del cultivo celular, obteniéndose un epitelio bronquial pseudoestratificado compuesto por células basales, columnares, ciliadas y caliciformes que se consideró “diferenciado”.

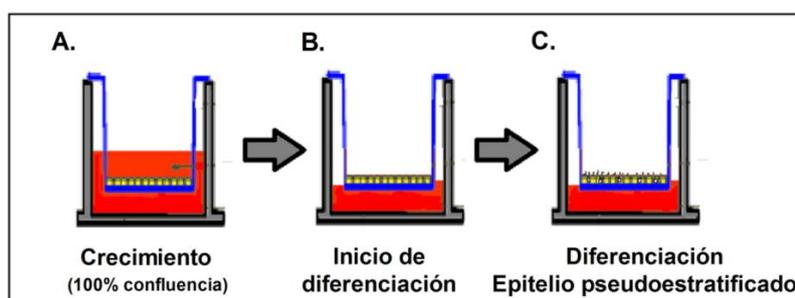


Figura 24. Diferenciación de CEBH *in vitro* mediante cultivo ALI.

Metodología

En general, se continuó el cultivo en ALI hasta observar un 80-90% de células ciliadas mediante microscopía, que corresponde aproximadamente a 3-4 semanas tras el inicio de los cultivos celulares. A partir de este momento se realizaron los distintos experimentos [110].

El análisis fenotípico del cultivo celular de CEBH diferenciadas en ALI se realizó con el fin de observar posibles cambios indicadores de TEM. Para ello, se analizó tanto la morfología celular como el epitelio pseudoestratificado. Se tomaron fotografías de la superficie apical del cultivo celular con un microscopio de contraste de fases acoplado a cámara Nikon Eclipse TE200 (Nikon, Tokio, Japón). Además, también se realizaron tinciones con hematoxilina eosina de secciones de *transwell inserts* incluidos en parafina, tal y como se describe a continuación.

3.2.2. HISTOLOGÍA.

3.2.2.1 Tinción de *transwell inserts* con hematoxilina eosina.

El epitelio bronquiolar pseudoestratificado se fijó con paraformaldehído 4% durante al menos 48 horas. Posteriormente se deshidrató mediante el siguiente procedimiento:

Paso:	Solución:	Tiempo (minutos):
1.	Etanol 70%	30
2.	Etanol 96% I	30
3.	Etanol 96% II	30
4.	Etanol 100% I	30
5.	Etanol 100% II	30
6.	Xileno I	30
7.	Xileno II	30
8.	Parafina I	60

A continuación se procedió a la inclusión en bloques de parafina con un inclusor EC350-1 Myr (Leica Geosystems, Heerbrugg, Suiza). A partir de los bloques obtenidos, se cortaron secciones (4-6 μm de espesor) con un micrótomo HM 340 E (Leica Geosystems, Heerbrugg, Suiza) y se adhirieron a portaobjetos. Para realizar la tinción con hematoxilina-eosina, se desparafinaron los cortes con xileno, se hidrataron con concentraciones decrecientes de etanol y se tiñeron con hematoxilina y eosina. Tras la tinción se deshidrataron las muestras mediante una sucesión de alcoholes crecientes y xileno y se montaron los portaobjetos con el medio de montaje DPX y con cubreobjetos. Se tomaron fotografías de las preparaciones obtenidas con un microscopio de luz visible ($\times 200$; Leica DM6000B).

3.2.2.2 Inmunohistoquímica.

Para realizar el análisis por inmunohistoquímica de tejido pulmonar de pacientes no fumadores (n=4), fumadores (n=10) y EPOC (n=10) se siguió el procedimiento que se describe a continuación, tal y como se ha descrito previamente [180].

El tejido pulmonar se fijó con paraformaldehído 4%, se deshidrató y se procedió a su inclusión en bloques de parafina. A partir de los bloques obtenidos se cortaron secciones (4-6 μm de espesor), que se adhirieron a portaobjetos. Las secciones fueron incubadas con los anticuerpos primarios correspondientes durante 24 horas a 4°C. Pasado este tiempo, fueron incubadas con el anticuerpo secundario correspondiente, anti-ratón o anti-conejo, conjugado con un complejo formado por avidina-biotina junto a la enzima peroxidasa de rábano (Vector Laboratoires, Burlingame, CA). Se utilizó el isotipo control inmunoglobulina G (IgG) como control negativo. En la siguiente tabla se muestran los anticuerpos primarios y secundarios utilizados.

Tabla 12. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados en la inmunohistoquímica.

Anticuerpo primario:	Casa comercial (Referencia):	Origen:
α -SMA	Sigma-Aldrich (A5228)	Ratón
COL tipo I	Affinity Bioreagents (PA1-26204)	Conejo
E-cadherina	ECM BioScience (CM-1681)	Ratón
NOX4	Novus Biologicals (NB110-58849)	Conejo
Vimentina	Sigma-Aldrich (V6389)	Ratón
ZO-1	Abcam (ab59720)	Conejo

Anticuerpo Secundario:	Casa comercial (Referencia):	Dilución:
Anticuerpo anti-ratón IgG (H+L) Biotinilado (origen: rata)	eBioscience (Ref. 13-4013)	1:100
Anticuerpo anti-conejo IgG (H+L) conjugado a biotina (origen: burro)	Jackson ImmunoResearch Laboratoires Inc. (Ref. 711-065-152)	1:100

Todas las secciones con inmunotinción fueron evaluadas con un microscopio Nikon Eclipse TE200 (Nikon, Tokio, Japón) y se tomaron fotografías representativas (10 cortes por paciente). La intensidad de las inmunotinciones de los distintos anticuerpos en el epitelio bronquiolar fue evaluada mediante una escala de 0-3 (Inmunoreactividad: 0-negativa, 1-débil, 2-moderada, 3-fuerte). El porcentaje de células positivas del epitelio bronquial para los distintos anticuerpos fue evaluado mediante una escala de 1-4 (Células positivas: 1: 0-25%, 2: 26-50%, 3: 51-75% y 4: 76-100%). Los valores resultantes para la intensidad de las

inmuntinciones y los porcentajes de células inmunoreactivas fueron multiplicados para obtener una puntuación compuesta, con un rango de 0 a 12.

3.2.2.3 Inmunofluorescencia.

Los explantes de bronquiolos de pacientes no fumadores (n=5), fumadores (n=6) y EPOC (n=6) fueron colocados en pocillos de placas de cultivo y las CEBH crecieron alrededor de los explantes. Cuando las células alcanzaron un 100% de confluencia, se tomaron fotografías de la superficie del cultivo celular con un microscopio de contraste de fases acoplado a cámara Nikon Eclipse TE200 (Nikon, Tokio, Japón). También se realizó análisis por inmunofluorescencia de los distintos marcadores y tinción de F-actina, descrita en el siguiente apartado.

Las CEBH basales de no fumadores, fumadores y pacientes EPOC se lavaron tres veces con PBS y se fijaron con paraformaldehído 4% durante 30 minutos a temperatura ambiente. Tras realizar otros tres lavados con PBS, se permeabilizaron con una solución compuesta por: HEPES 20mM pH=7,6, sacarosa 300mM, NaCl 50mM, MgCl₂ 3mM y Triton X-100 0,5%. Posteriormente, se bloquearon (10% suero de cabra en PBS) e incubaron durante la noche con el anticuerpo primario correspondiente a 4°C. Pasado este tiempo se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente. Se lavaron 3 veces con PBS y se procedió al montaje con el medio específico para fluorescencia DAKO. Las CEBH fueron visualizadas con un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse TE200 acoplado a cámara (Nikon, Tokio, Japón) y se tomaron fotografías representativas (x200). En la siguiente tabla se muestran los anticuerpos primarios y secundarios utilizados.

Tabla 13. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados en la inmunofluorescencia:

Anticuerpo Primario:	Casa comercial (Referencia):	Origen:
E-cadherina	ECM BioScience (CM1681)	Ratón
ZO-1	Abcam (ab59720)	Conejo
KRT5	Acris Antibodies GmbH (BP5069)	Guinea pig
COL tipo I	Affinity Bioreagents (PA1-26204)	Conejo
Vimentina	Sigma-Aldrich (V6389)	Ratón

Anticuerpo Secundario:	Casa comercial (Referencia):	Dilución:
Anticuerpo anti-conejo conjugado a FITC	Molecular Probes.	1:100
Anticuerpo anti-ratón conjugado a FITC	Molecular Probes.	1:100

3.2.2.4 Tinción de F-actina.

Las CEBH basales de no fumadores, fumadores y pacientes EPOC se lavaron tres veces con PBS y se fijaron con paraformaldehído 4% durante 10 minutos a temperatura ambiente. Tras realizar dos lavados adicionales con PBS, se permeabilizaron con una solución compuesta por 0,1% Triton X-100 en PBS durante 3-5 minutos y se lavaron de nuevo con PBS. Se utilizó isotiocianato de tetrametilrodamina (TRITC) conjugado a faloidina (0,2 µg/mL) para el marcaje de la F-actina, tal y como se ha descrito previamente [182]. El marcaje fluorescente utilizado se diluyó en una solución de bloqueo (1% BSA y 0,025% saponina en PBS) y se adicionó a los cubreobjetos durante 40 minutos a temperatura ambiente. Tras 3 lavados con PBS se procedió al montaje de los cubreobjetos en un portaobjetos con el medio de montaje Mowiol. La F-actina presente en el citoesqueleto se visualizó con un microscopio de fluorescencia acoplado a cámara Nikon Eclipse TE200 (Nikon, Tokio, Japón) y se tomaron fotografías representativas.

3.2.3 DISEÑO EXPERIMENTAL.

3.2.3.1 Preparación del EHT.

El EHT, utilizado como estímulo en los experimentos, se obtuvo a partir de cigarros de investigación 2R4F, tal y como se ha descrito previamente [180, 181].

El cigarro se introdujo en una bomba de respiración de animales (*Apparatus Rodent Respirator 680*; Harvard, Alemania) y se generó el humo mediante un mecanismo que simula la acción humana al consumir un cigarro (3 respiraciones/minuto; 1 respiración 35 mL; cada respiración de 2 segundos de duración con 0,5 cm por encima del filtro).



Figura 25. El EHT generado fue utilizado como estímulo en los experimentos *in vitro*. A. Cigarros de investigación 2R4F utilizados en los experimentos. B. Bomba de respiración de animales utilizada para generar el EHT y burbujearlo en el medio de cultivo.

Metodología

El humo de tres cigarrillos, generado mediante este procedimiento, se burbujeó en un frasco con 25 mL de medio basal de diferenciación para células epiteliales B-ALI™ precalentado a 37°C. El EHT generado se filtró con un filtro *Millex-GS Syringe Driven Filter Unit* de 0,22 µm. El extracto así generado fue considerado como 100% de EHT y se utilizó como estímulo en los experimentos, dentro de los 30 minutos posteriores a su preparación. Una concentración de EHT 10% corresponde aproximadamente a la exposición asociada a fumar dos paquetes de cigarrillos al día [183].

La normalización y calidad de la solución de EHT se comprobó mediante medida de absorbancia a 320 nm, longitud de onda específica de absorción del peroxinitrito contenido en el EHT. Las soluciones de EHT madre presentaron una absorbancia de $3,0 \pm 0,1$. Además, para testar la citotoxicidad del EHT en CEBH en medio basal de diferenciación para células epiteliales B-ALI™, se realizó un test de citotoxicidad basado en el análisis de los niveles de lactato dehidrogenasa (LDH). Se trataron las células con concentraciones crecientes de EHT (hasta 5%) durante 72 horas. No se observaron diferencias significativas en los niveles de LDH del sobrenadante en comparación con el grupo control. Además, la combinación de EHT 2,5% con los diferentes fármacos no modificó significativamente el LDH.

3.2.3.2 Estimulación *in vitro* de CEBH.

Estudio I. Evaluación de la presencia de TEM en el remodelado bronquiolar asociado a la EPOC: Aproximación clínica.

En los experimentos *in vitro* del primer estudio, las CEBH diferenciadas fueron estimuladas con EHT (0,5 a 5%) durante los tiempos indicados, cambiando el medio de cultivo y el estímulo cada 24 horas. Los siguientes fármacos e inhibidores fueron añadidos 30 minutos antes del estímulo.

Tabla 14. Fármacos e inhibidores utilizados para el estudio de los mecanismos potencialmente implicados en la TEM.

Nombre	Concentración
dbcAMP	1 mM
NAC	1 mM
APO	100 µM
SIS3	10 µM
PD98059	10 µM
Anticuerpo monoclonal anti-TGF-β1	4 µg/mL

El anticuerpo monoclonal anti-TGF- β 1 humano también fue añadido 30 minutos antes del estímulo para bloquear la forma activa de TGF- β 1 presente en el sobrenadante del cultivo celular, tal y como se ha descrito previamente [177].

Estudio II. Aproximación farmacológica a la TEM asociada al remodelado bronquiolar en la EPOC utilizando el iPDE4 RNO.

En los estudios *in vitro* del segundo estudio, las CEBH diferenciadas fueron estimuladas con EHT (2,5%) durante los tiempos indicados, cambiando el medio de cultivo y el estímulo cada 24 horas. El fármaco en estudio, RNO, fue añadido 30 minutos antes del estímulo.

Tabla 15. Concentraciones del fármaco, RNO, para el estudio de su posible efecto sobre la TEM.

Nombre	Concentración
RNO	2 nM
	1 μ M

Tanto los fármacos para el estudio de mecanismos, como el fármaco en estudio y el EHT fueron añadidos al medio de cultivo del compartimento basolateral (500 μ L) y en la superficie apical (100 μ L). Durante los experimentos se tuvo en cuenta que las manipulaciones en la superficie apical podrían afectar al epitelio pseudoestratificado. Por ello, todas las manipulaciones con vehículo control fueron realizadas en las mismas condiciones que con el EHT y los fármacos en estudio. Por ejemplo, se añadieron volúmenes idénticos de medio de cultivo en la superficie apical de todas las condiciones experimentales y se procedió de igual forma para el compartimento basolateral.

En los experimentos control, donde el vehículo/medio (para compuestos en estudio/EHT) fueron añadidos en la superficie apical de CEBH diferenciadas durante un máximo de 3 días (incluyendo el cambio de medio, fármacos y estímulo cada 24 horas, tal y como se ha indicado), no se observaron diferencias en el número de células ciliadas y la expresión de los marcadores de cilios con respecto a cultivos de CEBH diferenciadas que no presentaron manipulaciones de la superficie apical. En la siguiente figura se representa un esquema del protocolo experimental.

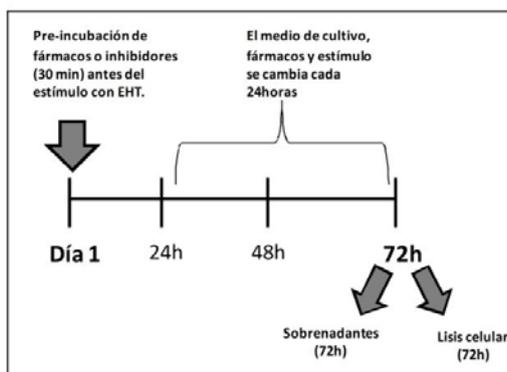


Figura 26. Protocolo para los experimentos *in vitro* de inducción de TEM por EHT. En los experimentos *in vitro* las CEBH diferenciadas fueron preincubadas con los fármacos, inhibidores o el fármaco en estudio durante 30 minutos antes del estímulo con EHT 2,5%. Tanto el medio de cultivo como los inhibidores, el fármaco y el estímulo se cambiaron cada 24 horas durante un máximo de 3 días. Pasado este tiempo se recogió el medio celular sobrenadante de la superficie apical del cultivo y los lisados celulares, que se almacenaron a -80°C hasta su posterior utilización.

3.2.4 ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN GÉNICA: TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR.

3.2.4.1 Extracción de ARN total y cuantificación.

Para aislar el ARN total de CEBH de cultivo primario y de CEBH diferenciadas en ALI se procedió a la lisis celular utilizando el tampón de lisis para la purificación de ácidos nucleicos. El ARN total se aisló mediante el sistema de extracción *ABI Prism™ 6100 Nucleic Acid Prep Station* (Applied Biosystems, Darmstadt, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante.

A continuación se determinó la concentración del ARN extraído mediante el espectrofotómetro *NanoDrop 2000C* (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EEUU), siguiendo las instrucciones del fabricante. Este sistema permitió determinar la concentración del ARN total ($\text{ng}/\mu\text{L}$) mediante medidas de absorbancia a 260 nm (A_{260}) y 280 nm (A_{280}), a partir del espectro de absorción de las muestras. También se obtuvo el valor de la pureza de las muestras, determinado por el ratio A_{260}/A_{280} .

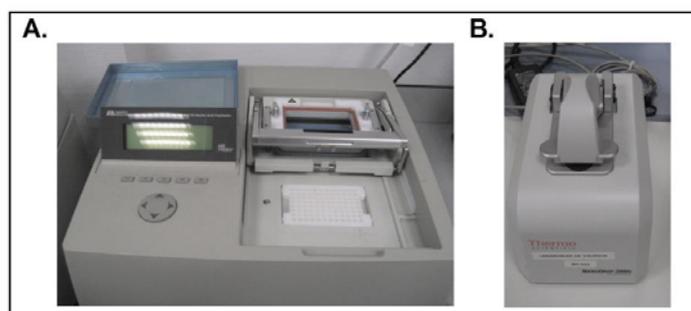


Figura 27. Extracción de ARN total y cuantificación. A. Sistema *ABI Prism™ 6100 Nucleic Acid Prep Station* para la extracción de ácidos nucleicos. B. Espectrofotómetro *NanoDrop 2000C* para la cuantificación de ácidos nucleicos.

La integridad del ARN extraído fue confirmada con el sistema electroforético capilar *2100 Bioanalyzer* (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EEUU), siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARN extraído se almacenó a -80°C hasta su utilización.

3.2.4.2 Retrotranscripción inversa.

En la reacción de retrotranscripción inversa (RT), la enzima retrotranscriptasa inversa sintetiza ácido desoxiribonucleico (ADN) complementario (ADNc) partir de un ARN molde. Tomando en consideración la cuantificación del ARN extraído, se transformó un total de 300 ng de ARN en ADNc utilizando el kit “Taq Man para la retrotranscripción inversa”. Se realizó este proceso en un termociclador *9800 Fast Thermal Cycler* (Applied Biosystems, Perkin-Elmer Corporation, CA, EEUU) con los siguientes pasos: incubación durante 10 minutos a 25°C , ciclo de 30 minutos a 42°C e inactivación de la enzima durante 5 minutos a 95°C . El ADNc sintetizado se almacenó a -20°C hasta su utilización.

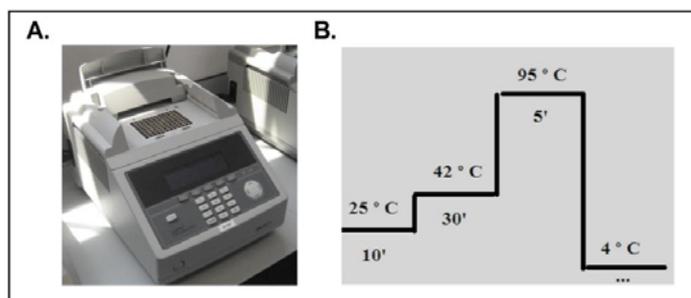


Figura 28. Retrotranscripción inversa. A. Termociclador *9800 Fast Thermal Cycler* para realizar la reacción de retrotranscripción inversa. B. Etapas de la reacción. En la figura se muestran temperaturas ($^{\circ}\text{C}$) y tiempos (minutos) de los distintos pasos de la reacción.

3.2.4.3 RT-PCR a tiempo real.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) consiste en la amplificación selectiva de una región de ADN de interés utilizando oligonucleótidos como cebadores de la síntesis de ADN. Los cebadores se unen específicamente a secuencias que flanquean la región que se pretende amplificar. La reacción de amplificación consiste en la repetición de un ciclo integrado por tres etapas:

- Desnaturalización del ADN molde.
- Hibridación de cebadores.
- Elongación.

La repetición de este ciclo un determinado número de veces produce un aumento exponencial en la cantidad de ADN de la región de interés.

La variante denominada PCR a tiempo real (RT-PCR) constituye una forma precisa de detectar y cuantificar los niveles de ARN mensajero (ARNm). Los equipos de RT-PCR permiten la detección directa del producto de amplificación durante la fase exponencial de la reacción empleando lectores de fluorescencia que permiten medir la fluorescencia emitida durante la reacción. Para ello se utilizaron *Ensayos de Expresión Génica TaqMan®*, que son mezclas pre-formuladas de sondas y cebadores específicos para el gen de interés marcadas con fluorocromos. Los reactivos TaqMan utilizan una sonda fluorogénica y la actividad 5' nucleasa de la Taq polimerasa de ADN para detectar un producto de PCR específico a medida que se acumula durante la reacción, tal y como se detalla en la siguiente figura.

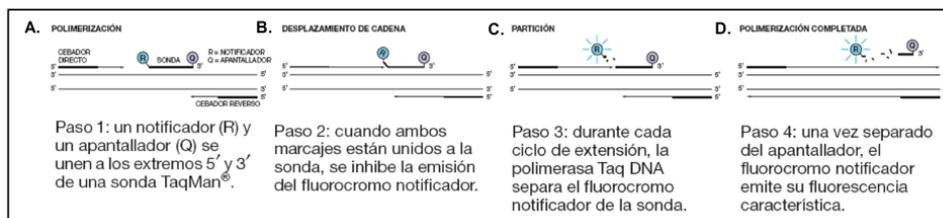


Figura 29. Los reactivos TaqMan utilizan una sonda fluorogénica y la actividad 5' nucleasa de la Taq polimerasa de ADN para detectar un producto específico de la PCR a medida que se acumula durante la reacción (Figura adaptada de "Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System: Guía de reactivos" 2006, 2010).

La existencia de estas sondas fluorogénicas permite la detección en tiempo real únicamente de los productos de amplificación específicos. En la siguiente tabla se enumeran los *Ensayos de Expresión Génica TaqMan®* utilizados para el estudio de la expresión de los genes de interés.

Tabla 16. Ensayos de Expresión Génica TaqMan® utilizados en la RT-PCR (Applied Biosystems).

Gen	Símbolo del gen	Referencia	Longitud del amplicón (pb)
α-SMA	ACTA1	Hs00559403_m1	58
COL I	COL1A1	Hs00164004_m1	66
Vimentina	VIM	Hs00958116_m1	70
E-cadherina	CDH1	Hs01023894_m1	61
ZO-1	TJP1	Hs01551861_m1	148
KRT5	KRT5	Hs00361185_m1	133
KRT18	KRT18	Hs02827483_g1	64
NOX4	NOX4	Hs00276431_m1	73
GADPH	GAPDH	4310884E	118

Cada reacción de PCR contenía los siguientes componentes:

- 1 µL de ADNc sintetizado en la transcripción inversa
- 5 µL de *TaqMan® Gene Expression Master Mix*
- 0,5 µL de la sonda y cebadores correspondientes
- 3,5 µL de agua dietilpirocarbonato (DEPC).

La PCR se desarrolló en un termociclador *7900HT Fast Real-Time PCR System* (Applied Biosystems) con las siguientes condiciones: un paso inicial de 2 minutos a 0°C, un ciclo de 10 minutos a 95°C y 40 ciclos de 15 segundos a 95°C seguidos de 1 minuto a 60°C.

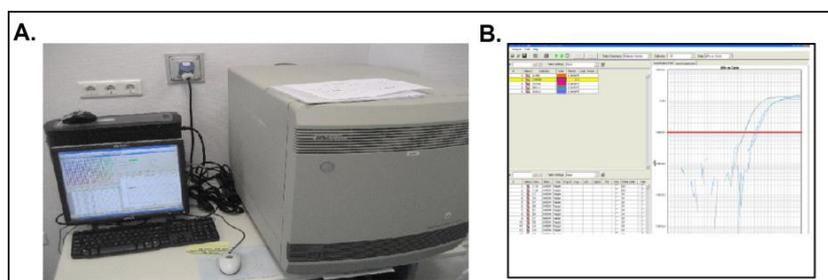


Figura 30. RT-PCR a tiempo real. A. Termociclador *7900HT Fast Real-Time PCR System* para la realización de la RT-PCR. B. Software *RQ Manager* utilizado para el análisis de las curvas de amplificación obtenidas y la cuantificación de la expresión génica.

A partir de los datos de fluorescencia registrados se obtuvieron curvas de amplificación en las que se representaba el logaritmo de la intensidad de fluorescencia frente al número de ciclos transcurridos. Para medir la expresión de un determinado gen se utilizó el ciclo umbral (Ct), ciclo en el que se alcanza el nivel prefijado de fluorescencia. Cuantas más copias haya de ARNm de partida del gen estudiado, más ADNc se obtendrá en la retrotranscripción inversa y antes comenzará la amplificación a ser exponencial.

La cuantificación relativa de los distintos genes se realizó con el método de comparación de Ct, utilizando el gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH) como control endógeno y normalizando los resultados al grupo control. En este método se utiliza la siguiente ecuación:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_1 - \Delta Ct_2$$

Siendo:

$\Delta Ct_1 = (\text{Ct gen problema} - \text{Ct gen referencia})$ de la muestra 1

$\Delta Ct_2 = (\text{Ct gen problema} - \text{Ct gen referencia})$ 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. El proveedor de las sondas utilizadas en los experimentos garantiza que la eficiencia en las reacciones es de 1. Se estudió cada muestra por duplicado, se corrigieron los valores frente al gen referencia y se normalizaron frente al grupo control. Se calculó el valor $2^{-\Delta\Delta Ct}$ de los distintos grupos y se representó junto al grupo control, cuyo valor de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ es igual a 1. El valor $2^{-\Delta\Delta Ct}$ equivale a la expresión relativa de ARNm de un determinado gen.

3.2.5 ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN PROTEICA.

3.2.5.1 Tecnología de microchips de proteínas Zeptosens.

La expresión proteica de muestras de tejido pulmonar de pacientes no fumadores, fumadores y EPOC se analizó con la tecnología de microchips de proteínas Zeptosens (División de Bayer (Schweiz), Suiza), tal y como se ha descrito previamente [164].

Se lisaron tanto CEBH primarias de no fumadores, fumadores y pacientes EPOC como CEBH diferenciadas en ALI, utilizando el tampón de lisis CLB1. Tras la lisis se incubaron durante

30 minutos a temperatura ambiente y se centrifugaron (5 minutos a 15.000xg) para eliminar restos celulares y recoger los sobrenadantes, que fueron congelados en nitrógeno líquido y almacenados a -80°C , hasta su utilización. Se determinó la concentración proteica total utilizando el reactivo *Coomassie PlusTM Protein Assay* para posteriormente ajustar el contenido proteico a 2 mg/mL. Se prepararon 4 diluciones de cada una de las muestras, utilizando una solución tampón con la siguiente composición: 10% CLB1 y 90% de un tampón preparado con PBS + 10% DMSO + 5% Glicerol. Se obtuvieron cuatro concentraciones proteicas (0,2 mg/mL, 0,15 mg/mL, 0,1 mg/mL y 0,05 mg/mL) de cada una de las muestras. Los chips utilizados, *ZeptoMark chips* (Zeptosens), se impregnaron con gotas de 400pL de cada dilución mediante un sistema robotizado de micro-pipetas *Nano-PlotterTM* (NP2.1, GeSiM, Großerkmannsdorf, Alemania). Además, también se impregnaron los chips con la sustancia de referencia *BSA-Zenon Alexa Fluor 647* como control interno del sistema.

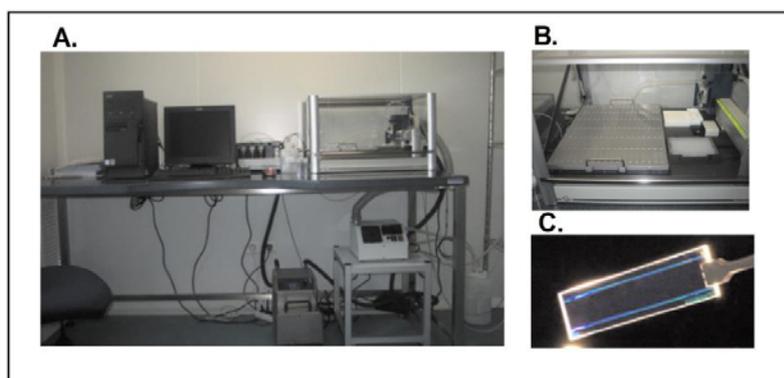


Figura 31. Estudio de la expresión proteica mediante tecnología de microchips de proteínas Zeptosens: Preparación de los chips. A-B. El sistema robotizado de micro-pipetas *Nano-PlotterTM* impregna los chips con gotas de 400pL de cada dilución de la muestra. C. Chip Zeptomark (Zeptosens).

A continuación, se secaron los chips durante 1 hora a 37°C y posteriormente fueron bloqueados mediante nebulización con el tampón de bloqueo BB1 utilizando la unidad de nebulización ultrasónica *Zeptofog Blocking Station* (Zeptosens). Los chips, ya bloqueados, se lavaron con agua (calidad Milli-Q), se secaron por centrifugación y se almacenaron a 4°C en oscuridad hasta su utilización. Para realizar las incubaciones con los anticuerpos primarios, se ensamblaron los chips en *ZeptoCARRIERS* (Zeptosens), unos dispositivos que contienen unas estructuras fluidicas que permiten la incubación y el lavado de los chips, y se siguieron los protocolos estándares de Zeptosens.

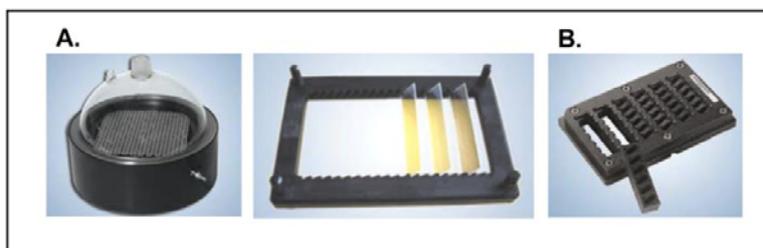


Figura 32. Estudio de la expresión proteica mediante tecnología de microchips de proteínas Zeptosens: Bloqueo de los chips e incubación con los anticuerpos.
 A-B. Los chips fueron bloqueados mediante nebulización utilizando la unidad de nebulización ultrasónica *Zepto fog Blocking Station*. C. Los chips se ensamblaron en *ZeptoCARRIERS* para realizar las incubaciones con los anticuerpos primarios.

En primer lugar, los chips fueron bloqueados utilizando el tampón de ensayo CAB1, un tampón que contiene un 5% de albúmina sérica bovina (BSA), durante 30 minutos en oscuridad para evitar uniones inespecíficas. Transcurrido este tiempo, se lavaron los chips y se incubaron con el anticuerpo primario (dilución 1:500 en CAB1), durante 24 horas, en oscuridad y a temperatura ambiente. Tras realizar lavados con CAB1, se incubaron los chips con los anticuerpos secundarios marcados con fluorescencia (dilución 1:500 en CAB1) durante 1 hora a temperatura ambiente. En la siguiente tabla se muestran los anticuerpos primarios y secundarios utilizados.

Tabla 17. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados en los microchips de proteínas Zeptosens:

Anticuerpo Primario:	Casa comercial (Referencia):	Origen:
α -SMA	Sigma-Aldrich (A5228)	Ratón
B-actina	Sigma-Aldrich (A1978)	Ratón
COL I	Affinity Bioreagents (PA1-26204)	Conejo
E-cadherina	ECM BioScience (CM1681)	Ratón
ERK1/2	Cell Signalling (4695)	Ratón
Fosfo-ERK1/2	Sigma-Aldrich (M9692)	Ratón
Fosfo-Smad3	Calbiochem (PS1023)	Conejo
NOX4	Novus Biologicals (NB110-58849).	Conejo
Smad3	Calbiochem (566414)	Conejo
Vimentina	Sigma-Aldrich (V6389)	Ratón
ZO-1	Abcam (ab59720)	Conejo

Anticuerpo Secundario:	Casa comercial (Referencia):	Dilución:
Zenon Alexa Fluor 647 IgG anti-conejo	Molecular Probes (Z25308)	1:500
Zenon Alexa Fluor 647 IgG anti-ratón	Molecular Probes (Z25008)	1:500

Tras realizar varios lavados con CAB1 para eliminar el exceso de anticuerpo secundario, se realizó la lectura de fluorescencia de los chips con el aparato *ZeptoREADER™* (Zeptosens), utilizando el filtro rojo ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 635/670$ nm). La señal de fluorescencia fue integrada en un periodo de 1-10 s, dependiendo en la intensidad de señal. Las imágenes de los chips fueron almacenadas como archivos TIFF (16-bit) y analizadas con el software *ZeptoView™ Pro* (versión 2.0, Zeptosens).



Figura 33. Lectura de la fluorescencia y análisis de resultados. A. Lectura de la fluorescencia de los chips con el aparato *ZeptoREADER™*. B. Las imágenes de los chips fueron almacenadas como archivos TIFF (16-bit) y analizadas con el software *ZeptoView™ Pro* (versión 2.0, Zeptosens).

Se obtuvieron intensidades relativas representando intensidades netas frente a la concentración proteica de las muestras obtenida mediante el test *Bradford-Coomassie Plus*, como se ha descrito anteriormente. Los ocho puntos de cada muestra fueron ajustados mediante un ajuste lineal por mínimos cuadrados ponderado [184] y la intensidad relativa fue interpolada a la concentración proteica mediana. La desviación estándar obtenida mediante este ajuste es indicativa de la linealidad de la serie de diluciones. Posteriormente, los datos fueron re-normalizados para corregir pequeñas variaciones en el contenido proteico utilizando β -actina, ERK1/2 o Smad3 como estándares internos (Tabla 17).

3.2.5.2 Western Blot.

La técnica de Western blot fue utilizada para detectar cambios en la expresión proteica de β -catenina (98 kD), tanto nuclear como citoplasmática, en CEBH de no fumadores, fumadores y pacientes EPOC. Se extrajo proteína nuclear y citoplasmática con el kit de extracción *Nuclear active motif kit* (Active Motif, Europa, Rixensart, Bélgica) de acuerdo al protocolo del fabricante. El ensayo *BCA Protein Assay Kit* (Thermo Scientific, Waltham, MA, EEUU) fue utilizado, siguiendo las instrucciones del fabricante, para cuantificar el nivel de proteína y así garantizar una cantidad equivalente de proteína cargada para cada muestra.

Metodología

Se empleó la electroforesis en gel de acrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS) para separar las proteínas de acuerdo a su peso molecular. Las proteínas desnaturalizadas (10 µg) y el marcador de peso molecular *Amersham High-Range Rainbow* se cargaron en los pocillos de un gel de poliacrilamida, formado por un gel de apilamiento (acrilamida al 5%) situado encima de un gel de resolución (acrilamida al 10%). Se aplicó al gel una corriente eléctrica de 100V durante 1 hora, provocando que las proteínas migrasen a su través. Posteriormente, se transfirieron las proteínas del gel a una membrana de nitrocelulosa *Amersham Hybond ECL Nitrocellulose Membrane (Amersham GE Healthcare)* utilizando un método de transferencia semi-húmeda. La membrana fue bloqueada con BSA 5% en PBS con 0,1% de TWEEN®20 durante 3 horas e incubada con el anticuerpo primario anti-β-catenina durante toda la noche a 4°C. Tras la incubación, se lavó la membrana y se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente, conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) durante 1 hora. En la siguiente tabla se muestran los anticuerpos primarios y secundarios utilizados.

Tabla 18. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados:

Anticuerpo Primario:	Casa comercial (Referencia):	Dilución:
β-catenina (origen: conejo)	Novus Biologicals (NBP1-89989)	1:1000
β-actina (origen: ratón)	Sigma-Aldrich (A1978)	1:1000

Anticuerpo Secundario:	Casa comercial (Referencia):	Dilución:
Anticuerpo anti-ratón conjugado a HRP (origen: burro)	Thermo Scientific (SA1-100)	1:1000
Anticuerpo anti-conejo conjugado a HRP (origen: burro)	Thermo Scientific (SA1-200)	1:1000

El método utilizado para la detección de la proteína es un método basado en la detección por quimioluminiscencia y para ello se utilizaron los reactivos *ECL plus* (Amersham GE Healthcare). La expresión proteica de β-catenina fue normalizada al total de β-actina (Tabla 18).

3.2.6 RESISTENCIA TRANS-EPITELIAL.

La resistencia eléctrica transepitelial (TEER) fue medida en células diferenciadas utilizando el sistema de resistencia eléctrica *Millicell ERS-2 Voltohmmeter* (Millipore, Reino Unido). Las CEBH diferenciadas fueron incubadas en presencia o ausencia de EHT (0,5%-5%) hasta 72 horas. Posteriormente, el medio fue aspirado y reemplazado con 1 mL y 0,5 mL en los compartimentos basolateral y apical, respectivamente. Los cultivos fueron equilibrados en el incubador durante 30 minutos antes de realizar la medida de TEER. Pasado este tiempo, se restablecieron las condiciones ALI aspirando el medio del compartimento apical. Las medidas de TEER del insert y del medio (solo) se restaron de la medida de TEER y se calculó el resultado en unidades $\Omega \cdot \text{cm}^2$, multiplicando por el área del insert.

3.2.7 MEDIDA DE LA PRODUCCIÓN INTRACELULAR DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO.

El compuesto 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato ($\text{H}_2\text{DCF-DA}$) es un indicador no fluorescente, permeable a las células, que en presencia intracelular de $\text{O}_2^{\cdot -}$ y H_2O_2 , sufre un proceso combinado de hidrólisis y oxidación dando lugar al compuesto fluorescente 2',7'-diclorofluoresceína (DCF). Por tanto, esta reacción con $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ puede ser utilizada para monitorizar la generación intracelular de especies reactivas de oxígeno [185].

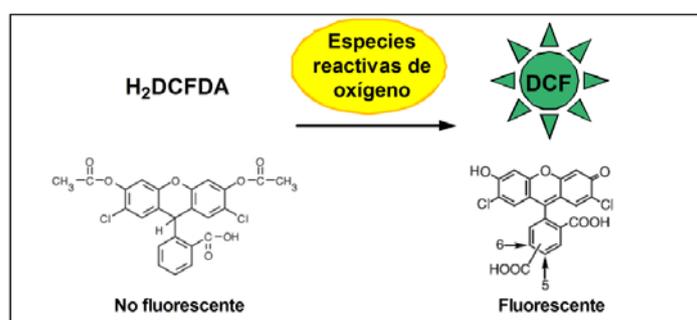


Figura 34. Reacción con $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ y DCF para monitorizar la generación intracelular de especies reactivas de oxígeno.

Para cuantificar los niveles intracelulares de especies reactivas de oxígeno, se lavaron las CEBH con PBS (dos veces) y se incubaron durante 30 minutos con $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ 50 μM , diluida en Opti-MEM, en presencia o ausencia de dbcAMP o los antioxidantes NAC o APO. Posteriormente, se lavaron las células de nuevo con PBS (dos veces) para eliminar restos de $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ y se estimularon con EHT durante 30 minutos en presencia o ausencia de los mismos

fármacos indicados anteriormente. Para cuantificar los niveles de especies reactivas de oxígeno, se midió la intensidad de fluorescencia en cinco campos por condición, seleccionados al azar, utilizando un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse TE200 (Nikon, Tokio, Japón) con un filtro establecido para isotiocianato de fluoresceína (FITC). La captura y análisis de las imágenes se realizó utilizando el software *Metafluor*[®] 5.0 (Analytical Technologies, EEUU). Los resultados se expresaron como fluorescencia de DCF en unidades de fluorescencia relativa (UFR)

3.2.8 ENSAYOS ELISA PARA TGF- β 1, AMPc y MMP-9.

El análisis de la liberación de TGF- β 1 activo se realizó utilizando el kit *Quantikine Human TGF- β 1 Immunoassay*, que permite determinar cuantitativamente los niveles de TGF- β 1 en el sobrenadante de las células, siguiendo las instrucciones del fabricante. Este kit se basa en un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) cuantitativo para TGF- β 1 que se realizó en los sobrenadantes de CEBH diferenciadas tras 72 horas de estimulación con EHT en presencia o ausencia de dbcAMP, NAC, APO o N-óxido roflumilast.

En primer lugar, se procedió a la activación de los complejos latentes de TGF- β 1 con tratamiento ácido. Esto se realizó tratando 50 μ L de sobrenadante celular con 10 μ L de HCl 1M y, tras una incubación de 10 minutos, se neutralizó con 10 μ L de NaOH 1,2 M y HEPES 0,5 M. Este kit emplea la técnica de ELISA cuantitativo en sándwich en una placa, que ha sido previamente incubada con un anticuerpo específico policlonal para TGF- β 1. Se añadieron 50 μ L de diluyente (RD1-21), y posteriormente 50 μ L de estándar TGF- β 1 (31,2-2000 pg/mL para la curva patrón), controles y de muestra activada. Se incubó la placa durante 2 horas, durante las cuales cualquier molécula de TGF- β 1 presente se unió al anticuerpo inmovilizado. Se realizaron lavados, para eliminar uniones inespecíficas, y se añadieron 100 μ L de un anticuerpo policlonal específico para TGF- β 1 conjugado a una enzima, y se incubó durante 2 horas más. Se realizaron lavados, se añadieron 100 μ L de una solución de sustrato y se incubó 30 minutos en oscuridad. Durante este tiempo se desarrolló una coloración proporcional a la concentración de TGF- β 1 unida en el paso inicial. Se detuvo la reacción y se midió la absorbancia a 450 nm en el espectrofotómetro *Victor 1420 Multilabel Counter* (Perkin Elmer). A partir de los datos se obtuvo la concentración de TGF- β 1 (pg/mL) liberado en las distintas condiciones experimentales.

El contenido intracelular de AMPc fue determinado en CEBH diferenciadas, tal y como se ha descrito previamente [111]. Tras realizar las incubaciones con EHT en presencia o

ausencia de dbcAMP, NAC, APO o N-óxido roflumilast, se retiró el sobrenadante y las células fueron lavadas con PBS. Posteriormente, se lisaron las células y se determinó el contenido intracelular de AMPc con el kit Amersham *cAMP Biotrak Enzymeimmunoassay System*, siguiendo las instrucciones del fabricante. Los resultados se expresaron como AMPc (fmol) por mg de proteína (por insert).

La metaloproteinasa de matriz tipo 9 (MMP-9) fue determinada utilizando un kit ELISA disponible comercialmente, siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.2.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

El análisis estadístico de los resultados se realizó mediante análisis paramétrico o no paramétrico, según corresponda. El valor de $p < 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo.

Se utilizó un análisis no paramétrico para comparar los resultados obtenidos a partir de las células epiteliales de pacientes no fumadores, fumadores y EPOC. En este caso, los resultados se representan como medianas, rango intercuartil y valores mínimos y máximos. Cuando la comparación solamente concernía a dos grupos, las diferencias entre grupos fueron analizadas con el test de Mann-Whitney. Cuando la comparación fue entre varios grupos (no fumadores, fumadores y EPOC), en primer lugar se realizó un análisis de varianza de una vía no paramétrico (Test de Kruskal-Wallis). En el caso de una diferencia significativa global, se evaluó las comparaciones entre grupos con el test posthoc de Dunn, que generaliza el procedimiento de ajuste por Bonferroni.

Los experimentos *in vitro* para el estudio de los mecanismos implicados fueron realizados únicamente en CEBH diferenciadas de pacientes no fumadores. En este caso, se expresaron los resultados como la media (error estándar) de n experimentos, ya que se confirmó la distribución normal de cada conjunto de datos mediante análisis de histograma y test de Kolmogorov-Smirnov. En este caso, el análisis estadístico fue realizado por análisis paramétrico. Las comparaciones entre dos grupos fueron realizadas utilizando el test de Student de dos colas para muestras apareadas (en el caso de muestras dependientes) o el test de Student para muestras desapareadas (para muestras independientes). Las comparaciones múltiples fueron analizadas por análisis de varianza de una vía o de dos vías seguido de tests post hoc de Bonferroni. El análisis estadístico fue realizado con los datos directos, considerados como la expresión génica corregida por el gen constitutivo GAPDH o la expresión

Metodología

proteica corregida por los estándares internos β -actina, ERK1/2 total y Smad3 total, según corresponda. El análisis de los niveles de AMPc, MMP-9 y TGF- β 1 en los sobrenadantes así como la fluorescencia de DCF fue realizado con los datos directos.

Por último, las correlaciones entre los marcadores mesenquimales, epiteliales y marcadores de señalización intracelular con la función pulmonar de fumadores y pacientes EPOC fueron analizadas utilizando el coeficiente de correlación de Spearman (ρ).

4. RESULTADOS

4.1 ESTUDIO I. EVALUACIÓN DE LA PRESENCIA DE TEM EN EL REMODELADO BRONQUIOLAR ASOCIADO A LA EPOC: APROXIMACIÓN CLÍNICA.

Las CEBH primarias de pacientes no fumadores, fumadores y EPOC se aislaron de bronquiolos obtenidos de tejido pulmonar no tumoral de pacientes sometidos a cirugía (lobectomía o resección en cuña) por cáncer de pulmón. En la siguiente tabla se muestran las características clínicas de los pacientes:

Tabla 19. Características clínicas de los pacientes. Los datos se representan como mediana [rango intercuartil].

	No fumadores (n=5)	Fumadores (n=12)	EPOC (n=15)
Género (Mujeres/Hombres)	4/1	2/10	3/12
Edad (años)	64 [56-72]	63 [52-76]	65 [54-74]
Consumo de tabaco, paquete-año	0	40 [33-46]	36 [28-43]
VEF₁, % predicho	102 [97-108]	91 [90-100]	71 [55-79]
CVF, % predicho	104 [93-108]	96 [92-106]	94 [91-101]
VEF₁/CVF%	95 [91-101]	85 [77-91]	63 [54-68]
PaO₂, mmHg	89 [85-93]	85 [81-90]	80 [78-83]
PaCO₂, mmHg	38 [36-41]	37 [35-40]	40 [38-42]

VEF₁: Volumen espiratorio forzado en el primer segundo; CVF: Capacidad vital forzada; Paquete-año: 1 año fumando 20 cigarros/día; PaO₂: Presión de oxígeno en sangre arterial; PaCO₂: Presión de dióxido de carbono en sangre arterial.

4.1.1. LOS MARCADORES CELULARES DE TEM ESTÁN AUMENTADOS EN CÉLULAS EPITELIALES BRONQUIALES PRIMARIAS DE FUMADORES Y PACIENTES EPOC.

En primer lugar se estudió la expresión de los marcadores de TEM en CEBH primarias de no fumadores, fumadores y pacientes EPOC. En condiciones basales, las CEBH primarias de fumadores y pacientes EPOC mostraron una expresión significativamente aumentada, tanto en ARNm como en proteína, de los marcadores mesenquimales típicos: α -SMA, vimentina y COL tipo I (Figura 35A-C).

Del mismo modo que con los marcadores mesenquimales, la expresión de ARNm y proteína de la subunidad de la NADPH oxidasa, NOX4, también estaba significativamente aumentada en CEBH primarias de fumadores y pacientes EPOC (Figura 35D).

Resultados

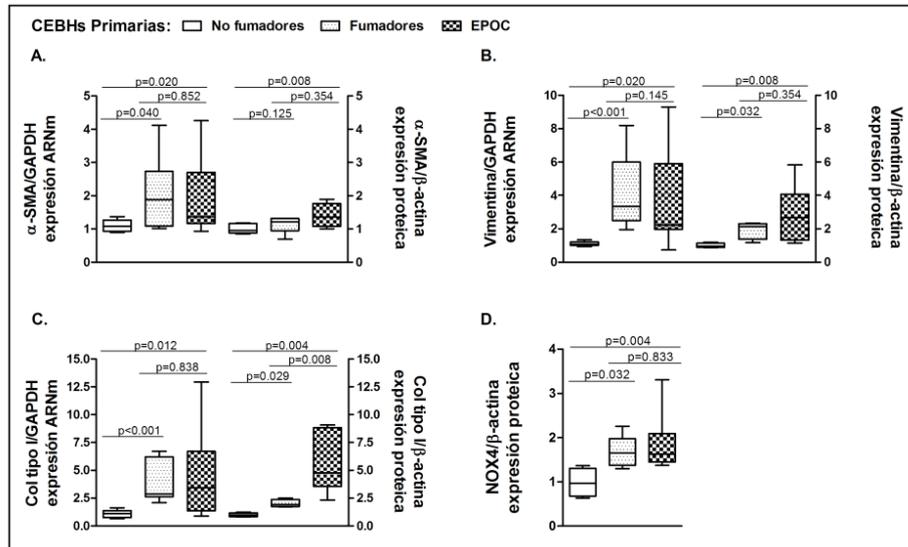


Figura 35. Expresión de marcadores mesenquimales en células epiteliales bronquiales humanas (CEBH) primarias de no fumadores, fumadores y pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). Las CEBH primarias se aislaron de bronquiolos de no fumadores (n=5), fumadores (n=12) y pacientes con EPOC (n=15) y se obtuvo ARN total y proteínas, tal y como se describe en la sección de Métodos. Se determinó la expresión de ARNm y proteína mediante PCR a tiempo real y tecnología de microchips de proteínas Zeptosens, respectivamente, con las sondas apropiadas y los anticuerpos específicos. En la figura se muestra la expresión basal de los transcritos de ARNm o de proteína de los marcadores mesenquimales (A) α -actina de músculo liso (α -SMA), (B) vimentina, (C) colágeno tipo I (Col tipo I) o (D) NOX4. Los datos se expresan como el ratio a GAPDH para los niveles de ARNm y a β -actina para los niveles de proteína, normalizados al grupo de no fumadores. Los resultados se presentan como diagramas de caja representando la mediana, el rango intercuartil y los valores mínimos y máximos. Los valores p exactos se obtuvieron con el test de Kruskal-Wallis y el test post hoc de Dunn.

En cambio, el análisis de los marcadores epiteliales mostró una disminución significativa de ARNm de E-cadherina, ZO-1, KRT5 y KRT18 en pacientes con EPOC pero no en fumadores, y una disminución en la expresión proteica de E-cadherina y ZO-1 en fumadores y en pacientes con EPOC (Figura 36A-D).

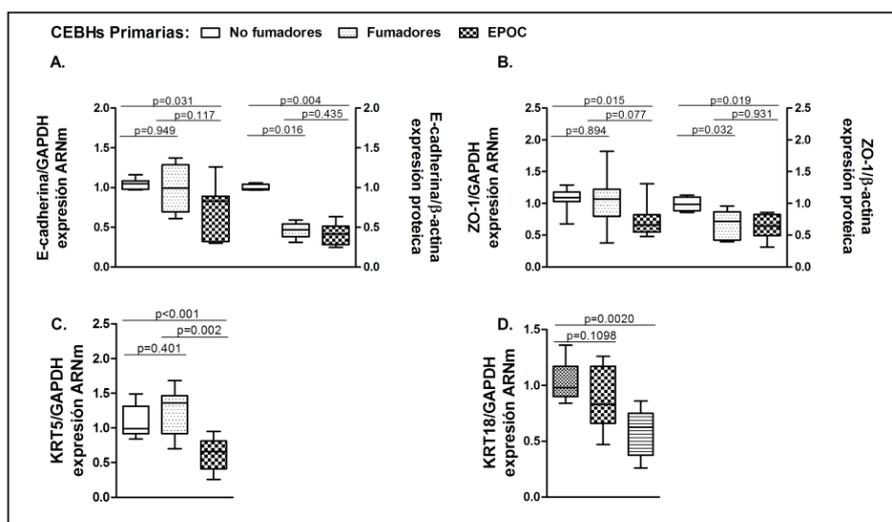


Figura 36. Expresión de marcadores epiteliales en células epiteliales bronquiales humanas (CEBH) primarias de no fumadores, fumadores y pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). Las CEBH primarias se aislaron de bronquiolos de no fumadores (n=5), fumadores (n=12) y pacientes con EPOC (n=15) y se obtuvo ARN total y proteínas, tal y como se describe en la sección de Métodos. Se determinó la expresión de ARNm y proteína mediante PCR a tiempo real y tecnología de microchips de proteínas Zeptosens, respectivamente, con las sondas apropiadas y los anticuerpos específicos. En la figura se muestra la expresión basal de los transcritos de ARNm o de proteína de los marcadores epiteliales (A) E-cadherina, (B) ZO-1, (C) KRT5 o (D) KRT18. Los datos se expresan como el ratio a GAPDH para los niveles de ARNm o a β-actina para los niveles de proteína, normalizados al grupo de no fumadores. Los resultados se presentan como diagramas de caja representando la mediana, el rango intercuartil y los valores mínimos y máximos. Los valores p exactos se obtuvieron con el test de Kruskal-Wallis y el test post hoc de Dunn.

Además, también se estudió la expresión de posibles mediadores de TEM. La fosforilación de ERK1/2 estaba significativamente aumentada en fumadores y pacientes con EPOC. En cambio, la fosforilación de Smad3 sólo estaba aumentada en células de pacientes con EPOC (Figura 37A-B). La expresión del factor de transcripción β-catenina, característico del programa de TEM, estaba disminuida en el citoplasma y aumentada en el núcleo de células epiteliales de fumadores y pacientes con EPOC (Figura 37C). Además, los sobrenadantes celulares basales de cultivos de 24 horas de células de pacientes con EPOC mostraron una mayor liberación de MMP-9 que aquellos de no fumadores o fumadores (Figura 37D), una proteasa que degrada la membrana basal epitelial.

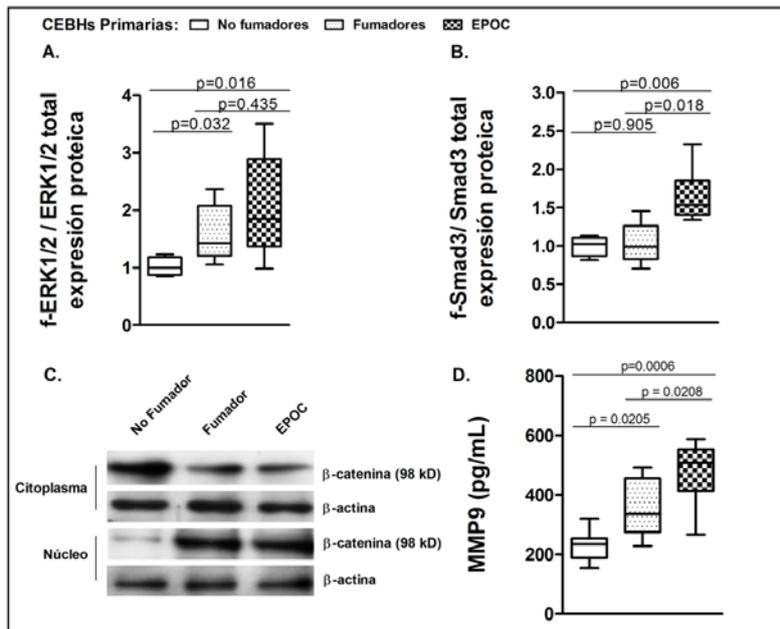


Figura 37. Expresión de mediadores de transición epitelial mesenquimal (TEM) en células epiteliales bronquiales humanas (CEBH) primarias de no fumadores, fumadores y pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). Las CEBH primarias se aislaron de bronquios de no fumadores (n=5), fumadores (n=12) y pacientes con EPOC (n=15) y se obtuvo ARN total y proteínas, tal y como se describe en la sección de Métodos. Se determinó la expresión de ARNm y proteína mediante PCR a tiempo real y tecnología de microchips de proteínas Zeptosens, respectivamente, con las sondas apropiadas y los anticuerpos específicos. En la figura se muestra la expresión basal de proteína de (A) fosfo-ERK1/2 y (B) fosfo-Smad3. Los niveles de proteína fosfo-ERK1/2 y fosfo-Smad3 se expresan como el ratio al total de ERK1/2 y Smad3, respectivamente y normalizados al grupo de no fumadores. (C) Imágenes representativas de western blot para β-catenina citoplasmática y nuclear con el control interno β-actina (D) Los niveles de metaloproteína de matriz 9 (MMP-9) fueron cuantificados por ELISA en cultivos celulares primarios tras 24 horas de cultivo. Los resultados se presentan como diagramas de caja representando la mediana, el rango intercuartil y los valores mínimos y máximos. Los valores p exactos se obtuvieron con el test de Kruskal-Wallis y el test post hoc de Dunn.

En línea con los resultados de expresión de marcadores de TEM, las imágenes tomadas con microscopía de contraste de fases mostraron que aproximadamente un 25% de las células de fumadores y pacientes con EPOC tenían una morfología de huso característica de células mesenquimales (Figura 38).

La expresión de las proteínas de adhesión celular, E-cadherina y ZO-1, fue visualizada por inmunofluorescencia como una línea continua de fluorescencia alrededor del margen de

las células. Las fibras de F-actina se observaron distribuidas en los márgenes de las células, en las zonas de contacto intercelular, en el grupo de no fumadores. En cambio, las células de fumadores y pacientes EPOC mostraron una reducción en la intensidad de fluorescencia de E-cadherina y ZO-1 con una expresión esporádica y difusa. La F-actina de las células de fumadores y pacientes EPOC estaba homogéneamente distribuida como fibras en el citoplasma. Los marcadores mesenquimales colágeno tipo I y vimentina se mostraron aumentados en células de fumadores y pacientes con EPOC y prácticamente ausentes en las células de no fumadores (Figura 38).

El marcador epitelial KRT5 se expresó positivamente en todas las CEBH de no fumadores, fumadores y pacientes con EPOC, aunque su intensidad era más baja en los cultivos primarios de fumadores y pacientes con EPOC. Es más, las células positivas para KRT5 de fumadores y pacientes con EPOC también fueron positivas para marcadores mesenquimales como colágeno tipo I y vimentina (Figura 38).

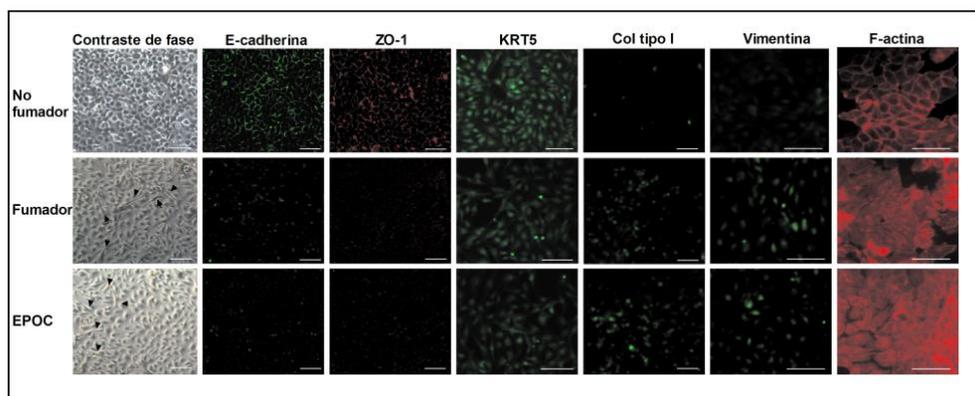


Figura 38. Inmunofluorescencia de marcadores epiteliales y mesenquimales en células epiteliales bronquiales. Los fragmentos obtenidos de bronquiolos de no fumadores (n=5), fumadores (n=6) y pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) (n=6) fueron colocados en placas de cultivo y células epiteliales bronquiales crecieron alrededor de los explantes. Cuando las células alcanzaron un 100% de confluencia, se tomaron imágenes con microscopía de contraste de fase y marcaje con inmunofluorescencia de E-cadherina, ZO-1, KRT5, colágeno tipo I (Col tipo I) y vimentina. Las imágenes de fluorescencia de F actina fueron analizadas con isotiocianato de faloidin-tetrametilrodamina. En la figura se muestran imágenes representativas (escala 20 μ m). Las flechas negras muestran células epiteliales con morfología de huso.

El análisis inmunohistoquímico de los bronquiolos reveló inmunomarcaje de α -SMA en la submucosa de los bronquiolos pero no en las células epiteliales bronquiales de no fumadores (Figura 39, panel A). Sin embargo, tanto en fumadores como en pacientes con EPOC, la inmunotinción de α -SMA fue muy marcada con una localización peri-bronquiolar. Es

Resultados

más, se observó inmunotinción de α -SMA en el epitelio bronquial (Figura 39, paneles F y K, flechas negras). No se detectó inmunotinción de vimentina en las células epiteliales bronquiales de pacientes no fumadores (Figura 39, panel B) pero, tanto en fumadores como en pacientes con EPOC, la vimentina se localizó en células epiteliales basales (Figura 39, paneles G y L). Además, se observó colágeno tipo I aumentado en los bronquiolos de fumadores y pacientes con EPOC, lo que correlaciona con la deposición de matriz extracelular descrita en la fibrosis peribronquiolar [114].

Se observó un marcaje débil de NOX4 en secciones de pulmón de no fumadores, a diferencia de fumadores y pacientes EPOC que expresaron NOX4 en células epiteliales bronquiales así como en leucocitos infiltrados en los bronquiolos (Figura 39, paneles I y N).

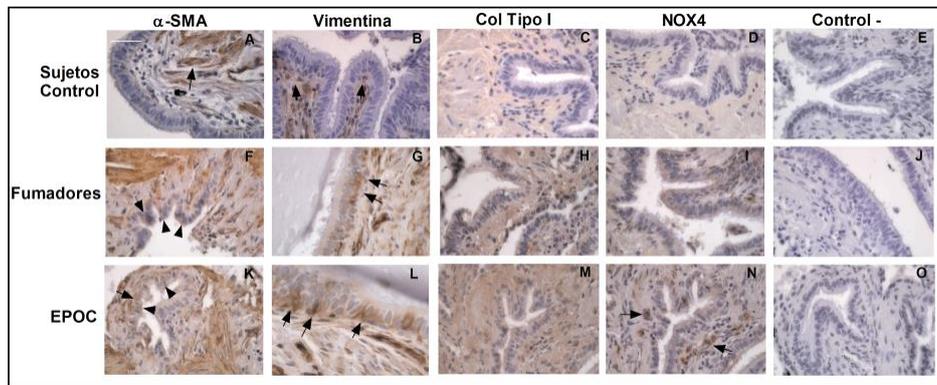


Figura 39. Inmunohistoquímica de marcadores mesenquimales en bronquiolos. Secciones de bronquiolos de no fumadores (n=4), fumadores (n=10) y pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) (n=10) fueron inmunomarcados para los marcadores mesenquimales (A, F, K) α actina de músculo liso (α -SMA), (B, G, L) vimentina, (C, H, M) colágeno tipo I (Col tipo I), (D, I, N) NOX4 (marrón). Las flechas negras muestran la principal distribución del marcaje inmunopositivo en las regiones de los bronquiolos. Se muestran imágenes representativas (escala 45 μ m). El isotipo IgG control siempre dio señal negativa.

Los marcadores epiteliales ZO-1 y E-cadherina se expresaron de forma marcada en el epitelio bronquial de no fumadores (Figura 40, paneles A y B), con una menor expresión en el epitelio bronquial de fumadores y pacientes con EPOC (Figura 40, paneles D-H).

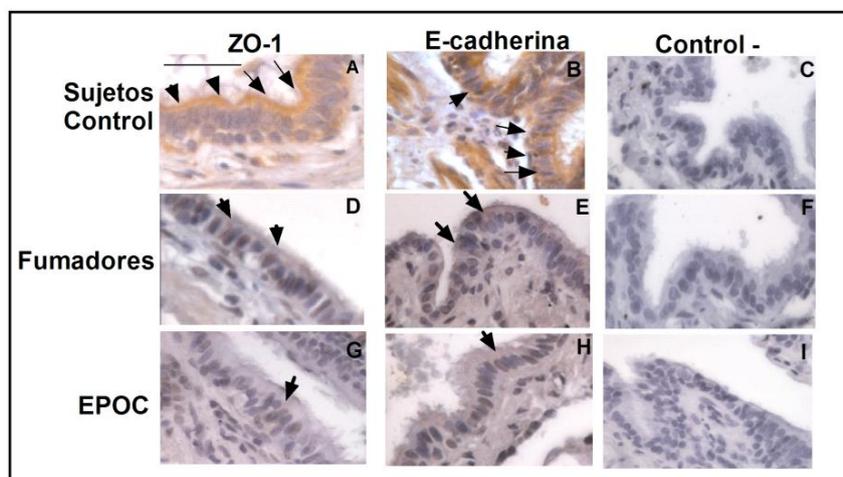


Figura 40. Inmunohistoquímica de marcadores epiteliales en bronquiolos. Secciones de bronquiolos de no fumadores (n=4), fumadores (n=10) y pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) (n=10) fueron inmunomarcados para los marcadores epiteliales (A, D, G) zonula occludens (ZO-1) y (B, E, H) E-cadherina (marrón). Las flechas negras muestran la principal distribución del marcaje inmunopositivo en las regiones de los bronquiolos. Se muestran imágenes representativas (escala 45 μ m). El isotipo IgG control siempre dio señal negativa.

Los valores de la puntuación de la inmunohistoquímica mostraron valores mayores para α -SMA, vimentina, COL tipo I y NOX4 en células epiteliales bronquiales de fumadores y pacientes con EPOC comparado con pacientes no fumadores, y valores inferiores para E-cadherina y ZO-1 (Figura 41).

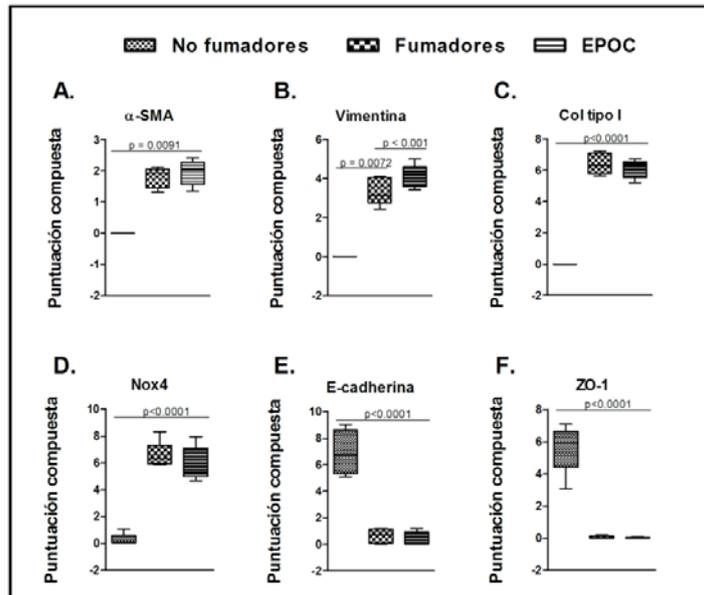


Figura 41. Cuantificación de la inmunohistoquímica de marcadores mesenquimales y epiteliales en bronquiolos. Secciones de bronquiolos de no fumadores (n=4), fumadores (n=10) y pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) (n=10) fueron inmunomarcados para los marcadores mesenquimales (α -SMA, vimentina y COL tipo I) y NOX4, así como para los marcadores epiteliales (E-cadherina, ZO-1). Los diagramas de caja representan el valor de la puntuación para (A) α -SMA, (B) vimentina, (C) COL tipo I, (D) NOX4, (E) E-cadherina y (F) ZO-1 en el epitelio bronquial, en 10 cortes por paciente. Los resultados se presentan como diagramas de caja representando la mediana, el rango intercuartil y los valores mínimos y máximos. Los valores p exactos se obtuvieron con el test de Kruskal-Wallis y el test post hoc de Dunn.

4.1.2. EL EHT INDUCE TEM EN CEBH.

Con el fin de evaluar si el EHT podría inducir TEM directamente en CEBH, se utilizó un modelo *in vitro* de CEBH diferenciadas de pacientes no fumadores.

En primer lugar, se realizaron pruebas preliminares para determinar la dosis óptima del estímulo, EHT, a utilizar en los experimentos. El EHT aumentó la expresión de ARNm de los marcadores mesenquimales α -SMA y COL tipo I de forma dosis dependiente, alcanzando un efecto máximo a una concentración de EHT 2,5%, tras 72 horas de exposición (Figura 42A; $p < 0,05$). Por ello, a partir de estos resultados, se seleccionaron estas condiciones de concentración de EHT y duración del estímulo para evaluar los marcadores de TEM en futuros experimentos.

En los experimentos *in vitro* utilizando CEBH diferenciadas se vio que el EHT, a una concentración de 2,5%, aumentó de forma significativa los transcritos de ARNm y la expresión proteica de los marcadores mesenquimales α -SMA, vimentina y COL tipo I (Figura 42B-C).

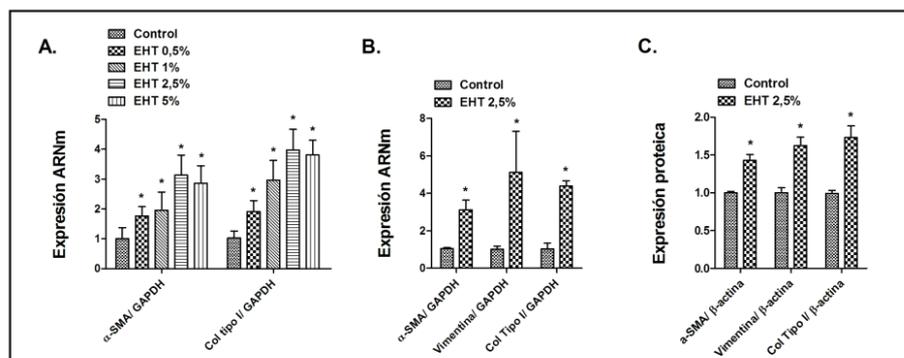


Figura 42. El extracto de humo de tabaco (EHT) aumenta la expresión de los marcadores mesenquimales en células epiteliales bronquiales humanas (CEBH) diferenciadas. Las CEBH diferenciadas se trataron con 0,5-5% EHT o vehículo durante 72 horas y posteriormente se obtuvo el ARN total para PCR a tiempo real (A, B) o lisados celulares para tecnología de microchips de proteínas Zeptosens (C). El EHT indujo la expresión de (A, B) transcritos de ARNm y (C) proteínas de los marcadores mesenquimales α -actina de músculo liso, vimentina y colágeno tipo I (COL tipo I). Los datos se expresan como el ratio a GAPDH para los niveles de ARNm y a β -actina para los niveles de proteína, normalizados al grupo control. Los resultados se expresan como la media (error estándar) de n=4 experimentos independientes por condición (un paciente no fumador). Los resultados fueron analizados por ANOVA de una vía seguido del test post hoc de Bonferroni (A) o mediante el test de la t de Student (B, C). *p<0,05 respecto al control.

En cambio, el EHT a esta misma concentración disminuyó significativamente los marcadores epiteliales E-cadherina, ZO-1, KRT5 y KRT18 (Figura 43A-B).

Además, de acuerdo con esta pérdida de expresión de las proteínas de adhesión celular, el EHT (0,5-5%) también disminuyó de forma dosis dependiente la TEER (Figura 43C), considerada un marcador que evidencia la pérdida de la barrera epitelial celular.

Resultados

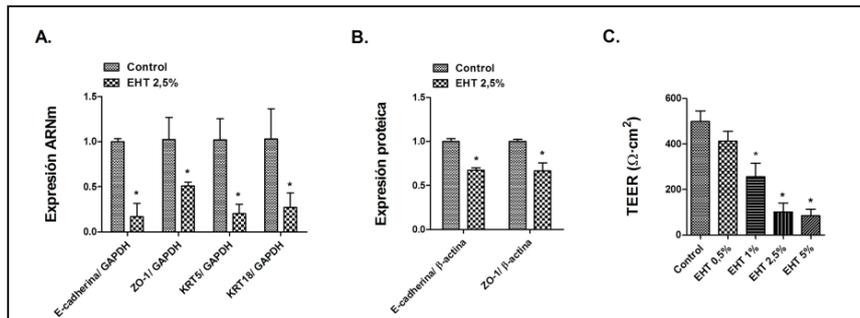


Figura 43. El extracto de humo de tabaco (EHT) disminuye la expresión de los marcadores epiteliales en células epiteliales bronquiales humanas (CEBH) diferenciadas. Las CEBH diferenciadas se trataron con 2,5% EHT o vehículo durante 72 horas y posteriormente se obtuvo el ARN total para PCR a tiempo real (A) o lisados celulares para tecnología de microchips de proteínas Zeptosens (B). El EHT disminuyó significativamente la expresión de (A) transcritos de ARNm y (B) proteínas de los marcadores epiteliales E-cadherina, Zonula-occludens (ZO-1), citoqueratina 5 (KRT5) y citoqueratina 18 (KRT18). Los datos se expresan como el ratio a GAPDH para los niveles de ARNm y a β -actina para los niveles de proteína, normalizados al grupo control. (C) Medida de resistencia eléctrica transepitelial (TEER) en CEBH diferenciadas. La TEER fue medida tras 72 horas de exposición a EHT (0,5-5%). Los resultados se expresan como la media (error estándar) de n=4 experimentos independientes por condición (un paciente no fumador). Los resultados fueron analizados por el test de la t de Student (A-B). *p<0,05 respecto al control.

Además, las CEBH diferenciadas expuestas a EHT adoptaron una morfología aplanada y alargada característica de un fenotipo tipo miofibroblasto.

Los marcadores de TEM inducidos por el EHT se mantuvieron hasta casi 7 días tras haber lavado el EHT, lo que refleja la irreversibilidad del proceso de TEM (Figura 44).

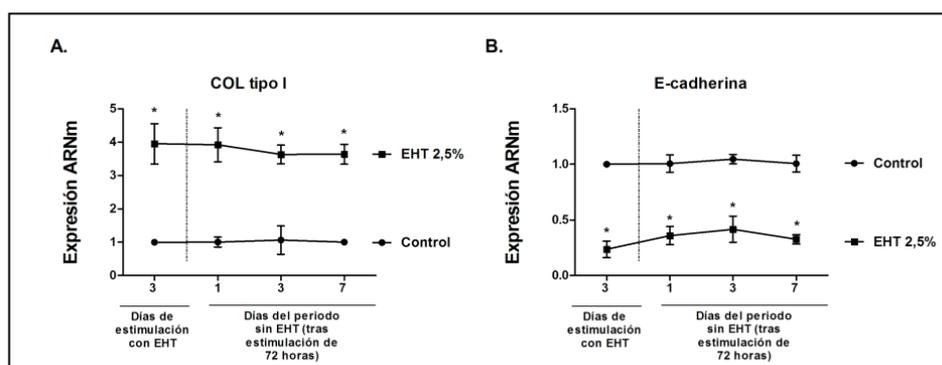


Figura 44. La transición epitelial-mesenquimal (TEM) inducida por extracto de humo de tabaco (EHT) en células epiteliales bronquiales humanas (CEBH) diferenciadas se mantiene tras quitar el EHT del cultivo. Las CEBH diferenciadas en cultivo ALI se estimularon con 2,5% EHT durante 3 días. A partir de ese momento, se quitó el medio de cultivo y se lavaron las células con medio de cultivo. Se midieron los marcadores E-cadherina (epitelial) y COL tipo I (mesenquimal) al final del periodo de estimulación (en el día 3) y en los días 1, 3 y 7 tras el lavado con medio de cultivo. Los cambios inducidos por EHT en los marcadores se mantuvieron durante al menos 7 días tras el lavado con EHT. Los resultados se expresan como la media (error estándar) de n=4 experimentos por condición (un paciente no fumador). Los resultados fueron analizados por ANOVA de una vía seguido del test post hoc de Bonferroni * $p < 0,05$ respecto al control.

4.1.3. LA TEM INDUCIDA POR EHT ESTÁ PARCIALMENTE MEDIADA POR UN AUMENTO DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO Y UNA DISMINUCIÓN DE AMPc.

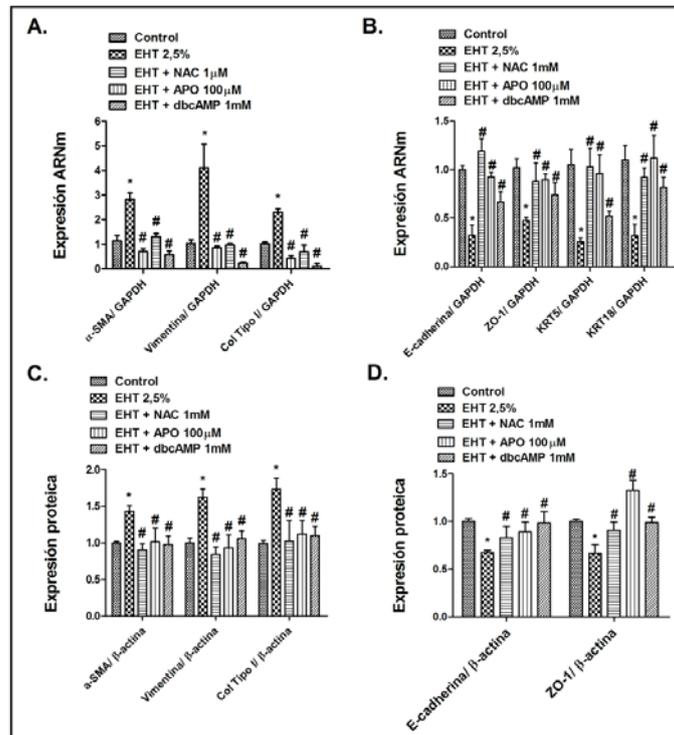
A continuación se estudiaron los posibles mediadores implicados en la TEM inducida por EHT, utilizando diversas herramientas farmacológicas. Cabe destacar que, teniendo en cuenta que las herramientas farmacológicas utilizadas para analizar los mecanismos implicados en la TEM inducida por EHT podrían modificar la expresión de los marcadores mesenquimales o epiteliales *per se*, se comprobó el efecto de los fármacos en los marcadores de TEM en ausencia de estímulo de EHT. Para ello, se midió la expresión de ARNm y proteína de los marcadores tras la exposición a fármaco durante 72 horas. Los resultados no mostraron diferencias entre los efectos de NAC, dbcAMP, APO, SIS3, PD98059, el anticuerpo anti-TGF- β 1 o el isotipo IgG, a las concentraciones utilizadas, comparado con el grupo control.

La pre-incubación de CEBH diferenciadas con los antioxidantes NAC y APO inhibió el aumento en la expresión de ARNm y proteína de α -SMA, vimentina y COL tipo I, así como la disminución de los marcadores epiteliales E-cadherina, ZO-1, KRT5 y KRT18 inducida por EHT (Figura 45).

Además, tal y como se observa con los antioxidantes, el análogo del AMPc dbcAMP inhibió significativamente el aumento en la expresión de ARNm y proteína de los marcadores

Resultados

mesenquimales α -SMA, vimentina y COL tipo I, así como la disminución de los marcadores epiteliales E-cadherina, ZO-1, KRT5 y KRT18 tras exposición con EHT (Figura 45).



El análisis mediante microscopía de contraste de fases de la superficie del cultivo de CEBH diferenciadas y el análisis de secciones del epitelio estratificado de CEBH, mediante tinción con hematoxilina eosina, mostró un cambio morfológico de las células, desde una morfología celular tipo cuboidal (característica de células epiteliales) a una morfología alargada y con forma de huso, con contactos inter-celulares reducidos debidos a la exposición a EHT (Figura 46).

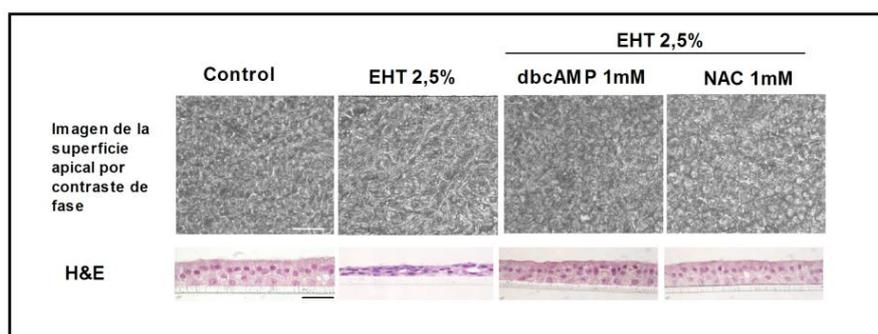


Figura 46. La transición epitelial mesenquimal (TEM) inducida por extracto de humo de tabaco (EHT) está parcialmente mediada por especies reactivas de oxígeno intracelulares e inhibida por monofosfato de adenosina cíclico (AMPC). Los cambios morfológicos en CEBH diferenciadas tras 72 horas de exposición a EHT 2,5% mostraron una morfología tipo mesenquimal, con contactos inter-celulares disminuidos, observada mediante microscopía de contraste de fase (de la superficie apical) y mediante histología de secciones de epitelio estratificado, con tinción hematoxilina eosina (H&E). Los cambios morfológicos fueron inhibidos por NAC y dbcAMP. Se muestran imágenes representativas (escala 40 μ m).

Además, se observó que el EHT 2,5% disminuyó de manera significativa el contenido intracelular de AMPc tras 72 horas. Esta disminución del AMPc inducida por EHT fue inhibida significativamente por los antioxidantes NAC y APO y el control positivo dbcAMP (Figura 47A), sugiriendo un papel para las especies reactivas de oxígeno en la disminución del AMPc.

En este contexto, el EHT 2,5% aumentó las especies reactivas de oxígeno intracelulares tras 30 minutos de exposición (Figura 47B, C) y este aumento se mantuvo durante el periodo de 72 horas.

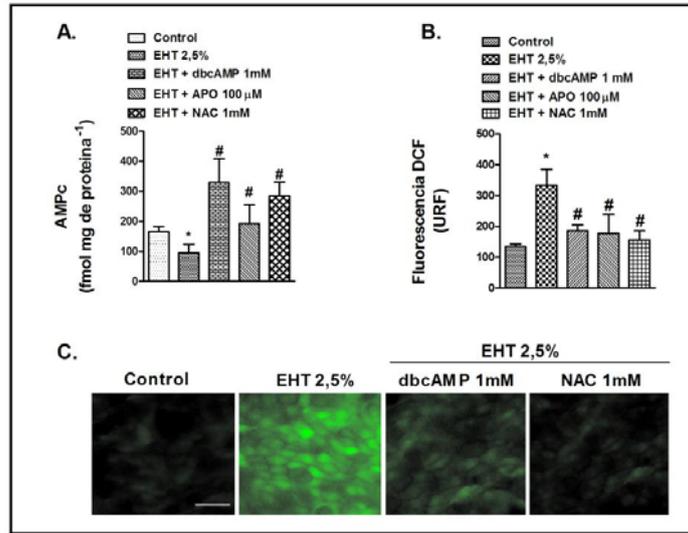


Figura 47. El extracto de humo de tabaco (EHT) reduce los niveles intracelulares de AMPc y aumenta las especies reactivas de oxígeno en CEBH diferenciadas. Las CEBH diferenciadas se incubaron con los antioxidantes N-acetil-L-cisteína (NAC, 1mM) o apocinina (APO, 100μM) o con el análogo del AMPc (dbcAMP, 1mM) 30 minutos antes de la estimulación con EHT (2,5%) durante 72 horas (A) o 30 minutos (B, C). (A) La pérdida de AMPc intracelular inducida por EHT fue inhibida por NAC, APO y el control positivo dbcAMP. (B) Las especies reactivas de oxígeno fueron determinadas mediante intensidad de fluorescencia de DCF tras estimulación con EHT en presencia o ausencia de NAC, APO o dbcAMP. (C) Imágenes representativas de fluorescencia DCF positiva en CEBH diferenciadas (escala 20 μm). Los resultados se expresan como la media (error estándar) de n=4 experimentos por condición (cuatro pacientes no fumadores). Los resultados fueron analizados por ANOVA de dos vías seguido de Test post hoc de Bonferroni. *p<0,05 respecto al control; #p<0,05 respecto al EHT. URF, unidades relativas de fluorescencia.

Este aumento observado de las especies reactivas de oxígeno fue acompañado por un aumento en la expresión de ARNm y proteína de NOX4, unidad perteneciente al complejo NADPH oxidasa, tras 72 horas de exposición (Figura 48). Tanto la producción de especies reactivas de oxígeno como la expresión de NOX4 inducidas por EHT fueron inhibidas por dbcAMP, NAC y APO en CEBH diferenciadas.

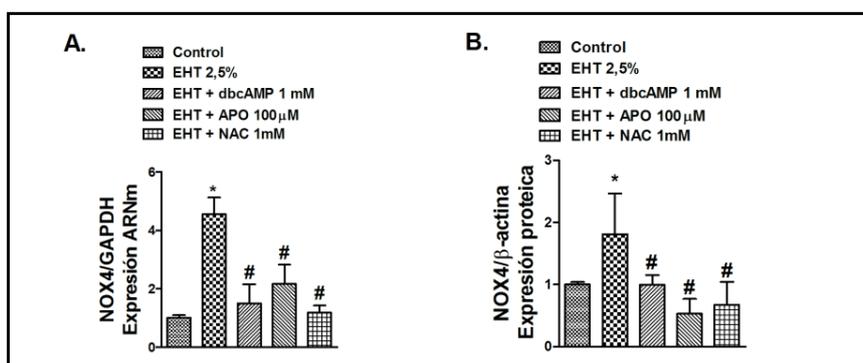


Figura 48. El extracto de humo de tabaco (EHT) aumenta la expresión de NOX4 en CEBH diferenciadas. Las CEBH diferenciadas se incubaron con los antioxidantes N-acetil-L-cisteína (NAC, 1mM) o apocinina (APO, 100μM) o con el análogo del AMPc (dbcAMP, 1mM) 30 minutos antes de la estimulación con EHT (2,5%) durante 72 horas. El EHT indujo la expresión de ARNm (A) y proteína (B) de NOX4, que fueron significativamente inhibidos por dbcAMP, APO y NAC. Los datos se expresan como el ratio a GAPDH para los niveles de ARNm y a β-actina para los niveles de proteína, normalizados al grupo control. Los resultados se expresan como la media (error estándar) de n=4 experimentos por condición (cuatro pacientes no fumadores). Los resultados fueron analizados por ANOVA de dos vías seguido de Test de Bonferroni. *p<0,05 respecto al control; #p<0,05 respecto al EHT.

4.1.4. TGF-β1, ERK1/2 y SMAD3 MEDIAN LA TEM INDUCIDA POR EHT EN CEBH.

La estimulación con EHT 2,5% durante 72 horas incrementó significativamente la liberación de la forma activa de TGF-β1 (Figura 49). La pre-incubación de CEBH diferenciadas con dbcAMP, NAC o APO suprimió completamente esta liberación (Figura 49A), sugiriendo un papel de las especies reactivas de oxígeno y de AMPc como mediadores en la liberación de TGF-β1 inducida por EHT.

En otros experimentos, la estimulación con EHT 2,5% aumentó la fosforilación de ERK1/2 y Smad3, y este aumento fue significativamente inhibido por el anticuerpo anti-TGF-β1 (mAb-TGF-β1) (Figura 49B,C), lo que sugiere un rol autocrino de TGF-β1. En paralelo, la pre-incubación de CEBH diferenciadas con dbcAMP, NAC o APO también inhibió la fosforilación de ERK1/2 y Smad3 inducida por EHT.

Resultados

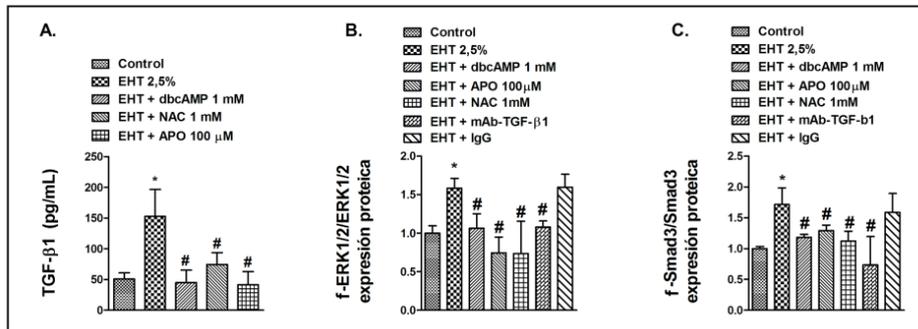


Figura 49. El extracto de humo de tabaco aumenta la secreción de TGF-β1 y la fosforilación de ERK1/2 y Smad3 en CEBH diferenciadas. Las CEBH diferenciadas se incubaron con los antioxidantes N-acetil-L-cisteína (NAC, 1 mM) o apocinina (APO, 100 μM) o con el análogo del AMPc (dbcAMP, 1mM) durante 30 minutos antes de la estimulación con EHT (2,5%) durante 72 horas. En los paneles B y C, un anticuerpo anti-TGF-β1 (mAb-TGF-β1; 4 μg/mL) y su control negativo IgG no inmune fueron añadidos 30 minutos antes de la estimulación con EHT 2,5% durante 72 horas. A partir de los sobrenadantes de los cultivos celulares y de la extracción de proteína, se cuantificó (A) la liberación de TGF-β1, (B) la fosforilación de ERK1/2 y (C) la fosforilación de Smad3. (B, C) Los niveles proteicos de fosfo-Smad3 y fosfo-ERK1/2 fueron expresados como el ratio al total de Smad3 y ERK1/2 respectivamente y normalizados al grupo control. Los resultados se expresan como la media (error estándar) de n=4 experimentos por condición (cuatro pacientes no fumadores). Los resultados fueron analizados con ANOVA de dos vías seguido de Test post hoc de Bonferroni. *p<0,05 respecto al control; #p<0,05 respecto al EHT.

Para analizar el efecto autocrino de TGF-β1 y sus rutas de señalización, ERK1/2 y Smad3, en el proceso de TEM inducido por EHT, se pre-incubaron las células con mAb-TGF-β1, con PD98058 (antagonista de ERK1/2) o con SIS3 (inhibidor de Smad3). Todos ellos suprimieron, casi en su totalidad, el incremento inducido por EHT de los marcadores mesenquimales α-SMA, vimentina y colágeno tipo I (Figura 50A), así como la disminución de los marcadores epiteliales E-cadherina y ZO-1 (Figura 50B).

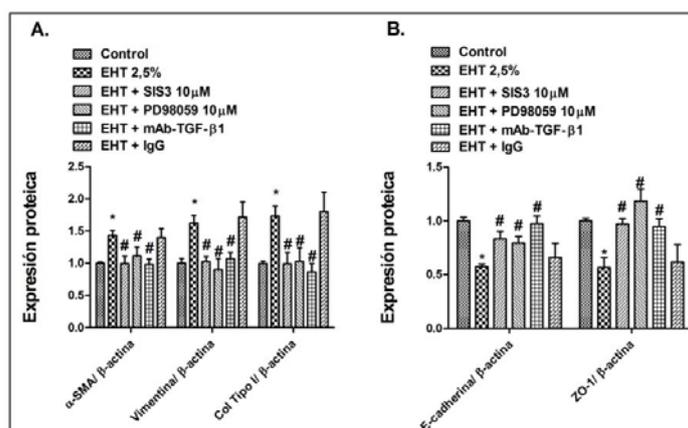


Figura 50. La transición epitelial mesenquimal (TEM) inducida por extracto de humo de tabaco (EHT) está parcialmente mediada por un efecto autocrino de TGF- β 1 y su ruta de señalización, a través de fosfo-ERK1/2 y fosfo-Smad3. Las CEBH diferenciadas se incubaron con el inhibidor de Smad3 SIS3 (10 μ M), el inhibidor de ERK1/2 PD98059 (10 μ M), el anticuerpo anti-TGF- β 1 (mAb-TGF- β 1; 4 μ g/mL) o su control negativo no inmune IgG durante 30 minutos antes de la estimulación con EHT (2,5%) durante 72 horas. Tras los periodos de incubación, las CEBH diferenciadas fueron lisadas y se realizaron microchips de proteína Zeptosen. (A) El aumento de los marcadores mesenquimales α -SMA, vimentina y COL tipo I inducido por EHT fue inhibido por SIS3, PD98059 y mAb-TGF- β 1. (B) La disminución de los marcadores epiteliales E-cadherina y ZO-1 inducida por EHT fue inhibida por SIS3, PD98059 y mAb-TGF- β 1. (A, B) Los resultados se expresan como el ratio a β -actina para los niveles de proteína y normalizados al grupo control. Los resultados se expresan como medias de n=4 experimentos por condición (cuatro pacientes no fumadores). Los datos fueron analizados por un ANOVA de dos vías seguido de Test post hoc de Bonferroni. *p<0,05 respecto al control, #p<0,05 respecto al EHT.

4.2 ESTUDIO II. APROXIMACIÓN FARMACOLÓGICA A LA TEM ASOCIADA AL REMODELADO BRONQUIOLAR EN LA EPOC UTILIZANDO EL iPDE4 RNO.

Este segundo estudio fue diseñado para explorar los efectos del iPDE4 RNO en la TEM bronquiolar inducida por EHT en CEBH diferenciadas obtenidas de bronquiolos. Además, también se analizaron los efectos del RNO en marcadores mesenquimales y epiteliales de CEBH primarias de fumadores y pacientes EPOC.

Tabla 20. Características clínicas de los pacientes. Los datos se representan como mediana [rango intercuartil].

	No fumadores (n=10)	Fumadores (n=11)	EPOC (n=11)
Género (Mujeres/Hombres)	4/6	3/8	4/7
Edad (años)	65 [58-77]	66 [57-75]	65 [57-73]
Consumo de tabaco, paquete-año	0	41 [36-48]	36 [31-42]
FEV ₁ , % predicho	101 [98-105]	93 [90-98]	69 [52-72]
FVC, % predicho	103 [95-106]	96 [91-103]	91 [88-101]
FEV ₁ /FVC %	96 [92-102]	86 [78-92]	61 [51-66]
PaO ₂ , mmHg	92 [86-94]	86 [84-93]	81 [77-89]
PaCO ₂ , mmHg	38 [37-41]	37 [36-42]	41 [39-43]

VEF₁: Volumen espiratorio forzado en el primer segundo; CVF: Capacidad vital forzada; Paquete-año: 1 año fumando 20 cigarros/día; PaO₂: Presión de oxígeno en sangre arterial; PaCO₂: Presión de dióxido de carbono en sangre arterial.

4.2.1 RNO INHIBE LA TEM INDUCIDA POR EHT EN CEBH.

Las CEBH diferenciadas fueron obtenidas de células epiteliales bronquiales de pacientes no fumadores y se cultivaron en ALI. Tal y como se ha descrito en los resultados del primer estudio [186], el EHT 2,5% aumentó la expresión génica y proteica de los marcadores mesenquimales α -SMA, vimentina y COL tipo I (Figura 51A y C) y disminuyó la expresión de los marcadores epiteliales E-cadherina, ZO-1 y KRT5 (Figura 51B y D).

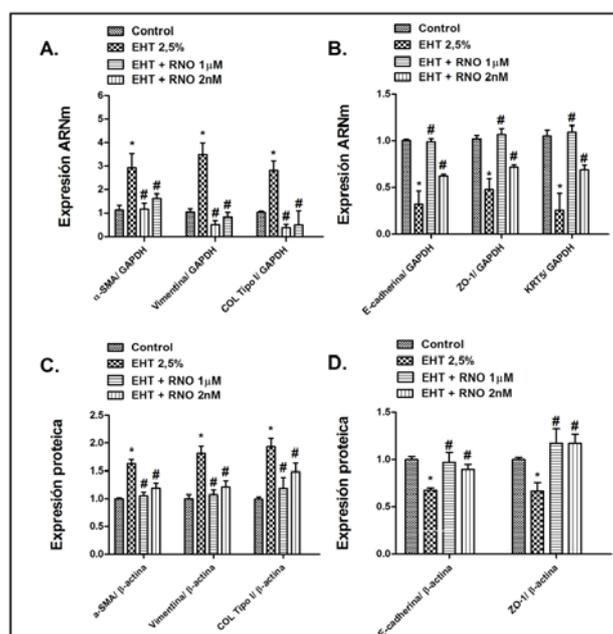


Figura 51. N-óxido roflumilast (RNO) inhibe la transición epitelial mesenquimal inducida por extracto de humo de tabaco (EHT) en células epiteliales bronquiales humanas (CEBH) diferenciadas. Las CEBH diferenciadas se incubaron con RNO durante 30 minutos previamente a la incubación con EHT (2,5%) durante 72 horas. Se obtuvo (A, B) ARN total y (C, D) proteínas para realizar PCR a tiempo real y tecnología de microchips de proteínas Zeptosens respectivamente. El EHT indujo un aumento en la expresión de (A) transcritos de ARNm y (C) expresión proteica de los marcadores mesenquimales α -actina de músculo liso (α -SMA), vimentina y colágeno tipo I (COL tipo I) que fue inhibido por RNO. La disminución inducida por EHT de (B) los transcritos de ARNm y (D) la expresión proteica de los marcadores epiteliales E-cadherina, ZO-1 y KRT5 fue inhibida por RNO. Los datos se expresan como el ratio a GAPDH para los niveles de ARNm y a β -actina para los niveles de proteína, normalizados al grupo control. Los resultados se expresan como la media (error estándar) de n= 3-4 experimentos por condición (dos a cuatro pacientes no fumadores). Los resultados fueron analizados por ANOVA de dos vías seguido del test post hoc de Bonferroni. *p<0,05 respecto al control; #p<0,05 respecto al EHT.

Además, las CEBH diferenciadas expuestas a EHT adoptaron una morfología plana y elongada característica de un fenotipo tipo miofibroblasto, tal y como se observa en las fotografías de la siguiente figura obtenidas mediante microscopía de contraste de fase (Figura 52).

Resultados

La incubación de las células con RNO 1 μ M (que corresponde a la inhibición completa y selectiva de la PDE4) y RNO 2nM (que corresponde a aproximadamente la mitad de la inhibición máxima de PDE4 [178] y a la concentración plasmática libre en humanos tras la administración clínica de roflumilast [179]) prácticamente suprimió completamente el aumento en los marcadores mesenquimales y la pérdida de los marcadores epiteliales inducida por EHT (Figura 51), conservando también el fenotipo celular epitelial (Figura 52). Cabe destacar que, teniendo en cuenta que el fármaco en ensayo podría modificar la expresión de los marcadores mesenquimales o epiteliales *per se*, también se comprobó el efecto del RNO en los marcadores de TEM en ausencia de estímulo de EHT. Para ello, se midió la expresión de ARNm y proteína de los marcadores tras la exposición a RNO durante 72 horas. Los resultados no mostraron diferencias, a las concentraciones utilizadas, comparado al grupo control.

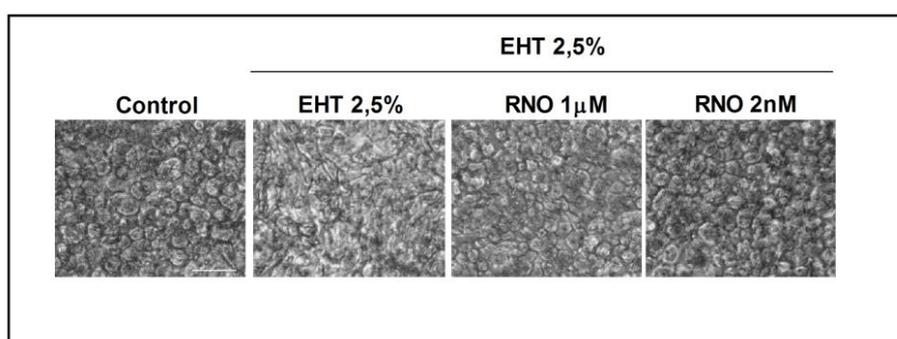


Figura 52. N-óxido roflumilast (RNO) inhibe la transición epitelial mesenquimal (TEM) inducida por extracto de humo de tabaco (EHT) en células epiteliales bronquiales humanas (CEBH) diferenciadas. Los cambios morfológicos en CEBH diferenciadas tras 72 horas de exposición a EHT 2,5% mostraron una morfología tipo mesenquimal, con contactos intercelulares disminuidos, observados mediante microscopía visible de contraste de fase. Los cambios morfológicos fueron inhibidos por RNO. Se muestran imágenes representativas (escala 10 μ m).

4.2.2 RNO INHIBE LAS RUTAS DE SEÑALIZACIÓN INVOLUCRADAS EN LA TEM INDUCIDA POR EHT EN CEBH.

Los resultados del primer estudio de esta tesis describen niveles disminuidos de AMPc y niveles aumentados de estrés oxidativo en tejido pulmonar de pacientes EPOC, así como la participación de estos mediadores en el proceso de TEM inducido por el humo de tabaco [186].

Los resultados de los experimentos de este estudio, mostraron una disminución del contenido intracelular de AMPc inducida por EHT tras 72 horas de exposición. La pre-incubación con RNO 1 μ M, 30 minutos antes de la adición del EHT, aumentó los niveles

intracelulares de AMPc a niveles superiores al grupo control y, en el caso de RNO 2 nM, a niveles similares al grupo control (Figura 53A). En otros experimentos el EHT 2,5% aumentó la expresión de la subunidad de la NAPH oxidasa, NOX4, tras 72 horas de estimulación (Figuras 53B y C). En paralelo, el EHT 2,5% aumentó los niveles intracelulares de especies reactivas de oxígeno tras 30 minutos de exposición y estos niveles se mantuvieron durante las 72 horas de estimulación con EHT (Figura 53D y E). RNO abolió tanto NOX4 como los niveles intracelulares de especies reactivas de oxígeno inducidos por EHT.

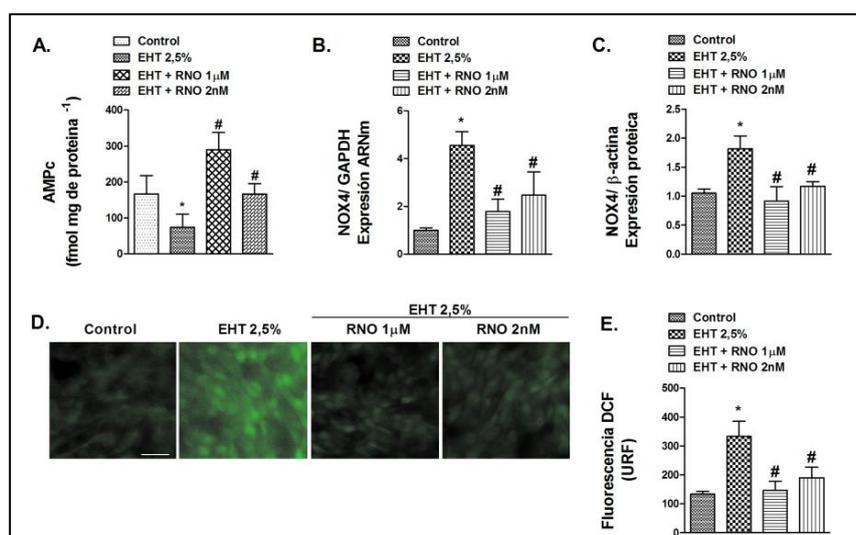


Figura 53. N-óxido roflumilast (RNO) reduce la disminución de los niveles de adenosín monofosfato cíclico (AMPc), el aumento de las especies reactivas de oxígeno intracelulares y la expresión de NOX4 inducidos por EHT en CEBH diferenciadas. Las CEBH diferenciadas se incubaron con RNO durante 30 minutos antes de la estimulación con EHT (2,5%) durante (A, B, C) 72 horas o (D, E) 30 minutos. (A) La pérdida de AMPc intracelular inducida por EHT fue inhibida por RNO. (B, C) El aumento en la expresión de ARNm y proteína de NOX4 inducido por EHT fue significativamente inhibido por RNO. (D, E) La presencia de especies reactivas de oxígeno intracelulares fue determinada mediante intensidad de fluorescencia de DCF tras la estimulación con EHT en presencia o ausencia de RNO. (D) Imágenes representativas de fluorescencia DCF positiva en CEBH diferenciadas (escala 10 μ m). (B, C) Los datos se expresan como el ratio a GAPDH para los niveles de ARNm y a β -actina para los niveles de proteína, normalizados al grupo control. Los resultados se expresan como la media (error estándar) de n=3 experimentos por condición (dos a tres pacientes no fumadores). Los resultados fueron analizados por ANOVA de dos vías seguido de Test de Bonferroni. *p<0,05 respecto al control; #p<0,05 respecto al EHT. URF, unidades relativas de fluorescencia.

Resultados

El humo de tabaco puede aumentar la liberación de TGF- β 1 y promover la activación de las cascadas de fosforilación de ERK1/2 y Smad3, que juegan un papel clave en el proceso de TEM inducido por EHT, tal y como se ha descrito en los resultados del primer estudio [186].

Los resultados mostrados a continuación reflejan la capacidad de RNO de reducir la liberación de TGF- β 1 y la fosforilación de ERK1/2 y Smad3 inducidas por EHT (Figura 54A-C).

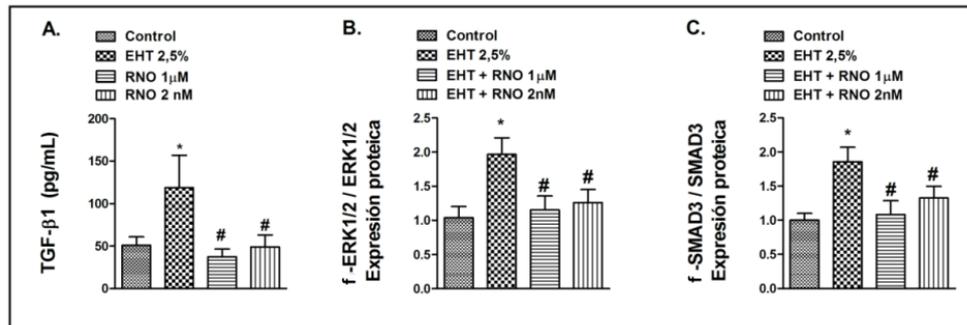


Figura 54. N-óxido roflumilast inhibe la secreción de TGF- β 1 y la fosforilación de ERK1/2 y Smad3 inducidas por extracto de humo de tabaco (EHT) en células epiteliales bronquiales humanas (CEBH) diferenciadas. Las CEBH diferenciadas se incubaron con RNO durante 30 minutos antes de la estimulación con EHT (2,5%) durante 72 horas. A partir de los sobrenadantes de los cultivos celulares y de la extracción de proteína, se cuantificó (A) la liberación de TGF- β 1, (B) la fosforilación de ERK1/2 y (C) la fosforilación de Smad3. (B, C) Los niveles proteicos de fosfo-Smad3 y fosfo-ERK1/2 fueron expresados como el ratio al total de Smad3 y ERK1/2 respectivamente y normalizados al grupo control. Los resultados se expresan como la media (error estándar) de n=3 experimentos por condición (dos a cuatro pacientes no fumadores). Los resultados fueron analizados con ANOVA de dos vías seguido de Test post hoc de Bonferroni. *p<0,05 respecto al control; #p<0,05 respecto al EHT.

4.2.3 LAS CÉLULAS EPITELIALES BRONQUIALES PRIMARIAS AISLADAS DE FUMADORES Y PACIENTES EPOC MUESTRAN UN AUMENTO DE LOS MARCADORES MESENQUIMALES QUE CORRELACIONA CON LA FUNCIÓN PULMONAR.

Las células epiteliales bronquiales humanas fueron obtenidas de bronquiolos (diámetro interno inferior a 2 mm) de pulmones de no fumadores (n=10), fumadores (n=11) y pacientes EPOC (n=11), sometidos a operación quirúrgica por cáncer de pulmón. Los datos clínicos de los pacientes se muestran en la tabla 20.

Las CEBH primarias de fumadores y pacientes EPOC mostraron un aumento de los marcadores mesenquimales α SMA, vimentina y COL tipo I (Figura 55A-C) así como de NOX4 (Figura 55D), mientras que los marcadores epiteliales E-cadherina y ZO-1 estaban disminuidos (Figura 55E-F).

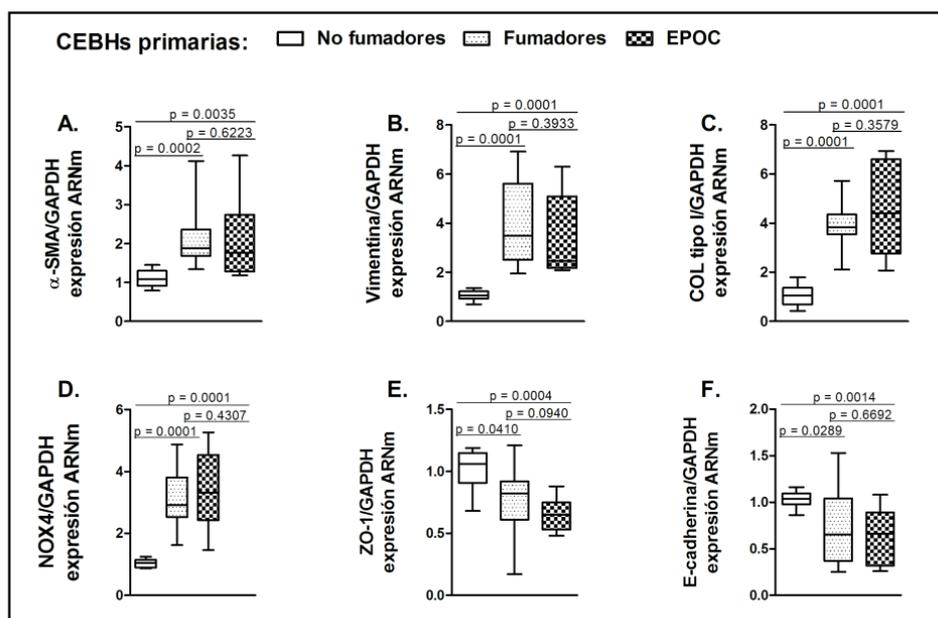


Figura 55. Expresión de marcadores epiteliales y mesenquimales en células epiteliales bronquiales humanas (CEBH) primarias de no fumadores, fumadores y pacientes EPOC. Las CEBH primarias se aislaron de bronquiolos de no fumadores (n=10), fumadores (n=11) y pacientes con EPOC (n=11) y se obtuvo ARN total. Se determinó la expresión de ARNm mediante PCR a tiempo real con las sondas y cebadores apropiados. En la figura se muestra la expresión basal de los transcritos de ARNm de los marcadores mesenquimales (A) α -actina de músculo liso (α -SMA), (B) vimentina, (C) colágeno tipo I (Col tipo I) o (D) NOX4, así como la expresión basal de los marcadores epiteliales (E) ZO-1 o (F) E-cadherina. Los datos se expresan como el ratio a GAPDH para los niveles de ARNm normalizados al grupo de no fumadores. Los resultados se presentan como diagramas de caja representando la mediana, el rango intercuartil y los valores mínimos y máximos. Los valores p exactos se obtuvieron con el test de Kruskal-Wallis y el test post hoc de Dunn.

Dado que los marcadores de TEM estaban aumentados en CEBH primarias de fumadores y pacientes EPOC, el siguiente paso que se planteó consistió en estudiar su posible correlación con los parámetros de función pulmonar de los pacientes. En relación a esto, se vio que la expresión proteica de α -SMA, vimentina y COL tipo I en CEBH primarias estaba inversamente correlacionada con %VEF₁, (Figuras 56A-C; coeficiente de correlación de Spearman $\rho=-0,60$; $\rho=-0,54$ y $\rho=-0,72$ respectivamente, y $p=0,010$; $p=0,020$ y $p=0,002$ respectivamente). Además, se vio que la expresión proteica de E-cadherina estaba directamente correlacionada con %VEF₁, (Figura 56E; coeficiente de correlación de Spearman $\rho=0,62$ y $p=0,007$). La expresión de ZO-1 y la expresión de NOX4 no mostraron correlación con la función pulmonar. Tanto fosfo-ERK1/2 como fosfo-Smad3 también estaban inversamente

Resultados

correlacionados con %VEF₁ (Figuras 56G-H; coeficiente de correlación de Spearman $\rho=-0,55$ y $\rho=-0,50$ respectivamente, y $p=0,020$ y $p=0,048$ respectivamente).

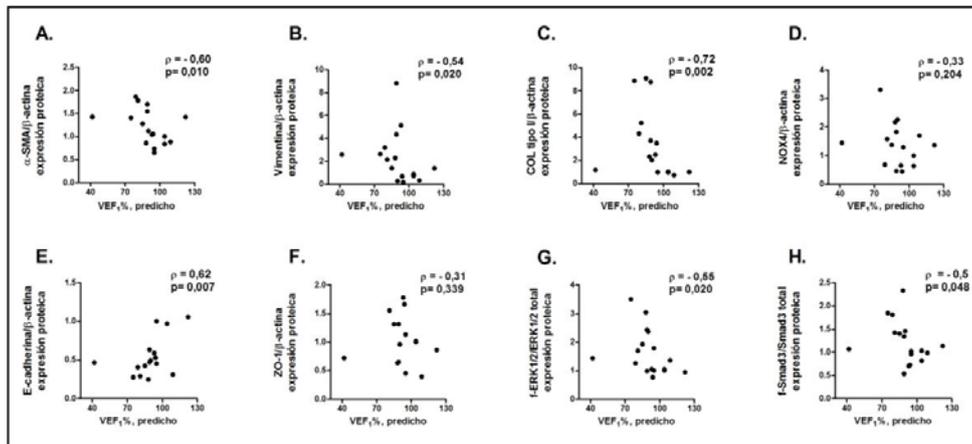


Figura 56. La expresión de los marcadores de la transición epitelial mesenquimal está correlacionada con la función pulmonar. Las CEBH primarias se aislaron de bronquiolos de fumadores ($n=9$) y pacientes con EPOC ($n=9$) y se lisaron para extraer proteínas. Se determinó la expresión proteica de los marcadores mesenquimales (A) α -SMA, (B) vimentina, (C) COL tipo I y (D) NOX4; marcadores epiteliales (E) E-cadherina, (F) ZO-1; mediadores de señalización intracelular (G) fosfo-ERK1/2 y (H) fosfo-Smad3. Los datos se expresan como el ratio a β -actina para los niveles de proteína. Los niveles proteicos de fosfo-Smad3 y fosfo-ERK1/2 fueron expresados como el ratio al total de Smad3 y ERK1/2 respectivamente. Los datos fueron correlacionados con el parámetro de función pulmonar %VEF₁. ρ = coeficiente de correlación de Spearman. Valores $p<0,05$ mostraron correlación significativa.

4.2.4 EL TRATAMIENTO *IN VITRO* DE CÉLULAS EPITELIALES BRONQUIALES PRIMARIAS DE FUMADORES Y PACIENTES EPOC CON RNO ATENÚA LOS MARCADORES DE TEM.

Los explantes de bronquiolo humano, de fumadores y pacientes EPOC, fueron depositados en pocillos de placas de cultivo orientados de forma que la capa epitelial estuviese en contacto con la superficie del pocillo. Las CEBH crecieron alrededor de los explantes, alcanzando una confluencia del 100% tras un periodo de aproximadamente 10 días. A partir de ese momento, se retiraron los explantes y las CEBH primarias fueron incubadas con RNO o vehículo durante 24 horas. Las células de fumadores y pacientes EPOC tratadas con RNO mostraron una reducción significativa de la expresión de ARNm de los marcadores mesenquimales α -SMA, vimentina y COL tipo I así como de NOX4 y una expresión aumentada de los marcadores epiteliales E-cadherina y ZO-1 (Figura 57A-D) que aquellas células incubadas únicamente con el vehículo.

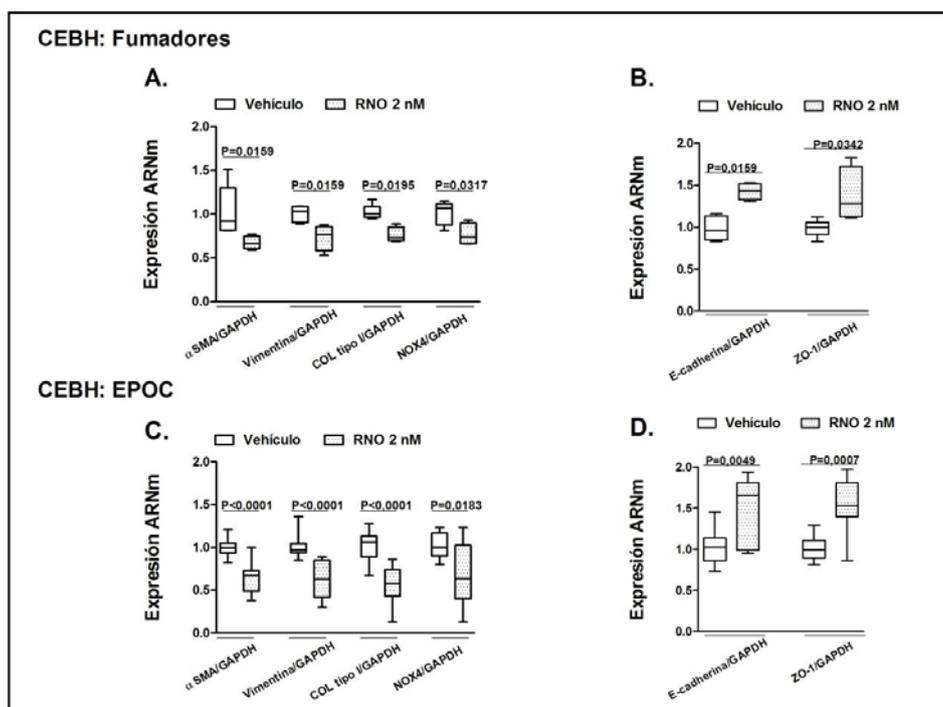


Figura 57. N-óxido roflumilast (RNO) disminuye los marcadores mesenquimales y aumenta los marcadores epiteliales en células epiteliales bronquiales humanas (CEBH) primarias aisladas de bronquiolos de fumadores y pacientes EPOC. Los explantes de bronquiolo humano de fumadores (n=4) y pacientes EPOC (n=6) fueron depositados en pocillos de placas de cultivo orientados de forma que la capa epitelial estuviese en contacto con la superficie del pocillo y tras un periodo de aproximadamente 10 días se observaron CEBH alrededor de los explantes a una confluencia del 100%. A partir de ese momento, se retiraron los explantes y las CEBH primarias de fumadores (A, B) y pacientes EPOC (C, D) fueron incubadas con RNO o vehículo durante 24 horas. Se obtuvo el ARN total y se cuantificó la expresión de ARNm mediante PCR a tiempo real con las sondas y cebadores apropiados. En la figura se muestra la expresión basal de los transcritos de ARNm de los marcadores mesenquimales α -actina de músculo liso (α -SMA), vimentina, colágeno tipo I (Col tipo I) o NOX4, así como la expresión basal de los marcadores epiteliales E-cadherina y ZO-1. Los datos se expresan como el ratio a GAPDH para los niveles de ARNm normalizados al grupo con vehículo. Los resultados se presentan como diagramas de caja representando la mediana, el rango intercuartil y los valores mínimos y máximos. Los valores p exactos se obtuvieron con el test de U de Mann-Whitney.

5. DISCUSIÓN

5.1 ESTUDIO I. LA TEM ESTÁ AUMENTADA EN PACIENTES CON EPOC E INDUCIDA POR EL EHT.

A continuación se describen los principales resultados obtenidos en el primer estudio de esta tesis doctoral, que hacen referencia a los tres objetivos planteados:

- (1) Las CEBH primarias de bronquiolos de fumadores y pacientes con EPOC muestran un aumento del perfil de expresión típico de la TEM.
- (2) La estimulación *in vitro* con EHT de CEBH diferenciadas desencadena TEM.
- (3) El EHT desencadena TEM en CEBH a través de: la activación de especies reactivas de oxígeno intracelulares, la liberación de TGF- β 1, la fosforilación de ERK1/2 y Smad3 así como la disminución de AMPc.

Estos novedosos resultados sugieren que la TEM está presente en los bronquiolos de fumadores y pacientes con EPOC, pudiendo potencialmente contribuir al engrosamiento de la pared bronquiolar causado por fibrosis. Además, apuntan a la existencia de una relación entre el humo de tabaco y la TEM, ya que esta transición podría inducirse directamente por el humo de tabaco.

La TEM ha sido implicada en diversos trastornos fibróticos de las vías aéreas [164-166], tal y como se ha descrito anteriormente. Sin embargo, la hipótesis de que los fibroblastos bronquiales puedan originarse directamente de CEBH como resultado del proceso de TEM aún no había sido suficientemente analizada. En relación a esta cuestión, recientemente se han descrito evidencias de TEM en biopsias *in vivo* y en cultivos primarios *ex vivo* de CEBH de individuos sometidos a trasplante pulmonar [168]. Adicionalmente, Hackett y colaboradores observaron TEM en CEBH diferenciadas de pacientes asmáticos en respuesta a TGF- β 1 [143]. Sin embargo, existía un conocimiento limitado en referencia a un potencial desarrollo de TEM en la EPOC y su posible contribución al remodelado bronquiolar.

En relación a esto, Sohal y colaboradores han observado recientemente la existencia de una potencial TEM en biopsias de bronquios principales de fumadores y pacientes EPOC [171, 187]. Sin embargo, los resultados de estos estudios son limitados ya que los marcadores mesenquimales analizados (MMP-9, vimentina y S100A4) son también expresados por otros tipos celulares, como leucocitos y células endoteliales [188, 189]. Además, Sohal y colaboradores estudiaron el proceso de TEM en los bronquios principales y, debe tenerse en cuenta que el remodelado bronquial en la EPOC, específicamente la fibrosis peribronquial, está principalmente localizada en los bronquiolos (< 2mm de diámetro). Considerando que éstos difieren de los bronquios principales tanto en características anatómicas como en fisiopatológicas [121], estos resultados previos requerían su corroboración en los bronquiolos.

La TEM es un proceso de transición de un fenotipo epitelial a un fenotipo mesenquimal y, por tanto, los principales cambios que caracterizan esta transición son: la separación de las células epiteliales, por pérdida de adhesiones intercelulares, y el cambio a fenotipo miofibroblasto, caracterizado por su capacidad de migración y producción de matriz extracelular [135]. Por ello, las características distintivas de la TEM incluyen: expresión disminuida de proteínas responsables de la adhesión intercelular (E-cadherina y ZO-1) y de marcadores epiteliales (citoqueratinas), sobreexpresión de proteasas que degradan la membrana basal epitelial, activación de factores transcripcionales característicos del programa de TEM (como β -catenina), expresión de novo de marcadores mesenquimales (vimentina y α -SMA) y producción de componentes de la matriz (como COL tipo I) [135].

En relación al primer objetivo, en el presente trabajo se ha analizado la expresión de marcadores mesenquimales ampliamente referenciados en estudios de TEM, como las proteínas del citoesqueleto α -SMA y vimentina, así como la proteína de matriz extracelular COL tipo I [134]. Cabe destacar que tanto α -SMA como COL tipo I son marcadores específicos para el fenotipo fibroblasto/miofibroblasto [134, 190]. Además, puesto que la TEM se caracteriza por la pérdida de la morfología tipo cuboidal característica de células epiteliales y por consiguiente, por una marcada reducción de la expresión de los marcadores epiteliales E-cadherina, ZO-1 y citoqueratín, también se ha analizado la pérdida de expresión de estos marcadores epiteliales como indicador del proceso de TEM.

Respecto a la presencia de marcadores de TEM, cabe destacar que las células de fumadores y pacientes con EPOC con un marcaje positivo para KRT5 también fueron positivas para los marcadores mesenquimales COL tipo I y vimentina (Figura 38). La presencia de ambos marcadores podría explicarse teniendo en cuenta que la coexpresión de algunos marcadores epiteliales y mesenquimales en células individuales ha sido descrita previamente durante la transición [140].

En base a la literatura disponible, este trabajo es el primero en mostrar el marcador de miofibroblastos α SMA en células epiteliales basales de los bronquiolos de fumadores y pacientes con EPOC. Un trabajo reciente en un modelo de fibrosis pulmonar inducida con bleomicina en ratones α -SMA-Cre/R26R también mostró una sobre-regulación de α -SMA en células epiteliales bronquiales basales, respaldando un proceso de TEM *in vivo* en el epitelio bronquial [191]. Además, en el presente trabajo también se ha descrito la presencia de otro marcador mesenquimal, la vimentina, en células epiteliales basales de fumadores y pacientes con EPOC, tal y como se ha descrito previamente en los bronquios principales [192]. Asimismo,

se ha observado sobrerregulación de la expresión de COL tipo I en bronquiolos de fumadores y pacientes con EPOC.

En relación a la expresión de marcadores epiteliales, se ha observado una disminución de la expresión proteica de E-cadherina y ZO-1 en CEBH primarias y en el epitelio de los bronquiolos de fumadores y pacientes con EPOC. Sin embargo, la expresión del ARNm de E-cadherina y ZO-1 no estaba disminuida en el grupo de fumadores. La contradicción en estos resultados podría explicarse por una regulación a diferentes niveles de la expresión de ARNm y proteína de E-cadherina y ZO-1. De este modo, E-cadherina y ZO-1, que forman parte de las proteínas de unión entre células epiteliales, son degradadas por diferentes metaloproteinasas liberadas por el efecto de agentes oxidantes, como el humo de tabaco. De hecho, se ha observado previamente que ZO-1 es una de las formas por las que la ocludina está anclada al citoesqueleto para mantener las uniones oclusivas. En presencia de estrés oxidativo, la asociación ZO-1: ocludina y la E-cadherina están disminuidas causando una redistribución citoplasmática difusa y la degradación por metaloproteinasas [193, 194], lo que excluiría a los mecanismos transcripcionales. Otro sistema independiente está gobernado por mecanismos transcripcionales en los que el efecto de algunos factores de remodelado, como TGF- β 1, podría reducir la transcripción de ARNm de ZO-1 y E-cadherina [139]. Por tanto, las diferencias entre la expresión de ARNm y proteína de ZO-1 y E-cadherina observadas entre fumadores y pacientes con EPOC podrían ser debidas a un papel predominante de la degradación proteica en células epiteliales bronquiales de pacientes con EPOC debido a un alto nivel de expresión de metaloproteinasas en el tejido pulmonar [195]. De acuerdo con esta explicación, se han encontrado niveles basales de MMP-9 aumentados en células de pacientes con EPOC comparado con fumadores.

A pesar de lo novedoso de estos resultados, debe resaltarse la existencia de algunas limitaciones, relativas al cultivo celular primario y al tejido pulmonar analizado. La pérdida del fenotipo celular en un cultivo prolongado ha sido muy descrita y podría modificar los resultados en CEBH primarias. Sin embargo los experimentos de cultivo celular *ex vivo* fueron realizados en CEBH que crecieron alrededor de los explantes, en el momento que alcanzaron aproximadamente un 100% de confluencia formando una monocapa de células epiteliales (sin pases ni tripsinizaciones), y en células positivas para KRT5, con el fin de prevenir cambios de fenotipo, tal y como se ha descrito previamente [168]. Por otro lado, el tejido pulmonar utilizado en este estudio se obtuvo de pacientes sometidos a operación quirúrgica por cáncer de pulmón. Teniendo en cuenta que la TEM ha sido descrita y caracterizada en lesiones

Discusión

malignas del epitelio asociadas al cáncer de pulmón [196], podría argumentarse que el perfil de expresión de la TEM es debido a la extensión de la lesión tumoral. Sin embargo, las muestras del estudio se obtuvieron de la zona distal del pulmón, lo más alejadas posible del tumor y se comprobaron cuidadosamente mediante histología para excluir la presencia de tumor.

A continuación se estudió la inducción de la TEM y los posibles mediadores involucrados en la transición. Existe una hipótesis, generada a partir de modelos animales, que sugiere que el humo de tabaco es un mediador importante del remodelado de los bronquiolos por la inducción de factores de crecimiento pro-fibróticos (p.e. CTGF, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y TGF- β 1) de la pared bronquial [162]. Estos factores de crecimiento, que también han sido implicados como inductores de la TEM, podrían contribuir a la fibrosis peri-bronquilar. Apoyando esta hipótesis, diferentes estudios *in vitro* han mostrado que componentes del humo de cigarrillos de tabaco, como la nicotina y el benzo(a)pireno, inducen TEM en líneas celulares epiteliales bronquiales [155, 197].

En relación al segundo objetivo planteado, se han encontrado evidencias de una TEM en CEBH diferenciadas en respuesta a humo de tabaco, demostrado mediante marcadores específicos y cambios en el fenotipo. El humo de tabaco contiene un elevado número de especies reactivas de oxígeno, que podrían activar la liberación de TGF- β 1 latente [198]. Existen resultados previos en explantes de bronquios de rata que apoyan la hipótesis de que el humo de tabaco podría liberar la forma activa de TGF- β 1 y activar su cascada de señalización de Smad2/3 y promover el remodelado de los bronquiolos [198]. Adicionalmente, tanto el humo de tabaco como TGF- β 1 también promueven la activación de la cascada de señalización de ERK1/2 en CEBH [199], sugiriendo un rol de la fosforilación de Smad3 y ERK1/2 en la TEM inducida por humo de tabaco.

En este estudio, en línea con el tercer objetivo, se aportan nuevas evidencias del mecanismo por el cual el EHT aumenta la liberación de la forma activa de TGF- β 1, la fosforilación de Smad3 y ERK1/2, y por consiguiente promueve el proceso de TEM en CEBH diferenciadas. Las especies reactivas de oxígeno generadas por el EHT desencadenan la liberación de TGF- β 1 y la activación de la cascada de fosforilación de Smad3 y ERK1/2, puesto que los antioxidantes NAC y APO – así como el bloqueo de TGF- β 1 con mAb-TGF- β 1- prácticamente suprimieron la señalización de TGF- β 1 y la TEM inducidas por EHT. Estos

resultados *in vitro* son clínicamente relevantes ya que las formas fosforiladas de ERK1/2 y Smad3 están aumentadas en CEBH primarias de fumadores y pacientes con EPOC.

La importancia de la liberación de TGF- β 1 mediada por oxidantes, así como de las especies reactivas de oxígeno en las enfermedades fibróticas, ha sido previamente documentada [147]. De hecho, en enfermedades fibróticas pulmonares la transformación a miofibroblasto tras estimulación con TGF- β 1 está parcialmente mediada por la unidad de la NADPH oxidasa NOX4 [147]. NOX4 es una unidad presente en la membrana plasmática que no requiere interacción y activación por subunidades regulatorias citosólicas, por lo que su activación está directamente relacionada con su expresión [200]. En el presente estudio, se ha observado que el EHT aumentó las especies reactivas de oxígeno intracelulares así como la expresión de NOX4 en CEBH diferenciadas. Además, la expresión de NOX4 estaba aumentada en CEBH primarias de fumadores y pacientes con EPOC y localizada en las células epiteliales bronquiales y en los infiltrados de leucocitos en los bronquiolos humanos, confirmando la activación del estrés oxidativo en los tejidos estudiados.

Considerando el papel del AMPc como inhibidor de especies reactivas de oxígeno en células epiteliales, así como el subsiguiente proceso de TEM [149], se ha explorado si el AMPc podría modular la TEM inducida por EHT en CEBH diferenciadas. En el modelo *in vitro* utilizado, el EHT indujo la pérdida de AMPc, probablemente debido a un incremento en la actividad de degradación de AMPc característica de la PDE4, tal y como se ha descrito previamente en CEBH [110]. La adición de dbcAMP, como análogo del AMPc, redujo las especies reactivas de oxígeno, la secreción de TGF- β 1 y su cascada de señalización, mediada por fosfo-ERK1/2 y fosfo-Smad3, así como el proceso de TEM. La modulación de los niveles de AMPc podría, por tanto, constituir una terapia apropiada para atenuar la TEM y el remodelado de los bronquiolos de pacientes con EPOC.

En resumen, una secuencia racional de los mecanismos por los que el EHT induce TEM en CEBH incluye la activación del sistema NADPH oxidasa y la sobrerregulación de su componente NOX4 para la producción intracelular de especies reactivas de oxígeno. Así, las especies reactivas de oxígeno disminuyen los niveles de AMPc a través del aumento de actividad PDE4. En un evento subsiguiente, el aumento de especies reactivas de oxígeno intracelular junto con la reducción en AMPc contribuye a la liberación de TGF- β 1. TGF- β 1 activa Smad3 y ERK1/2, contribuyendo al aumento de TEM.

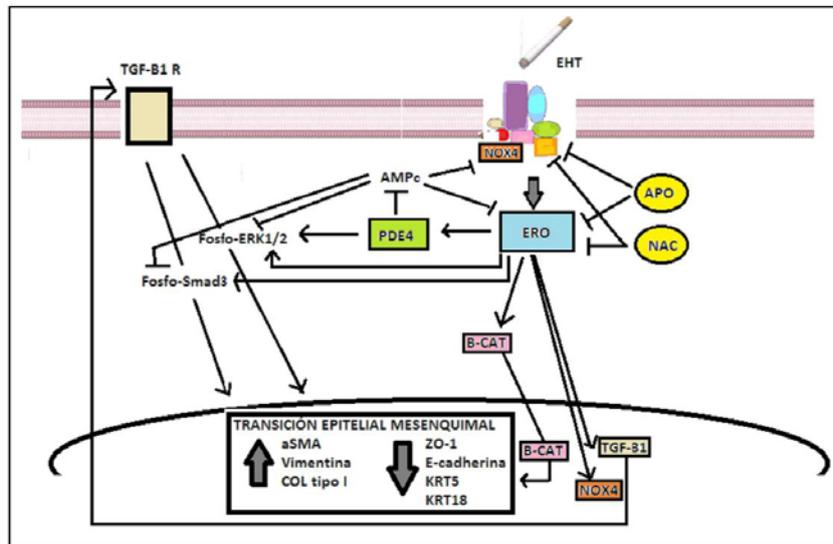


Figura 58. Esquema de los mecanismos propuestos en la transición epitelial mesenquimal (TEM) inducida por extracto de humo de tabaco (EHT) en células epiteliales bronquiales humanas (CEBH). El EHT induce TEM en CEBH mediante la activación del sistema NADPH oxidasa y la sobreexpresión de su componente NOX4 para la producción intracelular de especies reactivas de oxígeno (ERO). Así, las ERO disminuyen los niveles de AMPc a través del aumento de actividad PDE4. En un evento subsiguiente, el aumento intracelular de especies reactivas de oxígeno junto con la reducción en AMPc contribuye a la liberación de TGF-β1. TGF-β1 activa Smad3 y ERK1/2 a través de su fosforilación, contribuyendo a la presencia de TEM. La apocinina (APO) y la N-acetil-L-cisteína (NAC) se han utilizado para evidenciar la participación de ERO mediante su inhibición. El dbcAMP se ha utilizado para aumentar los niveles de AMPc. La expresión del factor de transcripción β-catenina (B-CAT), característico del programa de TEM, aumenta en el núcleo contribuyendo también a la TEM.

Los resultados de este estudio proporcionan evidencias de un proceso activo de TEM en los bronquiolos de fumadores y pacientes con EPOC que podría potencialmente contribuir al engrosamiento de la pared de los bronquiolos. Además, los estudios *in vitro* realizados muestran que la TEM podría estar potencialmente inducida por el humo de tabaco.

5.2 ESTUDIO II: RNO INHIBE LA TEM INDUCIDA POR HUMO DE TABACO EN LA EPOC.

A continuación se describen los principales resultados obtenidos en el segundo estudio de esta tesis doctoral:

- (1) El iPDE4 RNO inhibe la TEM inducida por EHT en CEBH diferenciadas, mediante la inhibición de las vías de señalización involucradas.
- (2) Las CEBH primarias aisladas de bronquiolos de fumadores y pacientes EPOC muestran un aumento de los marcadores mesenquimales que correlaciona con la función pulmonar. El tratamiento *in vitro* con RNO de CEBH primarias de fumadores y pacientes EPOC atenúa los marcadores de TEM.

Estos resultados muestran evidencias, no descritas previamente, del papel del iPDE4 RNO como inhibidor del proceso de TEM inducido por EHT *in vitro* en CEBH diferenciadas. Asimismo, análisis adicionales han demostrado que los marcadores de TEM están aumentados en CEBH primarias de fumadores y pacientes con EPOC y que correlacionan con la función pulmonar. La adición de RNO, a su concentración terapéutica de 2 nM, a cultivos de CEBH primarias de fumadores y pacientes EPOC atenúa los marcadores de TEM sugiriendo un papel del RNO en la inhibición de la TEM en los bronquiolos humanos. Los resultados de este estudio aportan una posible explicación *in vitro* de los mecanismos potencialmente responsables de los efectos del roflumilast en la mejora del remodelado pulmonar y de la función pulmonar descrita en la clínica [201, 202].

La TEM, como parte del remodelado bronquiolar de pacientes EPOC, ha sido descrita en los resultados del primer estudio de esta tesis [186], así como por otros, que describen este proceso en las vías aéreas principales de pacientes con EPOC [171, 187]. El conocimiento generado por estos estudios aumenta la evidencia de que la TEM se inicia en los bronquiolos de fumadores y pacientes EPOC debida a una exposición crónica al estrés oxidativo generado por el humo de tabaco. La transformación de células epiteliales bronquiales basales a células mesenquimales, con fenotipo de miofibroblasto, contribuye a su migración a la capa de músculo liso, aumentando la fibrosis peri-bronquiolar y el engrosamiento del músculo liso bronquial. Esto conlleva un mayor estrechamiento de los bronquiolos y el aumento subsiguiente de la resistencia de las vías aéreas. El papel de la TEM en el desarrollo de la fibrosis peri-bronquiolar ha sido descrito *in vivo* en un estudio citado anteriormente que fue realizado en una cepa de ratones transgénicos a α -actina de músculo liso-Cre (α -SMA-Cre/R26R) demostrando que la TEM ocurre en células epiteliales bronquiales *in vivo* tras instilación intra-traqueal de bleomicina [191].

En los resultados del primer estudio de esta tesis, se ha mostrado un aumento de marcadores mesenquimales en células epiteliales bronquiales basales de bronquiolos de fumadores y pacientes con EPOC, así como una disminución de los marcadores epiteliales [186]. Además, las CEBH primarias aisladas de fumadores y pacientes EPOC conservan este aumento en los marcadores mesenquimales y la disminución en los marcadores epiteliales [186].

En este segundo estudio se aportan evidencias adicionales de la importancia del aumento de la expresión de los marcadores mesenquimales en el epitelio bronquiolar de fumadores y pacientes EPOC, ya que se evidencia una correlación inversa con el VEF₁%. En cambio, los marcadores epiteliales están directamente correlacionados con un VEF₁% mejorado. Estas observaciones podrían parecer contradictorias ya que los marcadores de TEM están relacionados con una función pulmonar deficiente o disminuida, pero también están aumentados en CEBH de fumadores que presentan una función pulmonar normal. Una explicación racional para esta aparente discrepancia podría deberse a que el proceso de remodelado pulmonar que afecta a la función pulmonar engloba diversos procesos como la hiperplasia de células caliciformes y de glándulas submucosas, la pérdida de pared alveolar, el remodelado vascular, el engrosamiento de la pared de las vías aéreas y la deposición de músculo liso alrededor de los bronquios, procesos que son significativamente mayores en pacientes con EPOC que en fumadores [118, 203, 204]. Así, aunque los marcadores de TEM están aumentados en fumadores con una función pulmonar normal, esto puede representar un proceso temprano del remodelado bronquiolar que, junto a otros procesos del remodelado, contribuya a la restricción del flujo aéreo.

Roflumilast es el primer iPDE4 aprobado en la clínica para reducir el riesgo de exacerbaciones en pacientes con EPOC severa asociada a bronquitis crónica y a un historial de exacerbaciones. En estudios *in vivo*, este fármaco ha demostrado una reducción del enfisema pulmonar, de la inflamación y de la fibrosis en ratones fumadores y en ratones tratados con bleomicina [205-207]. Además, estudios *in vitro* han mostrado que el roflumilast atenúa las funciones de los fibroblastos pulmonares [208]. Estudios recientes también han mostrado que la inhibición de PDE4 podría reducir la TEM inducida por TGF- β 1 en la línea de células epiteliales alveolares A549 [139]. Sin embargo, actualmente se desconoce el efecto del roflumilast en la TEM bronquial inducida por EHT como parte del proceso de remodelado de los bronquiolos de pacientes EPOC.

Evidencias recientes, descritas anteriormente, han demostrado que el humo de tabaco y algunos de sus componentes, como la nicotina, el benzo(a)pireno o H_2O_2 entre otros, podrían promover la TEM en células epiteliales de las vías aéreas [138, 155, 169, 186, 209, 210]. En relación al primer objetivo de este segundo estudio, se ha observado que el EHT induce la TEM en CEBH diferenciadas y que el RNO inhibe tanto los marcadores de TEM como el cambio a fenotipo tipo miofibroblasto.

En cuanto a los mecanismos implicados, tal y como se ha discutido anteriormente, el exceso de estrés oxidativo generado por el humo de tabaco podría desencadenar la liberación de TGF- β 1, así como la activación del TGF- β 1 latente, uno de los principales inductores de TEM que, mediante la fosforilación de las cascadas de señalización de ERK1/2 y Smad3 activa la TEM de forma paracrina y autocrina [186]. Además, tanto el humo de tabaco como el TGF- β 1 generan especies reactivas de oxígeno intracelulares en CEBH que potencian la fosforilación de ERK1/2 y Smad3, perpetuando así la TEM. La expresión aumentada de la subunidad de la NADPH oxidasa NOX4, que ha sido relacionada con enfermedades fibróticas pulmonares es, además, uno de los principales mecanismos en el origen de especies reactivas de oxígeno intracelular [147]. De hecho, evidencias recientes sugieren que NOX4 está aumentada por TGF- β 1 y es necesaria para promover la TEM [211].

En este segundo estudio se ha observado que RNO reduce el aumento de especies reactivas de oxígeno intracelular, la liberación de TGF- β 1 y la sobre-expresión de NOX4 generados por el humo de tabaco en CEBH. En estudios previos del grupo se ha demostrado que RNO podría reducir los niveles intracelulares de especies reactivas de oxígeno [110] y, en el primer estudio de esta tesis, se ha mostrado que un tratamiento antioxidante podría reducir la TEM inducida por humo de tabaco en CEBH [186]. Las propiedades antioxidantes de roflumilast o de su metabolito activo RNO son bien conocidas y afectan virtualmente a todas las células involucradas en la EPOC [101]. Por tanto, el efecto inhibitorio de RNO en la TEM bronquiolar secundaria a la exposición al humo de tabaco emana principalmente de sus propiedades antioxidantes. Esto se puede comprender mejor teniendo en cuenta que el humo de tabaco y las especies reactivas de oxígeno aumentan la expresión y actividad de la PDE4 en CEBH diferenciadas reduciendo los niveles intracelulares de AMPc [110]. En relación a esto, la adición exógena de análogos del AMPc atenúa la TEM inducida por humo de tabaco o TGF- β 1 debido a sus efectos en la reducción de especies reactivas de oxígeno, tal y como se describe en los resultados publicados del primer estudio de este trabajo y en otras publicaciones [186, 212].

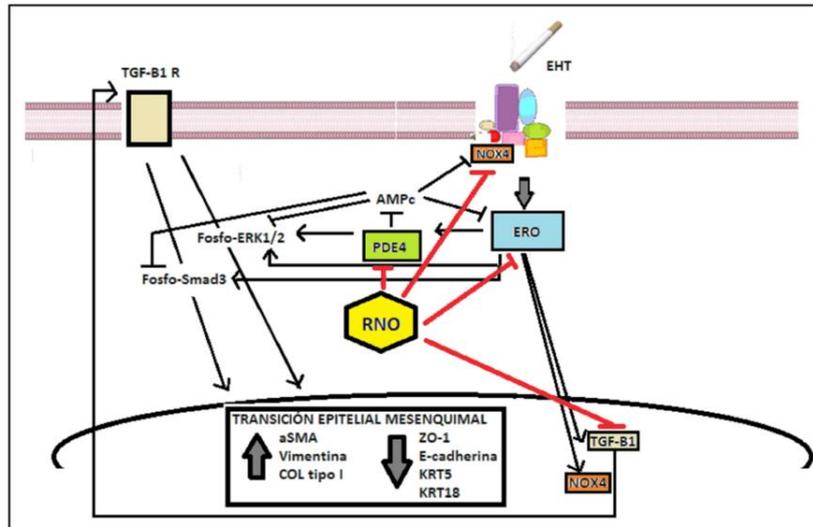


Figura 59. Esquema del papel del N-óxido roflumilast (RNO) en los mecanismos propuestos en la transición epitelial mesenquimal (TEM) inducida por extracto de humo de tabaco (EHT) en células epiteliales bronquiales humanas. El RNO reduce la TEM a través de la reducción de: el aumento intracelular de especies reactivas de oxígeno, la liberación de TGF-β1 y la sobre-expresión de NOX4 generados por el humo de tabaco, a través de la inhibición de la PDE4 y el consiguiente aumento del monofosfato de adenosina cíclico (AMPc).

En relación al segundo objetivo, se realizaron experimentos posteriores para explorar los efectos de RNO en los marcadores de TEM en células epiteliales bronquiales de fumadores y pacientes EPOC. Los resultados mostraron que RNO redujo los marcadores mesenquimales y aumentó los marcadores epiteliales en CEBH primarias de fumadores y pacientes EPOC sugiriendo un rol en la inhibición del proceso de TEM en bronquiolos humanos. Sin embargo, aunque estos resultados podrían representar una explicación de los efectos de mejora de la función pulmonar del roflumilast en la clínica, este hallazgo debería corroborarse *in vivo*.

Los resultados de este estudio demuestran que el RNO inhibe la TEM inducida por humo de tabaco en la EPOC, aportando una posible explicación *in vitro* de los mecanismos potencialmente responsables de los efectos del fármaco en la mejora del remodelado pulmonar y de la función pulmonar descrita en la clínica [201, 202].

6. CONCLUSIONES

- (1) Las células epiteliales bronquiales humanas primarias de bronquiolos de fumadores y pacientes con EPOC muestran un aumento del perfil de expresión típico de la TEM, sugiriendo que la TEM está presente en los bronquiolos de fumadores y pacientes con EPOC pudiendo potencialmente contribuir al engrosamiento de la pared bronquiolar causado por fibrosis.
- (2) La estimulación *in vitro* con EHT de CEBH desencadena TEM, apuntando una posible relación del humo de tabaco con la potencial inducción de TEM bronquiolar relacionada con la EPOC.
- (3) El EHT desencadena TEM *in vitro* en CEBH a través de la implicación de diversos mecanismos de señalización como: la activación de especies reactivas de oxígeno intracelulares, la liberación de TGF- β 1, la fosforilación de ERK1/2 y Smad3 y la disminución de AMPc.
- (4) El iPDE4 RNO inhibe la TEM inducida por EHT en CEBH, inhibiendo las vías de señalización involucradas en dicha transición.
- (5) Las CEBH primarias aisladas de bronquiolos de fumadores y pacientes EPOC muestran un aumento de los marcadores mesenquimales que correlaciona con la función pulmonar.
- (6) El tratamiento *in vitro* con RNO de CEBH primarias de fumadores y pacientes EPOC atenúa los marcadores de TEM, pudiendo representar una explicación del efecto de mejora del roflumilast en la función pulmonar observado en la clínica, que debe ser corroborado *in vivo*.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. WHO. *Global surveillance, prevention and control of Chronic Obstructive Diseases. A comprehensive approach*. 2007. http://whqlibdoc.who.int/publications/2007/9789241563468_eng.pdf (Fecha de acceso: 9 de enero de 2013).
2. *Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of COPD: updated 2011*. http://www.goldcopd.org/uploads/users/files/GOLD_Report_2011_Feb21.pdf (Fecha de acceso: 11 de diciembre de 2012).
3. Hogg, J.C., et al., *The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease*. N Engl J Med, 2004. **350**(26): p. 2645-53.
4. Calverley, P.M., et al., *Salmeterol and fluticasone propionate and survival in chronic obstructive pulmonary disease*. N Engl J Med, 2007. **356**(8): p. 775-89.
5. Leach, C., G.L. Colice, and A. Luskin, *Particle size of inhaled corticosteroids: does it matter?* J Allergy Clin Immunol, 2009. **124**(6 Suppl): p. S88-93.
6. Tashkin, D.P., et al., *A 4-year trial of tiotropium in chronic obstructive pulmonary disease*. N Engl J Med, 2008. **359**(15): p. 1543-54.
7. Yanai, M., et al., *Site of airway obstruction in pulmonary disease: direct measurement of intrabronchial pressure*. J Appl Physiol, 1992. **72**(3): p. 1016-23.
8. WHO. *World health statistics 2008*. http://www.who.int/whosis/whostat/EN_WHS08_Full.pdf (Fecha de acceso: 9 de enero de 2013)
9. Lopez, A.D., et al., *Chronic obstructive pulmonary disease: current burden and future projections*. Eur Respir J, 2006. **27**(2): p. 397-412.
10. Salvi, S.S. and P.J. Barnes, *Chronic obstructive pulmonary disease in non-smokers*. Lancet, 2009. **374**(9691): p. 733-43.
11. Mathers, C.D. and D. Loncar, *Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030*. PLoS Med, 2006. **3**(11): p. e442.
12. Soriano, J.B. and B. Lamprecht, *Chronic obstructive pulmonary disease: a worldwide problem*. Med Clin North Am, 2012. **96**(4): p. 671-80.
13. Decramer, M., W. Janssens, and M. Miravittles, *Chronic obstructive pulmonary disease*. Lancet, 2012. **379**(9823): p. 1341-51.
14. Halbert, R.J., et al., *Global burden of COPD: systematic review and meta-analysis*. Eur Respir J, 2006. **28**(3): p. 523-32.
15. Fukuchi, Y., et al., *COPD in Japan: the Nippon COPD Epidemiology study*. Respirology, 2004. **9**(4): p. 458-65.
16. Buist, A.S., et al., *International variation in the prevalence of COPD (the BOLD Study): a population-based prevalence study*. Lancet, 2007. **370**(9589): p. 741-50.
17. Menezes, A.M., et al., *Chronic obstructive pulmonary disease in five Latin American cities (the PLATINO study): a prevalence study*. Lancet, 2005. **366**(9500): p. 1875-81.
18. Miller, R.M., D. George, and R.J. Halbert, *Improving the management of chronic obstructive pulmonary disease*. J Healthc Qual, 2005. **27**(2): p. 42-7.
19. Miravittles, M., et al., *Prevalence of COPD in Spain: impact of undiagnosed COPD on quality of life and daily life activities*. Thorax, 2009. **64**(10): p. 863-8.
20. van den Boom, G., et al., *Active detection of chronic obstructive pulmonary disease and asthma in the general population. Results and economic consequences of the DIMCA program*. Am J Respir Crit Care Med, 1998. **158**(6): p. 1730-8.
21. Vollmer, W.M., et al., *Comparison of spirometry criteria for the diagnosis of COPD: results from the BOLD study*. Eur Respir J, 2009. **34**(3): p. 588-97.
22. Bousquet, J., et al., *Prioritised research agenda for prevention and control of chronic respiratory diseases*. Eur Respir J, 2010. **36**(5): p. 995-1001.

Bibliografia

23. Mapel, D.W., et al., *Predicting the costs of managing patients with chronic obstructive pulmonary disease*. *Respir Med*, 2005. **99**(10): p. 1325-33.
24. Beasley, V., et al., *Lung microbiology and exacerbations in COPD*. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 2012. **7**: p. 555-69.
25. Parker, C.M., et al., *Physiological changes during symptom recovery from moderate exacerbations of COPD*. *Eur Respir J*, 2005. **26**(3): p. 420-8.
26. Barnes, P.J. and B.R. Celli, *Systemic manifestations and comorbidities of COPD*. *Eur Respir J*, 2009. **33**(5): p. 1165-85.
27. Sin, D.D., et al., *Mortality in COPD: Role of comorbidities*. *Eur Respir J*, 2006. **28**(6): p. 1245-57.
28. Fabbri, L.M., et al., *Complex chronic comorbidities of COPD*. *Eur Respir J*, 2008. **31**(1): p. 204-12.
29. Mannino, D.M., et al., *Prevalence and outcomes of diabetes, hypertension and cardiovascular disease in COPD*. *Eur Respir J*, 2008. **32**(4): p. 962-9.
30. Jemal, A., et al., *Trends in the leading causes of death in the United States, 1970-2002*. *JAMA*, 2005. **294**(10): p. 1255-9.
31. Murray, C.J. and A.D. Lopez, *Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: Global Burden of Disease Study*. *Lancet*, 1997. **349**(9064): p. 1498-504.
32. Stephens, M.B. and K.S. Yew, *Diagnosis of chronic obstructive pulmonary disease*. *Am Fam Physician*, 2008. **78**(1): p. 87-92.
33. Smith, C.A. and D.J. Harrison, *Association between polymorphism in gene for microsomal epoxide hydrolase and susceptibility to emphysema*. *Lancet*, 1997. **350**(9078): p. 630-3.
34. Lamprecht, B., et al., *COPD in never smokers: results from the population-based burden of obstructive lung disease study*. *Chest*, 2011. **139**(4): p. 752-63.
35. Punturieri, A., et al., *The changing face of COPD*. *Am Fam Physician*, 2007. **75**(3): p. 315-6.
36. Tager, I.B., et al., *The natural history of forced expiratory volumes. Effect of cigarette smoking and respiratory symptoms*. *Am Rev Respir Dis*, 1988. **138**(4): p. 837-49.
37. Burrows, B., et al., *Quantitative relationships between cigarette smoking and ventilatory function*. *Am Rev Respir Dis*, 1977. **115**(2): p. 195-205.
38. Trupin, L., et al., *The occupational burden of chronic obstructive pulmonary disease*. *Eur Respir J*, 2003. **22**(3): p. 462-9.
39. Matheson, M.C., et al., *Biological dust exposure in the workplace is a risk factor for chronic obstructive pulmonary disease*. *Thorax*, 2005. **60**(8): p. 645-51.
40. Blanc, P.D., et al., *Occupational exposures and the risk of COPD: dusty trades revisited*. *Thorax*, 2009. **64**(1): p. 6-12.
41. de Meer, G., et al., *Interaction of atopy and smoking on respiratory effects of occupational dust exposure: a general population-based study*. *Environ Health*, 2004. **3**(1): p. 6.
42. Devereux, G., *ABC of chronic obstructive pulmonary disease. Definition, epidemiology, and risk factors*. *BMJ*, 2006. **332**(7550): p. 1142-4.
43. Rennard, S.I. and J. Vestbo, *COPD: the dangerous underestimate of 15%*. *Lancet*, 2006. **367**(9518): p. 1216-9.
44. Lokke, A., et al., *Developing COPD: a 25 year follow up study of the general population*. *Thorax*, 2006. **61**(11): p. 935-9.
45. Kohansal, R., et al., *The natural history of chronic airflow obstruction revisited: an analysis of the Framingham offspring cohort*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2009. **180**(1): p. 3-10.
46. *American Thoracic Society. Cigarette smoking and health. ATS statement*. *Am Rev Respir Dis*, 1985. **132**: p. 1133-1136.

47. Silverman, E.K., *Progress in chronic obstructive pulmonary disease genetics*. Proc Am Thorac Soc, 2006. **3**(5): p. 405-8.
48. Eisner, M.D., et al., *Lifetime environmental tobacco smoke exposure and the risk of chronic obstructive pulmonary disease*. Environ Health, 2005. **4**(1): p. 7.
49. Eisner, M.D., et al., *An official American Thoracic Society public policy statement: Novel risk factors and the global burden of chronic obstructive pulmonary disease*. Am J Respir Crit Care Med, 2010. **182**(5): p. 693-718.
50. Hnizdo, E., et al., *Association between chronic obstructive pulmonary disease and employment by industry and occupation in the US population: a study of data from the Third National Health and Nutrition Examination Survey*. Am J Epidemiol, 2002. **156**(8): p. 738-46.
51. Balmes, J., et al., *American Thoracic Society Statement: Occupational contribution to the burden of airway disease*. Am J Respir Crit Care Med, 2003. **167**(5): p. 787-97.
52. Torres-Duque, C., et al., *Biomass fuels and respiratory diseases: a review of the evidence*. Proc Am Thorac Soc, 2008. **5**(5): p. 577-90.
53. Lopez, A.D., et al., *Measuring the Global Burden of Disease and Risk Factors, 1990-2001*. 2006.
54. Abbey, D.E., et al., *Long-term particulate and other air pollutants and lung function in nonsmokers*. Am J Respir Crit Care Med, 1998. **158**(1): p. 289-98.
55. Arbex, M.A., et al., *Urban air pollution and chronic obstructive pulmonary disease-related emergency department visits*. J Epidemiol Community Health, 2009. **63**(10): p. 777-83.
56. Stoller, J.K. and L.S. Aboussouan, *Alpha1-antitrypsin deficiency*. Lancet, 2005. **365**(9478): p. 2225-36.
57. Lomas, D.A. and R. Mahadeva, *Alpha1-antitrypsin polymerization and the serpinopathies: pathobiology and prospects for therapy*. J Clin Invest, 2002. **110**(11): p. 1585-90.
58. Lomas, D.A., et al., *The mechanism of Z alpha 1-antitrypsin accumulation in the liver*. Nature, 1992. **357**(6379): p. 605-7.
59. McCloskey, S.C., et al., *Siblings of patients with severe chronic obstructive pulmonary disease have a significant risk of airflow obstruction*. Am J Respir Crit Care Med, 2001. **164**(8 Pt 1): p. 1419-24.
60. Repapi, E., et al., *Genome-wide association study identifies five loci associated with lung function*. Nat Genet, 2010. **42**(1): p. 36-44.
61. Soler Artigas, M., et al., *Genome-wide association and large-scale follow up identifies 16 new loci influencing lung function*. Nat Genet, 2011. **43**(11): p. 1082-90.
62. Hall, I.P., *Stratified medicine: drugs meet genetics*. Eur Respir Rev, 2013. **22**(127): p. 53-7.
63. MacNee, W., *Pulmonary and systemic oxidant/antioxidant imbalance in chronic obstructive pulmonary disease*. Proc Am Thorac Soc, 2005. **2**(1): p. 50-60.
64. MacNee, W., *Oxidative stress and lung inflammation in airways disease*. Eur J Pharmacol, 2001. **429**(1-3): p. 195-207.
65. Maciewicz, R.A., D. Warburton, and S.I. Rennard, *Can increased understanding of the role of lung development and aging drive new advances in chronic obstructive pulmonary disease?* Proc Am Thorac Soc, 2009. **6**(7): p. 614-7.
66. Mannino, D.M., et al., *Chronic obstructive pulmonary disease surveillance--United States, 1971-2000*. Respir Care, 2002. **47**(10): p. 1184-99.
67. Lopez Varela, M.V., et al., *Sex-related differences in COPD in five Latin American cities: the PLATINO study*. Eur Respir J, 2010. **36**(5): p. 1034-41.
68. Sorheim, I.C., et al., *Gender differences in COPD: are women more susceptible to smoking effects than men?* Thorax, 2010. **65**(6): p. 480-5.

Bibliografia

69. Chapman, K.R., *Chronic obstructive pulmonary disease: are women more susceptible than men?* Clin Chest Med, 2004. **25**(2): p. 331-41.
70. Prescott, E., P. Lange, and J. Vestbo, *Socioeconomic status, lung function and admission to hospital for COPD: results from the Copenhagen City Heart Study.* Eur Respir J, 1999. **13**(5): p. 1109-14.
71. Svanes, C., et al., *Early life origins of chronic obstructive pulmonary disease.* Thorax, 2010. **65**(1): p. 14-20.
72. Hancox, R.J., et al., *Associations between birth weight, early childhood weight gain and adult lung function.* Thorax, 2009. **64**(3): p. 228-32.
73. Lawlor, D.A., S. Ebrahim, and G. Davey Smith, *Association of birth weight with adult lung function: findings from the British Women's Heart and Health Study and a meta-analysis.* Thorax, 2005. **60**(10): p. 851-8.
74. Barnes, P.J., *Similarities and differences in inflammatory mechanisms of asthma and COPD.* Breathe, 2011. **7**(3): p. 229-238.
75. Lange, P., et al., *A 15-year follow-up study of ventilatory function in adults with asthma.* N Engl J Med, 1998. **339**(17): p. 1194-200.
76. Retamales, I., et al., *Amplification of inflammation in emphysema and its association with latent adenoviral infection.* Am J Respir Crit Care Med, 2001. **164**(3): p. 469-73.
77. Sethi, S., et al., *Airway inflammation and bronchial bacterial colonization in chronic obstructive pulmonary disease.* Am J Respir Crit Care Med, 2006. **173**(9): p. 991-8.
78. Seemungal, T., et al., *Respiratory viruses, symptoms, and inflammatory markers in acute exacerbations and stable chronic obstructive pulmonary disease.* Am J Respir Crit Care Med, 2001. **164**(9): p. 1618-23.
79. Jordan, T.S., E.M. Spencer, and P. Davies, *Tuberculosis, bronchiectasis and chronic airflow obstruction.* Respirology, 2010. **15**(4): p. 623-8.
80. Rabe, K.F., et al., *Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary.* Am J Respir Crit Care Med, 2007. **176**(6): p. 532-55.
81. Fletcher, C. and R. Peto, *The natural history of chronic airflow obstruction.* Br Med J, 1977. **1**(6077): p. 1645-8.
82. Pauwels, R.A. and K.F. Rabe, *Burden and clinical features of chronic obstructive pulmonary disease (COPD).* Lancet, 2004. **364**(9434): p. 613-20.
83. Celli, B.R. and W. MacNee, *Standards for the diagnosis and treatment of patients with COPD: a summary of the ATS/ERS position paper.* Eur Respir J, 2004. **23**(6): p. 932-46.
84. Broekhuizen, B.D., et al., *Diagnostic management of chronic obstructive pulmonary disease.* Neth J Med, 2012. **70**(1): p. 6-11.
85. Parr, D.G., *Patient phenotyping and early disease detection in chronic obstructive pulmonary disease.* Proc Am Thorac Soc, 2011. **8**(4): p. 338-49.
86. Johannessen, A., et al., *Implications of reversibility testing on prevalence and risk factors for chronic obstructive pulmonary disease: a community study.* Thorax, 2005. **60**(10): p. 842-7.
87. Johannessen, A., et al., *Post-bronchodilator spirometry reference values in adults and implications for disease management.* Am J Respir Crit Care Med, 2006. **173**(12): p. 1316-25.
88. Rahman, I., *Oxidative stress in pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease: cellular and molecular mechanisms.* Cell Biochem Biophys, 2005. **43**(1): p. 167-88.
89. Barnes, P.J., *Chronic obstructive pulmonary disease.* N Engl J Med, 2000. **343**(4): p. 269-80.
90. Thorley, A.J. and T.D. Tetley, *Pulmonary epithelium, cigarette smoke, and chronic obstructive pulmonary disease.* Int J Chron Obstruct Pulmon Dis, 2007. **2**(4): p. 409-28.
91. Gorska, K., M. Maskey-Warzechowska, and R. Krenke, *Airway inflammation in chronic obstructive pulmonary disease.* Curr Opin Pulm Med, 2010. **16**(2): p. 89-96.

92. Hogg, J.C., *Pathophysiology of airflow limitation in chronic obstructive pulmonary disease*. Lancet, 2004. **364**(9435): p. 709-21.
93. Rennard, S.I., *Chronic obstructive pulmonary disease: linking outcomes and pathobiology of disease modification*. Proc Am Thorac Soc, 2006. **3**(3): p. 276-80.
94. Barnes, P.J., *New therapies for chronic obstructive pulmonary disease*. Med Princ Pract, 2010. **19**(5): p. 330-8.
95. 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.
96. Dougherty, J.A., B.L. Didur, and L.S. Aboussouan, *Long-acting inhaled beta 2-agonists for stable COPD*. Ann Pharmacother, 2003. **37**(9): p. 1247-55.
97. Disse, B., et al., *Tiotropium (Spiriva): mechanistical considerations and clinical profile in obstructive lung disease*. Life Sci, 1999. **64**(6-7): p. 457-64.
98. Zhou, Y., et al., *Positive benefits of theophylline in a randomized, double-blind, parallel-group, placebo-controlled study of low-dose, slow-release theophylline in the treatment of COPD for 1 year*. Respirology, 2006. **11**(5): p. 603-10.
99. Spencer, S., et al., *Impact of preventing exacerbations on deterioration of health status in COPD*. Eur Respir J, 2004. **23**(5): p. 698-702.
100. *Daliresp. Full prescribing information, revised September 2011*. . Forest Pharmaceuticals, St. Louis., 2011.
101. 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.
102. Lugnier, C., *Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) superfamily: a new target for the development of specific therapeutic agents*. Pharmacol Ther, 2006. **109**(3): p. 366-98.
103. 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.
104. Houslay, M.D., P. Schafer, and K.Y. Zhang, *Keynote review: phosphodiesterase-4 as a therapeutic target*. Drug Discov Today, 2005. **10**(22): p. 1503-19.
105. 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.
106. 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.
107. Torphy, T.J., *Phosphodiesterase isozymes: molecular targets for novel antiasthma agents*. Am J Respir Crit Care Med, 1998. **157**(2): p. 351-70.
108. Rabe, K.F., *Roflumilast for the treatment of chronic obstructive pulmonary disease*. Expert Rev Respir Med, 2010. **4**(5): p. 543-55.
109. Cortijo, J.C., Morcillo, E.J., *Perfil farmacológico del roflumilast*. Archivos de Bronconeumología, 2010. **46**(10): p. 19-24.
110. Milara, J., et al., *Roflumilast N-oxide, a PDE4 inhibitor, improves cilia motility and ciliated human bronchial epithelial cells compromised by cigarette smoke in vitro*. Br J Pharmacol, 2012. **166**(8): p. 2243-62.
111. 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.
112. 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.
113. 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.

Bibliografia

114. Jeffery, P.K., *Remodeling and inflammation of bronchi in asthma and chronic obstructive pulmonary disease*. Proc Am Thorac Soc, 2004. **1**(3): p. 176-83.
115. O'Donnell, D.E., *Hyperinflation, dyspnea, and exercise intolerance in chronic obstructive pulmonary disease*. Proc Am Thorac Soc, 2006. **3**(2): p. 180-4.
116. Racke, K., et al., *Pulmonary fibroblasts, an emerging target for anti-obstructive drugs*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2008. **378**(2): p. 193-201.
117. Burgel, P.R., et al., *Update on the roles of distal airways in COPD*. Eur Respir Rev, 2011. **20**(119): p. 7-22.
118. Kirkham, S., et al., *MUC5B is the major mucin in the gel phase of sputum in chronic obstructive pulmonary disease*. Am J Respir Crit Care Med, 2008. **178**(10): p. 1033-9.
119. Voynow, J.A. and B.K. Rubin, *Mucins, mucus, and sputum*. Chest, 2009. **135**(2): p. 505-12.
120. Rogers, D.F., *Mucociliary dysfunction in COPD: effect of current pharmacotherapeutic options*. Pulm Pharmacol Ther, 2005. **18**(1): p. 1-8.
121. Burgel, P.R., *The role of small airways in obstructive airway diseases*. Eur Respir Rev, 2011. **20**(119): p. 23-33.
122. Barbera, J.A., V.I. Peinado, and S. Santos, *Pulmonary hypertension in chronic obstructive pulmonary disease*. Eur Respir J, 2003. **21**(5): p. 892-905.
123. Gosens, R., et al., *Muscarinic receptor signaling in the pathophysiology of asthma and COPD*. Respir Res, 2006. **7**: p. 73.
124. Matsuba, K., et al., *Small airways disease in patients without chronic air-flow limitation*. Am Rev Respir Dis, 1987. **136**(5): p. 1106-11.
125. Burgel, P.R., et al., *Update on the roles of distal airways in asthma*. Eur Respir Rev, 2009. **18**(112): p. 80-95.
126. Scotton, C.J. and R.C. Chambers, *Molecular targets in pulmonary fibrosis: the myofibroblast in focus*. Chest, 2007. **132**(4): p. 1311-21.
127. Singh, S.R. and I.P. Hall, *Airway myofibroblasts and their relationship with airway myocytes and fibroblasts*. Proc Am Thorac Soc, 2008. **5**(1): p. 127-32.
128. Phan, S.H., *The myofibroblast in pulmonary fibrosis*. Chest, 2002. **122**(6 Suppl): p. 286S-289S.
129. Lama, V.N. and S.H. Phan, *The extrapulmonary origin of fibroblasts: stem/progenitor cells and beyond*. Proc Am Thorac Soc, 2006. **3**(4): p. 373-6.
130. Salazar, L.M. and A.M. Herrera, *Fibrotic response of tissue remodeling in COPD*. Lung, 2011. **189**(2): p. 101-9.
131. Dasari, V., et al., *Epithelial-mesenchymal transition in lung cancer: is tobacco the "smoking gun"?* Am J Respir Cell Mol Biol, 2006. **35**(1): p. 3-9.
132. Kalluri, R. and R.A. Weinberg, *The basics of epithelial-mesenchymal transition*. J Clin Invest, 2009. **119**(6): p. 1420-8.
133. Walser, T., et al., *Smoking and lung cancer: the role of inflammation*. Proc Am Thorac Soc, 2008. **5**(8): p. 811-5.
134. Willis, B.C. and Z. Borok, *TGF-beta-induced EMT: mechanisms and implications for fibrotic lung disease*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2007. **293**(3): p. L525-34.
135. Guarino, M., A. Tosoni, and M. Nebuloni, *Direct contribution of epithelium to organ fibrosis: epithelial-mesenchymal transition*. Hum Pathol, 2009. **40**(10): p. 1365-76.
136. Higgins, D.F., et al., *Hypoxia promotes fibrogenesis in vivo via HIF-1 stimulation of epithelial-to-mesenchymal transition*. J Clin Invest, 2007. **117**(12): p. 3810-20.
137. Rhyu, D.Y., et al., *Role of reactive oxygen species in TGF-beta1-induced mitogen-activated protein kinase activation and epithelial-mesenchymal transition in renal tubular epithelial cells*. J Am Soc Nephrol, 2005. **16**(3): p. 667-75.
138. Gorowiec, M.R., et al., *Free radical generation induces epithelial-to-mesenchymal transition in lung epithelium via a TGF-beta1-dependent mechanism*. Free Radic Biol Med, 2012. **52**(6): p. 1024-32.

139. Kolosionek, E., et al., *Expression and activity of phosphodiesterase isoforms during epithelial mesenchymal transition: the role of phosphodiesterase 4*. Mol Biol Cell, 2009. **20**(22): p. 4751-65.
140. Willis, B.C., et al., *Induction of epithelial-mesenchymal transition in alveolar epithelial cells by transforming growth factor-beta1: potential role in idiopathic pulmonary fibrosis*. Am J Pathol, 2005. **166**(5): p. 1321-32.
141. Doerner, A.M. and B.L. Zuraw, *TGF-beta1 induced epithelial to mesenchymal transition (EMT) in human bronchial epithelial cells is enhanced by IL-1beta but not abrogated by corticosteroids*. Respir Res, 2009. **10**: p. 100.
142. Camara, J. and G. Jarai, *Epithelial-mesenchymal transition in primary human bronchial epithelial cells is Smad-dependent and enhanced by fibronectin and TNF-alpha*. Fibrogenesis Tissue Repair, 2010. **3**(1): p. 2.
143. Hackett, T.L., et al., *Induction of epithelial-mesenchymal transition in primary airway epithelial cells from patients with asthma by transforming growth factor-beta1*. Am J Respir Crit Care Med, 2009. **180**(2): p. 122-33.
144. Kim, K.K., et al., *Alveolar epithelial cell mesenchymal transition develops in vivo during pulmonary fibrosis and is regulated by the extracellular matrix*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(35): p. 13180-5.
145. Bedard, K. and K.H. Krause, *The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology*. Physiol Rev, 2007. **87**(1): p. 245-313.
146. Wu, W.S., *The signaling mechanism of ROS in tumor progression*. Cancer Metastasis Rev, 2006. **25**(4): p. 695-705.
147. Hecker, L., et al., *NADPH oxidase-4 mediates myofibroblast activation and fibrogenic responses to lung injury*. Nat Med, 2009. **15**(9): p. 1077-81.
148. Felton, V.M., Z. Borok, and B.C. Willis, *N-acetylcysteine inhibits alveolar epithelial-mesenchymal transition*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2009. **297**(5): p. L805-12.
149. Zhang, A., et al., *Prostaglandin E2 is a potent inhibitor of epithelial-to-mesenchymal transition: interaction with hepatocyte growth factor*. Am J Physiol Renal Physiol, 2006. **291**(6): p. F1323-31.
150. Dunkern, T.R., et al., *Inhibition of TGF-beta induced lung fibroblast to myofibroblast conversion by phosphodiesterase inhibiting drugs and activators of soluble guanylyl cyclase*. Eur J Pharmacol, 2007. **572**(1): p. 12-22.
151. Selige, J., A. Hatzelmann, and T. Dunkern, *The differential impact of PDE4 subtypes in human lung fibroblasts on cytokine-induced proliferation and myofibroblast conversion*. J Cell Physiol, 2011. **226**(8): p. 1970-80.
152. Yao, H. and I. Rahman, *Current concepts on the role of inflammation in COPD and lung cancer*. Curr Opin Pharmacol, 2009. **9**(4): p. 375-83.
153. Milara, J. and J. Cortijo, *Tobacco, inflammation, and respiratory tract cancer*. Curr Pharm Des, 2012. **18**(26): p. 3901-38.
154. Stedman, R.L., *The chemical composition of tobacco and tobacco smoke*. Chem Rev, 1968. **68**(2): p. 153-207.
155. Yoshino, I., et al., *Induction of epithelial-mesenchymal transition-related genes by benzo[a]pyrene in lung cancer cells*. Cancer, 2007. **110**(2): p. 369-74.
156. Milara, J., et al., *Acridinium inhibits cigarette smoke-induced lung fibroblast to myofibroblast transition*. Eur Respir J, 2012.
157. Pera, T., et al., *Cigarette smoke and lipopolysaccharide induce a proliferative airway smooth muscle phenotype*. Respir Res, 2010. **11**: p. 48.
158. Profita, M., et al., *Smoke, choline acetyltransferase, muscarinic receptors, and fibroblast proliferation in chronic obstructive pulmonary disease*. J Pharmacol Exp Ther, 2009. **329**(2): p. 753-63.

Bibliografia

159. Liu, Y., W. Gao, and D. Zhang, *Effects of cigarette smoke extract on A549 cells and human lung fibroblasts treated with transforming growth factor-beta1 in a coculture system*. Clin Exp Med, 2010. **10**(3): p. 159-67.
160. Veljkovic, E., et al., *Chronic exposure to cigarette smoke condensate in vitro induces epithelial to mesenchymal transition-like changes in human bronchial epithelial cells, BEAS-2B*. Toxicol In Vitro, 2011. **25**(2): p. 446-53.
161. Petecchia, L., et al., *Bronchial airway epithelial cell damage following exposure to cigarette smoke includes disassembly of tight junction components mediated by the extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway*. Chest, 2009. **135**(6): p. 1502-12.
162. Churg, A., et al., *Expression of profibrotic mediators in small airways versus parenchyma after cigarette smoke exposure*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2009. **40**(3): p. 268-76.
163. Heijink, I.H., et al., *House dust mite-promoted epithelial-to-mesenchymal transition in human bronchial epithelium*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2010. **42**(1): p. 69-79.
164. Milara, J., et al., *Sphingosine-1-phosphate is increased in patients with idiopathic pulmonary fibrosis and mediates epithelial to mesenchymal transition*. Thorax, 2012. **67**(2): p. 147-56.
165. Morbini, P., et al., *Incomplete expression of epithelial-mesenchymal transition markers in idiopathic pulmonary fibrosis*. Pathol Res Pract, 2011. **207**(9): p. 559-67.
166. Jain, R., et al., *Endothelin-1 induces alveolar epithelial-mesenchymal transition through endothelin type A receptor-mediated production of TGF-beta1*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2007. **37**(1): p. 38-47.
167. Harada, T., et al., *Epithelial-mesenchymal transition in human lungs with usual interstitial pneumonia: quantitative immunohistochemistry*. Pathol Int, 2010. **60**(1): p. 14-21.
168. Ward, C., et al., *Phenotype of airway epithelial cells suggests epithelial to mesenchymal cell transition in clinically stable lung transplant recipients*. Thorax, 2005. **60**(10): p. 865-71.
169. Zhang, H., et al., *Cigarette smoke extract stimulates epithelial-mesenchymal transition through Src activation*. Free Radic Biol Med, 2012. **52**(8): p. 1437-42.
170. Zou, W., et al., *Nicotine-induced epithelial-mesenchymal transition via Wnt/beta-catenin signaling in human airway epithelial cells*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2013. **304**(4): p. L199-209.
171. Sohal, S.S., et al., *Evaluation of epithelial mesenchymal transition in patients with chronic obstructive pulmonary disease*. Respir Res, 2011. **12**: p. 130.
172. Flohe, L., et al., *Redox regulation of NF-kappa B activation*. Free Radic Biol Med, 1997. **22**(6): p. 1115-26.
173. Vlahopoulos, S., et al., *Nuclear factor-kappaB-dependent induction of interleukin-8 gene expression by tumor necrosis factor alpha: evidence for an antioxidant sensitive activating pathway distinct from nuclear translocation*. Blood, 1999. **94**(6): p. 1878-89.
174. Zafarullah, M., et al., *Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions*. Cell Mol Life Sci, 2003. **60**(1): p. 6-20.
175. *Oral N-acetylcysteine and exacerbation rates in patients with chronic bronchitis and severe airways obstruction*. British Thoracic Society Research Committee. Thorax, 1985. **40**(11): p. 832-5.
176. Milara, J., et al., *Extracellular calcium-sensing receptor mediates human bronchial epithelial wound repair*. Biochem Pharmacol, 2010. **80**(2): p. 236-46.
177. Milara, J., et al., *Acidinium inhibits human lung fibroblast to myofibroblast transition*. Thorax, 2012. **67**(3): p. 229-37.
178. 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.

179. Bethke, T.D., et al., *Dose-proportional intraindividual single- and repeated-dose pharmacokinetics of roflumilast, an oral, once-daily phosphodiesterase 4 inhibitor*. J Clin Pharmacol, 2007. **47**(1): p. 26-36.
180. Ortiz, J.L., et al., *Direct effect of cigarette smoke on human pulmonary artery tension*. Pulm Pharmacol Ther, 2010. **23**(3): p. 222-8.
181. Cortijo, J., et al., *Aclidinium inhibits cholinergic and tobacco smoke-induced MUC5AC in human airways*. Eur Respir J, 2011. **37**(2): p. 244-54.
182. Cramer, L.P., L.J. Briggs, and H.R. Dawe, *Use of fluorescently labelled deoxyribonuclease I to spatially measure G-actin levels in migrating and non-migrating cells*. Cell Motil Cytoskeleton, 2002. **51**(1): p. 27-38.
183. 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.
184. van Oostrum, J., et al., *Tracing pathway activities with kinase inhibitors and reverse phase protein arrays*. Proteomics Clin Appl, 2009. **3**(4): p. 412-22.
185. Trayner, I.D., et al., *Quantitative multiwell myeloid differentiation assay using dichlorodihydrofluorescein diacetate (H2DCF-DA) or dihydrorhodamine 123 (H2R123)*. J Immunol Methods, 1995. **186**(2): p. 275-84.
186. Milara, J., et al., *Epithelial to mesenchymal transition is increased in patients with COPD and induced by cigarette smoke*. Thorax, 2013.
187. Sohal, S.S., et al., *Reticular basement membrane fragmentation and potential epithelial mesenchymal transition is exaggerated in the airways of smokers with chronic obstructive pulmonary disease*. Respirology, 2010. **15**(6): p. 930-8.
188. Okada, H., et al., *Progressive renal fibrosis in murine polycystic kidney disease: an immunohistochemical observation*. Kidney Int, 2000. **58**(2): p. 587-97.
189. Strutz, F., et al., *Identification and characterization of a fibroblast marker: FSP1*. J Cell Biol, 1995. **130**(2): p. 393-405.
190. Iwano, M., et al., *Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis*. J Clin Invest, 2002. **110**(3): p. 341-50.
191. Wu, Z., et al., *Detection of epithelial to mesenchymal transition in airways of a bleomycin induced pulmonary fibrosis model derived from an alpha-smooth muscle actin-Cre transgenic mouse*. Respir Res, 2007. **8**: p. 1.
192. Harju, T., et al., *Variability in the precursor proteins of collagen I and III in different stages of COPD*. Respir Res, 2010. **11**: p. 165.
193. Olivera, D., et al., *Cytoskeletal modulation and tyrosine phosphorylation of tight junction proteins are associated with mainstream cigarette smoke-induced permeability of airway epithelium*. Exp Toxicol Pathol, 2010. **62**(2): p. 133-43.
194. Rao, R.K., et al., *Tyrosine phosphorylation and dissociation of occludin-ZO-1 and E-cadherin-beta-catenin complexes from the cytoskeleton by oxidative stress*. Biochem J, 2002. **368**(Pt 2): p. 471-81.
195. Finlay, G.A., et al., *Elevated levels of matrix metalloproteinases in bronchoalveolar lavage fluid of emphysematous patients*. Thorax, 1997. **52**(6): p. 502-6.
196. Shih, J.Y. and P.C. Yang, *The EMT regulator slug and lung carcinogenesis*. Carcinogenesis, 2011. **32**(9): p. 1299-304.
197. Dasgupta, P., et al., *Nicotine induces cell proliferation, invasion and epithelial-mesenchymal transition in a variety of human cancer cell lines*. Int J Cancer, 2009. **124**(1): p. 36-45.
198. Wang, R.D., J.L. Wright, and A. Churg, *Transforming growth factor-beta1 drives airway remodeling in cigarette smoke-exposed tracheal explants*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2005. **33**(4): p. 387-93.
199. 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.

Bibliografia

200. Petry, A., M. Weitnauer, and A. Gorch, *Receptor activation of NADPH oxidases*. *Antioxid Redox Signal*, 2010. **13**(4): p. 467-87.
201. Calverley, P.M., et al., *Roflumilast in symptomatic chronic obstructive pulmonary disease: two randomised clinical trials*. *Lancet*, 2009. **374**(9691): p. 685-94.
202. Fabbri, L.M., et al., *Roflumilast in moderate-to-severe chronic obstructive pulmonary disease treated with longacting bronchodilators: two randomised clinical trials*. *Lancet*, 2009. **374**(9691): p. 695-703.
203. Corsico, A., et al., *Small airway morphology and lung function in the transition from normality to chronic airway obstruction*. *J Appl Physiol*, 2003. **95**(1): p. 441-7; discussion 435.
204. Santos, S., et al., *Characterization of pulmonary vascular remodelling in smokers and patients with mild COPD*. *Eur Respir J*, 2002. **19**(4): p. 632-8.
205. Cortijo, J., et al., *Roflumilast, a phosphodiesterase 4 inhibitor, alleviates bleomycin-induced lung injury*. *Br J Pharmacol*, 2009. **156**(3): p. 534-44.
206. 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.
207. Martorana, P.A., et al., *Effect of roflumilast on inflammatory cells in the lungs of cigarette smoke-exposed mice*. *BMC Pulm Med*, 2008. **8**: p. 17.
208. Sabatini, F., et al., *A phosphodiesterase 4 inhibitor, roflumilast N-oxide, inhibits human lung fibroblast functions in vitro*. *Pulm Pharmacol Ther*, 2010. **23**(4): p. 283-91.
209. Nagathihalli, N.S., et al., *Smoking induces epithelial-to-mesenchymal transition in non-small cell lung cancer through HDAC-mediated downregulation of E-cadherin*. *Mol Cancer Ther*, 2012. **11**(11): p. 2362-72.
210. Zou, W., et al., *Nicotine Induced Epithelial-Mesenchymal Transition via Wnt/beta-catenin Signaling in Human Airway Epithelial Cells*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2012.
211. Boudreau, H.E., et al., *Nox4 involvement in TGF-beta and SMAD3-driven induction of the epithelial-to-mesenchymal transition and migration of breast epithelial cells*. *Free Radic Biol Med*, 2012. **53**(7): p. 1489-99.
212. Zhang, A., Z. Dong, and T. Yang, *Prostaglandin D2 inhibits TGF-beta1-induced epithelial-to-mesenchymal transition in MDCK cells*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2006. **291**(6): p. F1332-42.

8. ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ADAM19	<i>Adam metallopeptidase domain 19.</i>
ADN	Ácido desoxiribonucleico.
ADNc	Ácido desoxiribonucleico complementario.
ADP	Adenosin difosfato.
Akt	Protein quinasa B.
ALI	Interfase aire-líquido (<i>Air-liquid interface</i>).
AMPc	Monofosfato de adenosina cíclico.
APO	Apocinina.
α -SMA	α -actina de músculo liso.
ARMC2	<i>Armadillo repeat-containing protein 2.</i>
ARN	Ácido ribonucleico.
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero.
ATP	Trifosfato de adenosina.
A549	Línea de células epiteliales alveolares tipo II.
BB1	<i>CeLyA Blocking Buffer.</i>
B-CAT	β -catenina
BEAS2B	Línea celular inmortalizada de células epiteliales bronquiales humanas.
BEBM	<i>Bronchial Epithelial Basal Medium.</i>
BOLD	<i>Burden of Obstructive Lung Disease.</i>
BSA	Albúmina sérica bovina.
Ca ²⁺	Ión calcio.
CAB1	<i>CeLyA Assay Buffer.</i>
CBF	<i>Ciliary beat frequency.</i>
CCDC38	<i>Coiled-coil domain containing 38.</i>
CDC123	<i>Cell division cycle 123 homolog.</i>
CEBH	Células epiteliales bronquiales humanas.
CEIC	Comité Ético de Investigaciones Clínicas.
CFDP1	<i>Craniofacial development protein.</i>
CHGUV	Consorcio Hospital General Universitario de Valencia.
CHRNA3	<i>Cholinergic receptor, nicotinic, alpha 3.</i>

Índice de abreviaturas

CHRNA5	<i>Cholinergic receptor, nicotinic, alpha 5.</i>
CLB1	<i>CeLya Lysis Buffer.</i>
CO ₂	Dióxido de carbono.
COL tipo I	Colágeno tipo I.
C10orf11	<i>Chromosome 10 open reading frame 11.</i>
Ct	Ciclo umbral.
CTFR	<i>Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator.</i>
CTGF	Factor de crecimiento de tejido conectivo.
CVF	Capacidad vital forzada.
CXCL8	Interleuquina 8.
CXCL1	Quimiocina CXC ligando 1.
dbcAMP	Dibutilil adenosín monofosfato cíclico.
DCF	2',7'-diclorofluoresceína.
DMSO	Dimetilsulfóxido.
EEUU	Estados Unidos
EFG	Factor de crecimiento epidérmico.
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico.
EHT	Extracto de humo de tabaco.
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (<i>Enzyme linked Immuno Sorbent Assay</i>)
EPOC	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica.
ERK1/2	Quinasa regulada por señal extracelular (<i>Extracellular signal regulated kinases</i>).
ERO	Especies reactivas de oxígeno.
FAM13A	<i>Family with sequence similarity 13, member A.</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration.</i>
FITC	Isotiocianato de fluoresceína.
Fosfo-ERK	Proteína ERK fosforilada.
Fosfo-Smad	Proteína Smad fosforilada.
FSP-1	Proteína específica de fibroblasto 1 (también conocida como S100A4).
GAPDH	Gliceraldehído fosfato deshidrogenasa.

GBD	<i>Global Burden of Disease Study.</i>
GOLD	Iniciativa Global para la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (<i>Global Obstructive Lung Disease</i>)
GMCSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos o monocitos (<i>Granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>)
GMPc	Guanosín monofosfato cíclico.
GPR126	<i>Protein-coupled receptor 126.</i>
GSTCD	<i>Glutathione S-transferase, C-terminal domain containing.</i>
GTPasa	Guanosina trifosfatasa.
H ₂ DCF-DA	2',7'-diclorodihidrofluorescein diacetato.
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno.
HDAC4	<i>Histone deacetylase 4.</i>
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazino etanosulfónico.
HHIP	<i>Hedgehog interacting protein.</i>
HRP	Peroxidasa de rábano.
HTR4	<i>HTR4 5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 4, G protein-coupled.</i>
IGF	Factor de crecimiento insulínico.
IgG	Inmunoglobulina G.
IKK-2	Inhibidor del factor nuclear kappa-B quinasa subunidad beta.
IL-1β	Interleuquina-1β.
IL-2	Interleuquina-2.
IL-4	Interleuquina-4.
IL-5	Interleuquina-5.
IL-6	Interleuquina-6.
IL-8	Interleuquina-8.
IL-10	Interleuquina-10.
IL-13	Interleuquina-13.
iPDE4	Inhibidor de fosfodiesterasa 4.
IPF	Fibrosis pulmonar idiopática.
IREB2	<i>Iron-responsive element binding protein 2.</i>

Índice de abreviaturas

KCNE2	<i>Potassium voltage-gated channel, Isk-related family member 2.</i>
KRT5	Citoqueratina 5.
KRT18	Citoqueratina 18.
LDH	Lactato dehidrogenasa.
LPS	Lipopolisacárido.
LRP1	<i>Low density lipoprotein receptor related protein 1.</i>
LTB ₄	Leucotrieno B ₄ .
LTC ₄	Leucotrieno C ₄ .
M	Molar (mol/litro).
MAPK	Protein quinasas activadas por mitógenos.
MCP1	Proteína 1 monoattractante de monocitos.
MMP-1	Metaloproteinasa de matriz -1.
MMP-9	Metaloproteinasa de matriz- 9.
MMP-15	Metaloproteinasa de matriz-15.
MUC5AC	Mucina 5AC.
NAC	N-acetil-L-cisteína.
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato.
NaOH	Hidróxido sódico.
NCR3	<i>Natural cytotoxicity triggering receptor 3.</i>
NE	Elastasa neutrofílica.
NF- κ B	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas.
NHANES III	<i>Third National Health and Nutrition Examination Survey.</i>
NHLBI	<i>National Heart, Lung and Blood Institute</i>
NOX4	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa 4.
OMS	Organización Mundial de la Salud.
PBS	Tampón salino fosfato.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa.
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas.
PET	Polietileno tereftalato.

PDE	Fosfodiesterasa.
PDE4	Fosfodiesterasa 4.
PGE2	Prostaglandina E2.
PI3K	Fosfatidil inositol 3-quinasa.
PK	Proteín quinasa.
PLATINO	Proyecto Latinoamericano de Investigación en Obstrucción Pulmonar.
PPAR	Proliferador de Peroxisoma Activados los Receptores.
RANTES	<i>Regulated on Activation, Normal T cell Expressed and Secreted.</i>
RARB	<i>Retinoic acid receptor beta.</i>
RhoA	Miembro A de la familia de genes homólogos a Ras.
RNO	N-óxido roflumilast.
RT	Retrotranscripción inversa.
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real.
SDS	Dodecilsulfato sódico.
SIS3	Inhibidor específico de Smad3.
Smad3	Proteínas activadas por quinasa en respuesta a TGF- β 1.
SPATA9	<i>Spermatogenesis associated 9.</i>
Tc1	Célula T citotóxicas.
TEER	Resistencia eléctrica transepitelial.
TEM	Transición epithelial-mesenquimal.
TGF- β 1	Factor de crecimiento transformante β 1.
TGF- β 2	Factor de crecimiento transformante β 2.
Th1	<i>Células T helper type 1.</i>
Th17	<i>Células T helper type 17.</i>
THSD4	<i>Thrombospondin, type 1, domain containing 4.</i>
TNF- α	Factor α de necrosis tumoral.
TNS1	<i>Tensin 1.</i>
TRITC	Isotiocianato de tetrametil rodamina.
UFR	Unidades de fluorescencia relativa.
UIP	Neumonía intersticial usual.

Índice de abreviaturas

VEF ₁	Volumen espiratorio forzado en el primer segundo.
ZKSCAN3	Zinc finger with KRAB and SCAN domains 3.
ZO-1	Zonula occludens 1.

9. ANEXO

9.1 DICTAMENES: COMISION DE INVESTIGACIÓN Y COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLINICA CEIC.



Comisión de Investigación



El Dr. Guillermo Sáez Tormo, Presidente de la Comisión de Investigación del Hospital General Universitario de Valencia

INFORMA

Que la Comisión de Investigación de este Centro, tras revisar el Proyecto de investigación titulado "Estudio farmacológico de la actividad antiinflamatoria de inhibidores fosfodiesterasa 4, en células epiteliales de vía aérea humana in vitro, frente al humo del tabaco y/o por virus sincitial respiratorio", cuyo investigador principal es el Dr. Julio Cortijo Gimeno,

CONSIDERA

Que dicho proyecto reúne las condiciones de necesidad, oportunidad y viabilidad de las tareas de investigación propuestas, el plan de recepción e integración del candidato y el valor añadido para este Centro, así como de aplicabilidad al Sistema Nacional de Salud, por lo que

ACUERDA

Informar favorablemente la solicitud para su realización.

Lo que firmo en Valencia, a 23 de enero de 2008

Fdo. Dr. Guillermo Sáez Tormo
Presidente de la Comisión de Investigación

APROBACIÓN PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN

- ANEXO 11 -

viernes, 29 de febrero de 2008

Este CEIC tras evaluar en su reunión de 28 de Febrero de 2008 el Proyecto de Investigación:

Título:	"Estudio farmacológico de la actividad antiinflamatoria de inhibidores fosfodiesterasa 4, en células epiteliales de vía aérea humana in vitro, frente al humo del tabaco y/o infecciones por virus sincitial respiratorio"		
I.P.:	Dr. Julio Cortijo	Servicio/Unidad	Fundación HGUV

Acuerda respecto a esta documentación:

- Que el Proyecto de Investigación y la Hoja de Información al Paciente reúnen las condiciones exigidos por este CEIC, por lo tanto decide su APROBACIÓN.

Los miembros que evaluaron esta documentación:

		Presente
Presidenta	Dr. Severiano Marin	X
Vocales	D. Ernesto Bataller	
	D. Alfredo Rocher	
	D. Alejandro Moner	
	D. Juan David Gomez Gomez	X
	Dr. D. José Manuel Irazo	
	Dr. D. Miguel Armengot	X
	Dr. D. Julio Cortijo	X
	Dra. Dña. Elena Rubio	X
	Dr. D. Gustavo Juan	X
	Dra. Pilar Blasco	X
	Dña. M ^a Teresa Jareño	
	Dra. M ^a José Safont	
	Dr. José Luis Fayos	X
	Dr. Agustín Herrera	
	Dra. Ana Blasco	
	Dr. Antonio Martorell	X
	Dr. Aurelio Quesada	X
	Dr. Guillermo Saez	
	Dr. Fco. Javier Cervera	X

Consorcio Hospital General Universitario de Valencia

Comité Ético de Investigación Clínica

	Dr. José Vte. Roig Vila	X
	Dr. Rafael Poveda	X
	Dr. Elias Ruiz	
	Dr. Alberto Berenguer	
	Dra. Amparo Perez	X
	Dña. Encarna Domingo	X
Secretario	Dra. Ana Mínguez	X

Lo que comunico a efectos oportunos:

Fdo. Dra. Ana Mínguez (Secretaria
CEIC)



9.2 PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS DOCTORAL.

ORIGINAL ARTICLE

Epithelial to mesenchymal transition is increased in patients with COPD and induced by cigarette smoke

Javier Milara,^{1,2,3} Teresa Peiró,^{3,4} Adela Serrano,^{3,4} Julio Cortijo^{1,3,4,5}

► Additional material is published online only. To view please visit the journal online (<http://dx.doi.org/10.1136/thoraxjnl-2012-201761>).

¹Clinical research Unit (UIC), University General Hospital Consortium, Valencia, Spain

²Department of Biotechnology, Universidad Politécnica de Valencia, Spain

³Research Foundation, General Hospital of Valencia, Valencia, Spain

⁴Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, University of Valencia, Valencia, Spain

⁵CIBERES, Health Institute Carlos III, Valencia, Spain

Correspondence to

Dr Javier Milara, Unidad de Investigación, Consorcio Hospital General Universitario, Avenida Tres Cruces s/n, Valencia E-46014, Spain; xmilara@hotmail.com

JM and TP contributed equally.

Received 14 February 2012

Revised 6 December 2012

Accepted 17 December 2012

ABSTRACT

Background Cigarette smoking contributes to lung remodelling in chronic obstructive pulmonary disease (COPD). As part of remodelling, peribronchiolar fibrosis is observed in the small airways of patients with COPD and contributes to airway obstruction. Epithelial to mesenchymal transition (EMT) appears to be involved in the formation of peribronchiolar fibrosis. This study examines the EMT process in human bronchial epithelial cells (HBECS) from non-smokers, smokers and patients with COPD as well as the in vitro effect of cigarette smoke extract (CSE) on EMT.

Methods HBECS from non-smokers (n=5), smokers (n=12) and patients with COPD (n=15) were collected to measure the mesenchymal markers α -smooth muscle actin, vimentin and collagen type I and the epithelial markers E-cadherin, ZO-1 and cytokeratin 5 and 18 by real time-PCR and protein array. In vitro differentiated bronchial epithelial cells were stimulated with CSE.

Results Mesenchymal markers were upregulated in HBECS of smokers and patients with COPD compared with non-smokers. In contrast, epithelial cell markers were downregulated. In vitro differentiated HBECS underwent EMT after 72 h of CSE exposure through the activation of intracellular reactive oxygen species, the release and autocrine action of transforming growth factor β_1 , the phosphorylation of ERK1/2 and Smad3 and by the downregulation of cyclic monophosphate.

Conclusions The EMT process is present in bronchial epithelial cells of the small bronchi of smokers and patients with COPD and is activated by cigarette smoke in vitro.

INTRODUCTION

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is characterised by airflow limitation that is progressive and not fully reversible. Cigarette smoking is considered the main risk factor for COPD and contributes to structural changes in the airways during COPD progression.¹ Bronchial epithelial cells are the first anatomical barrier exposed to noxious particles of cigarette smoke and are involved in the initiation of airway remodelling through the release of several proinflammatory mediators, goblet cell hyperplasia and mucus hypersecretion.² Other features that characterise COPD lung remodelling are the progressive loss of the alveolar wall, vascular remodelling with pulmonary hypertension and peribronchiolar fibrosis. As part of the fibrotic alterations in COPD, structural changes are observed primarily in the small airways (<2 mm in diameter), and the severity of the disease appears

Key messages**What is the key question?**

► Are the bronchial epithelial cells from smokers and patients with COPD undergoing epithelial to mesenchymal transition (EMT)? Is cigarette smoke involved in bronchial EMT?

What is the bottom line?

► Phenotypic markers of EMT are observed in bronchial epithelial cells of small bronchi from smokers and patients with COPD. Cigarette smoke induces EMT in differentiated bronchial epithelial cells via release and autocrine action of TGF- β_1 as well as by enhancing oxidative stress. These results suggest that EMT could participate in the COPD remodelling process of small bronchi such as peribronchiolar fibrosis.

Why read on?

► The EMT process is activated in the small bronchi of smokers and patients with COPD as part of the chronic lung remodelling process. Cigarette smoke directly increases mesenchymal transition in differentiated human bronchial epithelial cells.

to be determined by thickening of the wall of the small airways caused by fibrosis and infiltration of inflammatory cells.³ However, the exact factor responsible for producing the remodelled matrix as well as the role of activated epithelium in the remodelling process and in fibroblast activation/differentiation into myofibroblasts in small airway fibrosis in COPD is unclear.

It has been established that myofibroblast accumulation may occur as a consequence of resident fibroblast to myofibroblast transition, airway smooth muscle to myofibroblast transition, epithelial to mesenchymal transition (EMT) or by the recruitment of circulating fibroblastic stem cells (fibrocytes).⁴ Depending on the precise physiological context, EMT can be induced either by environmental stresses/factors such as hypoxia⁵ and reactive oxygen species (ROS)⁶ or by extracellular mediators including transforming growth factor β_1 (TGF- β_1), fibroblast growth factor 2, connective tissue growth factor and insulin-like growth factor 2.⁷ Among these, TGF- β_1 , a multifunctional cytokine, has been shown to mediate EMT in vitro in several different cell lines including alveolar and bronchial epithelial cells and recently in

To cite: Milara J, Peiró T, Serrano A, et al. *Thorax* Published Online First: [please include Day Month year] doi:10.1136/thoraxjnl-2012-201761

Chronic obstructive pulmonary disease

pseudostratified bronchial epithelial cells.⁸ In vivo evidence for TGF- β ₁-mediated EMT has also been reported, confirming the master regulation role of TGF- β ₁.⁹

In epithelial cells, TGF- β ₁-induced EMT is mediated by several downstream factors such as ROS generation, activation of mitogen-activated protein kinase and Smad signalling. Thus, antioxidant treatments⁶ and other treatments directed at attenuating intracellular ROS, such as the increase in intracellular adenosine 3',5'-cyclic monophosphate (cAMP),¹⁰ effectively inhibit TGF- β ₁-induced EMT.

It has recently been shown that cigarette smoke may induce EMT in the alveolar type II cell line A549¹¹ and the bronchial epithelial cell line BEAS2B,¹² but the effect of cigarette smoke on primary human bronchial epithelial cell (HBEC) to mesenchymal transition is currently poorly understood. In addition, evidence for EMT in the large airways of smokers and patients with COPD has been suggested by Sohal and colleagues, since cells included in the reticular basement membrane of large airways showed EMT markers.¹³ However, whether EMT is present in the small airways of smokers and patients with COPD and whether cigarette smoke directly induces EMT in differentiated HBECs remains to be elucidated.

Using primary HBECs from small human bronchi of non-smokers, smokers and patients with COPD, we studied typical mesenchymal and epithelial cell markers of the EMT process. Furthermore, we determined whether cigarette smoke may induce EMT in differentiated air-liquid interface cultures as well as the potential signalling mechanisms involved.

METHODS

A more detailed version of the methods is given in the online supplement.

Patients

Human lung tissue from non-smokers (n=5), smokers (n=12) and patients with COPD (n=15) was obtained from patients undergoing surgery for lung carcinoma who gave informed consent, as previously described.¹⁴ Inclusion and exclusion criteria are defined in the online supplement.

Isolation of primary bronchial epithelial cells

Primary HBECs were isolated and cultured from small pieces of human bronchi (0.5–1 mm internal diameter) as previously

outlined¹⁵ and cultured for 1 week to analyse mRNA and protein expression (see online supplement for details).

Immunohistochemistry and immunofluorescence

Immunohistochemical analysis of α -smooth muscle actin (α -SMA), collagen type I, vimentin, NOX4, E-cadherin and ZO-1 was performed in human pulmonary tissue using mouse anti-human α -SMA (catalogue no A5228; Sigma), rabbit anti-human collagen type I antibody (catalogue no PA1-26204; Affinity Bioreagents), mouse anti-human vimentin (catalogue no V6389; Sigma), NOX4 (catalogue no NB110-58849; Novus Biologicals), mouse anti-human E-cadherin (catalogue no CM1681; ECM BioScience) and rabbit anti-human ZO-1 (catalogue no ab59720; Abcam). The scores of the staining intensity (0–3) and the percentage of immunoreactive cells (1–4 where 1 represents 0–25% cells positive, 2 represents 26–50% positive, 3 represents 51–75% positive and 4 represents 76–100% positive) were then multiplied to obtain a composite score ranging from 0 to 12. Secondary antibody anti-rabbit/mouse rhodamine/FITC was used for immunofluorescence analysis of primary bronchial epithelial cells. To detect F-actin distribution, phalloidin-tetramethylrhodamine isothiocyanate was employed (see online supplement for full details).

Culture of air-liquid interface bronchial epithelial cells

Differentiated HBECs for in vitro experiments were obtained from non-smoker patients and cultured in air-liquid interface until pseudostratified bronchial epithelium was obtained.¹⁵ Details are described in the online supplement.

Preparation of cigarette smoke extract and transepithelial electrical resistance assay

Cigarette smoke extracts (CSE) were obtained as previously outlined¹⁶ using a research cigarette (2R4F; Tobacco Health Research, University of Kentucky, Kentucky, USA). Transepithelial electrical resistance (TEER) was assayed using a millicell ERS-2 epithelial volt-ohm meter. Details of the TEER assay and the method of obtaining CSE, in vitro stimulation conditions as well as drug incubations are described in the online supplement.

Real-time PCR

Real-time PCR was performed as previously described.¹⁷ Relative quantification of different transcripts was determined by the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method using glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) as an endogenous control and with normalisation to the non-smoker group or control group as appropriate (see online supplement for further details).

Protein array and western blot analysis

Protein expression in lung tissue samples from non-smokers, smokers and patients with COPD was analysed with Zeptosens (Division of Bayer (Schweiz), Switzerland) protein array technology as previously outlined.¹⁴ Western blot analysis was used to analyse β -catenin expression in the nucleus and cytoplasm (see online supplement for further details).

DCF fluorescence measurement of reactive oxygen species

2',7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate (H₂DCF-DA, Molecular Probes, Nottingham, UK) was used to monitor the intracellular ROS in differentiated HBECs as previously described¹⁴ (see online supplement for details).

Table 1 Clinical features of patients

	Non-smokers (n=5)	Smokers (n=12)	COPD (n=15)
Sex (female/male)	4/1	2/10	3/12
Age (years)	64 (56–72)	63 (52–76)	65 (54–74)
Tobacco consumption, pack-years	0	40 (33–46)	36 (28–43)
FEV ₁ , % predicted	102 (97–108)	91 (90–100)	71 (55–79)
FVC, % predicted	104 (93–108)	96 (92–106)	94(91–101)
FEV ₁ /FVC %	95 (91–101)	85 (77–91)	63 (54–68)
PaO ₂ , mm Hg	89 (85–93)	85 (81–90)	80 (78–83)
Paco ₂ , mm Hg	38 (36–41)	37 (35–40)	40 (38–42)

Data are shown as median (IQR).

Pack-year=1 year smoking 20 cigarettes per day.

COPD, chronic obstructive pulmonary disease; FEV₁, forced expiratory volume in 1 s;

FVC, forced vital capacity; PaO₂, oxygen tension in arterial blood; Paco₂, carbon dioxide tension in arterial blood; % pred, % predicted.

Enzyme-linked immunosorbent assays for TGF- β 1, cAMP and MMP-9

Analyses of active TGF- β 1 and intracellular cAMP were performed using a Quantikine Human TGF- β 1 Immunoassay (R&D Systems, Madrid, Spain) and cAMP Biotrak enzyme immunoassay system (Amersham, London, UK) according to the manufacturers' instructions. Matrix metalloproteinase (MMP)-9 was determined using an assay kit for MMP-9 (R&D Systems, Nottingham, UK) according to the manufacturer's protocol (see online supplement for further details).

Statistics

Statistical analysis of results was carried out by parametric or non-parametric analysis as appropriate. Data from non-parametric analysis were expressed as median, IQR and minimum and maximum values. The Mann-Whitney U test or Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post hoc test for multiple comparisons were used to compare mesenchymal and epithelial data from non-smokers, smokers and patients with COPD. Data from parametric analysis were expressed as mean (SE). Analysis of data from the in vitro mechanistic experiments in differentiated HBECs from non-smoker patients was performed by the Student t test or one-way or two-way analysis of variance followed by the Bonferroni post hoc test. Significance

was accepted when $p < 0.05$. Full details are given in the online supplement.

RESULTS

EMT cell markers are increased in primary bronchial epithelial cells from smokers and patients with COPD

Primary HBECs were isolated from small bronchi of non-smokers, smokers and patients with COPD from uninvolved lung tissue during lobectomy/wedge resection for malignant lesions. The clinical characteristics of the patients are shown in table 1.

Under basal conditions, primary HBECs from smokers and patients with COPD showed a significant increase in mRNA and protein expression of typical mesenchymal markers α -SMA, vimentin and collagen type I (figure 1A-C). As with the mesenchymal markers, NOX4 mRNA and protein expression were also significantly upregulated in primary HBECs from smokers and patients with COPD (figure 1D). The analysis of epithelial markers revealed a significant downregulation of E-cadherin, ZO-1, KRT5 and KRT18 mRNA in patients with COPD but not in smokers, and a decrease in E-cadherin and ZO-1 protein expression in smokers and patients with COPD (figure 1E-H). In smokers and patients with COPD, phosphorylation of ERK1/2 was significantly increased, but an increase in Smad3 phosphorylation was only observed in cells from patients with

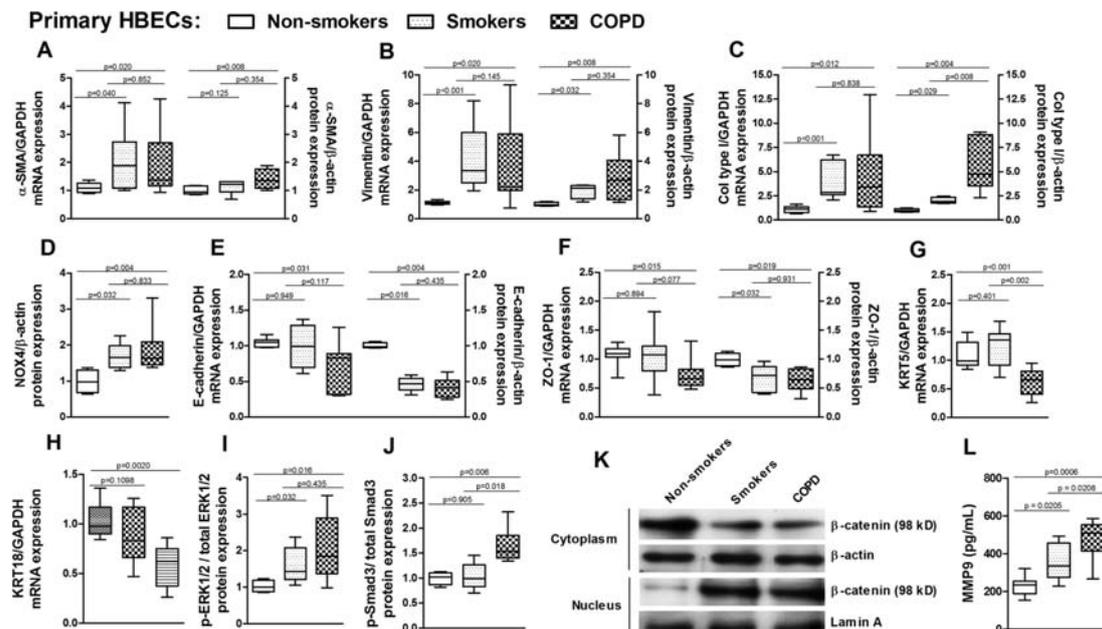


Figure 1 Expression of epithelial and mesenchymal markers in primary human bronchial epithelial cells (HBECs) from non-smokers, smokers and patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). Primary HBECs were isolated from small bronchi of non-smokers (n=5), smokers (n=12) and patients with COPD (n=15) and total RNA and protein were obtained as described in the Methods section. mRNA and protein expression was determined by real-time PCR and protein array Zeptosens technology, respectively, with appropriate primers and specific antibodies. Basal expression of mRNA transcripts or protein of the mesenchymal markers (A) α smooth muscle actin, (B) vimentin, (C) collagen type I (Col type I) or (D) NOX4, as well as basal expression of the epithelial markers (E) E-cadherin, (F) ZO-1, (G) KRT5 or (H) KRT18 are shown. (I, J) Basal protein expression of phospho-Smad3 and phospho-ERK1/2. Data are expressed as the ratio to GAPDH for mRNA levels and to β -actin for protein levels and normalised to the non-smoker group. Phospho-Smad3 and phospho-ERK1/2 protein levels were expressed as the ratio to total ERK1/2 and Smad3, respectively, and normalised to the non-smoker group. (K) Representative images of western blot for cytoplasm and nuclear β -catenin with corresponding internal controls β -actin and lamin A. (L) Levels of matrix metalloproteinase (MMP)-9 were quantified by ELISA in primary culture cells following 24 h of cultures. Data are presented as box and whisker plots with median, IQR and minimum and maximum values. p exact values were obtained by the Kruskal-Wallis test and Dunn's post hoc test.

Chronic obstructive pulmonary disease

COPD (figure 1I,J). The transcription factor β -catenin was downregulated in the cytoplasm and upregulated in the nucleus of epithelial cells from smokers and patients with COPD (figure 1K). Furthermore, basal cell supernatants of 24 h cell cultures of patients with COPD showed higher MMP-9 release than those of non-smokers and smokers (figure 1L).

Phase contrast images showed that cells from smokers and patients with COPD had approximately 25% of cells with a spindle-shaped appearance characteristic of mesenchymal cells (figure 2). Expression of the tight junction (TJ) proteins E-cadherin and ZO-1 was visualised by immunofluorescence as a continuous line of fluorescence around the margin of the cells, and F-actin fibres were distributed at the margins of cells, between cell contacts in the non-smoker group. In contrast, cells from smokers and patients with COPD showed a reduction in E-cadherin and ZO-1 fluorescence intensity with sporadic and diffused expression. F-actin in cells from smokers and patients with COPD was homogeneously distributed as fibres in the cytoplasm. The mesenchymal markers collagen type I and vimentin were found to be upregulated in cells from smokers and patients with COPD and almost absent in cells from non-smokers (figure 2). The epithelial marker KRT5 was positively expressed in all HBECs from non-smokers, smokers and patients with COPD, although the intensity was lower in primary cultures from smokers and patients with COPD. Furthermore, positive KRT5 cells in smokers and patients with COPD were also positive for mesenchymal collagen I and vimentin positive cells (figure 2).

Immunohistochemical analysis of small airways revealed that α -SMA was immunostained in the submucosa of bronchi but not in bronchial epithelial cells from non-smokers (figure 3A, panel A). However, in both smokers and patients with COPD, α -SMA was markedly immunostained with a peribronchiolar location. Furthermore, α -SMA immunostaining was observed within the bronchial epithelium (figure 3A, panels F and K, black arrows). Vimentin immunostaining was absent in bronchial epithelial cells from non-smoker patients (figure 3A, panel B) but, in both smokers and patients with COPD, vimentin was located in basal epithelial cells (figure 3A, panels G and L). Collagen type I was increased in airway sections from smokers and patients with COPD, which correlates with the extracellular

matrix deposition found in peribronchiolar fibrosis.³ NOX4 was weakly expressed in small lung sections from non-smokers, differing from smokers and patients with COPD who expressed NOX4 on bronchial epithelial cells as well as in bronchial infiltrated leucocytes (figure 3A, panels I and N). Epithelial ZO-1 and E-cadherin were markedly expressed in the bronchial epithelium of non-smokers (figure 3B, panels A and B), with lower expression in the bronchial epithelium of smokers and patients with COPD (figure 3B, panels D–H). Composite scores of immunohistochemistry showed higher values for α -SMA, vimentin, collagen type I and NOX4 in bronchial epithelial cells of smokers and patients with COPD compared with non-smoker patients and lower values for E-cadherin and ZO-1 (figure 3C).

EMT is induced by CSE in differentiated HBECs

To explore whether cigarette smoke may directly induce EMT in bronchial epithelial cells, we used an in vitro model of differentiated HBECs from non-smoker patients. CSE dose-dependently increased mesenchymal markers α -SMA and collagen type I, reaching a peak value at a concentration of 2.5% following 72 h of exposure (figure 4A; $p < 0.05$). We therefore selected these time and concentration conditions of CSE to evaluate EMT markers in future experiments. In this respect, CSE at a concentration of 2.5% significantly increased mRNA transcripts and protein expression for the mesenchymal markers α -SMA, vimentin and collagen type I (figure 4B,C) while the epithelial markers E-cadherin, ZO-1, KRT5 and KRT18 were significantly downregulated (figure 4D,E). According to the loss of expression of TJ proteins, CSE (0.5–5%) dose-dependently decreased TEER (figure 4F) as a marker of loss of epithelial cell barrier. Furthermore, differentiated HBECs exposed to CSE adopted a flattened and elongated morphology characteristic of a myofibroblast-like phenotype. CSE-induced EMT markers were sustained for almost 7 days after the washout of CSE, which reflects the irreversibility of the EMT process (see figure C in online supplement).

CSE-induced EMT is partially mediated by the increase of ROS and downregulation of cAMP

Preincubation of differentiated HBECs with the antioxidants N-acetyl-L-cysteine (NAC) and apocynin (APO) inhibited the increase of α -SMA, vimentin and collagen type I mRNA and

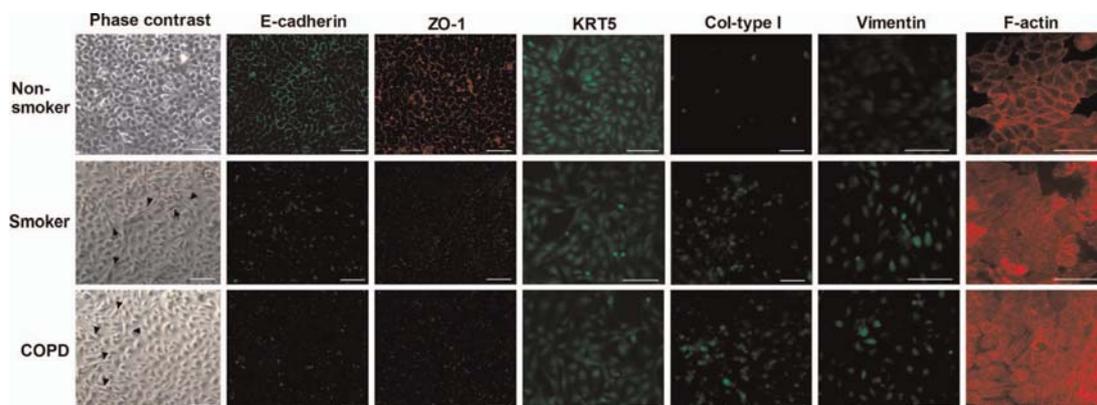


Figure 2 Small bronchial pieces from non-smokers (n=5), smokers (n=6) and patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) (n=6) were placed on culture plates and bronchial epithelial cells grew around the explants. When the cells reached around 100% of confluence, phase contrast images and immunofluorescence staining of E-cadherin, ZO-1, KRT5 collagen type I (Col-type I) and vimentin were taken. F-actin fluorescent images were analysed with phalloidin-tetramethylrhodamine isothiocyanate. Representative images are shown (scale bar 20 μ m). Black arrows show epithelial cells with spindle-shaped appearance.

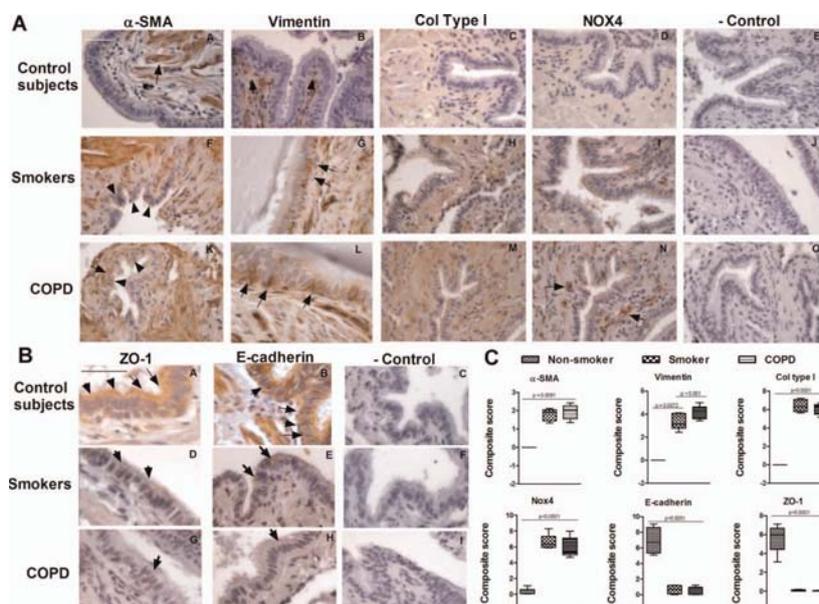


Figure 3 Immunohistochemistry of small airways. Small bronchial sections from non-smokers (n=4), smokers (n=10) and patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) (n=10) were immunostained for (A) α smooth muscle actin (α -SMA), vimentin, collagen type I (Col type I), NOX4 (brown) and (B) epithelial ZO-1 and E-cadherin markers (brown). Black arrows show the main distribution of the positive immunostaining regions of the small bronchi. Representative immunohistochemistry images are shown (scale bar 45 μ m). The control IgG isotype always gave a negative signal. (C) Box plot representing the composite score of α -SMA, vimentin, Col type I, NOX4, ZO-1 and E-cadherin markers across the bronchial epithelium in 10 slices per patient. Data are presented as box and whisker plots with median, IQR and minimum and maximum values. p exact values were obtained by the Kruskal–Wallis test and Dunn's post hoc test.

protein expression as well as the downregulation of the epithelial markers E-cadherin, ZO-1, KRT5 and KRT18 induced by CSE (figure 5A–D). As observed for the antioxidants, the analogue of cAMP (dbcAMP) significantly inhibited the increase in mRNA and protein expression of the mesenchymal markers α -SMA, vimentin and collagen type I as well as the downregulation of the epithelial markers E-cadherin, ZO-1, KRT5 and KRT18 following CSE exposure (figure 5A–D). Phase contrast microscopic analysis of the differentiated HBEC culture surface and analysis of H&E-stained slide sections of multilayered HBECs showed that the cells underwent a morphological change from a cobblestone-like cell morphology to an elongated and spindle-like morphology, and reduced their cell–cell contact secondary to CSE exposure (figure 5E).

Interestingly, CSE 2.5% significantly decreased the intracellular cAMP content after 72 h, which was significantly inhibited by the antioxidants NAC and APO and the positive control dbcAMP (figure 6A), suggesting a role for ROS in cAMP downregulation. In this context, CSE 2.5% increased intracellular ROS after 30 min of exposure (figure 6B,C) and sustained this increase for the 72 h period (data not shown). The increase in ROS was accompanied by an increase in mRNA and protein expression of the nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase unit NOX4 after 72 h of exposure (figures 6D,E). Both ROS production and NOX4 expression induced by CSE were inhibited by dbcAMP, NAC and APO in differentiated HBECs (figure 6B–E).

TGF- β_1 , ERK1/2 and Smad3 mediate CSE-induced EMT in differentiated HBECs

Stimulation with CSE 2.5% for 72 h significantly increased by approximately 2.5-fold the release of the active form of TGF- β_1

(figure 7A). Preincubation of differentiated HBECs with dbcAMP, NAC or APO completely suppressed the release of TGF- β_1 (figure 7A), suggesting a role for ROS and cAMP in mediating CSE-induced TGF- β_1 release. In other experiments, CSE 2.5% stimulation increased the phosphorylation of ERK1/2 and Smad3 which was significantly inhibited by anti-TGF- β_1 antibody (mAb-TGF- β_1) (figure 7B,C) suggesting an autocrine role for TGF- β_1 . In parallel, preincubation of differentiated HBECs with dbcAMP, NAC or APO also inhibited CSE-induced ERK1/2 and Smad3 phosphorylation.

Finally, to analyse the autocrine effect of TGF- β_1 and its downstream pathways ERK1/2 and Smad3 in the CSE-induced EMT process, we preincubated cells with mAb-TGF- β_1 , the ERK1/2 antagonist PD98058 or with the Smad3 inhibitor SIS3. All of them nearly suppressed CSE-induced upregulation of the mesenchymal markers α -SMA, vimentin and collagen type I (figure 8A), as well as downregulation of the epithelial markers E-cadherin and ZO-1 (figure 8B).

DISCUSSION

The main and novel results of the present study are that (1) primary HBECs of small bronchi from smokers and patients with COPD show an increase in the typical EMT expression profile and (2) in vitro stimulation of differentiated HBECs with CSE promotes EMT through the activation of intracellular ROS, the release of TGF- β_1 , the phosphorylation of ERK1/2 and Smad3 as well as by the downregulation of cAMP. These new findings suggest that EMT may be induced directly by cigarette smoke, and that EMT is present in the small bronchi of smokers and patients with COPD, which may potentially

Chronic obstructive pulmonary disease

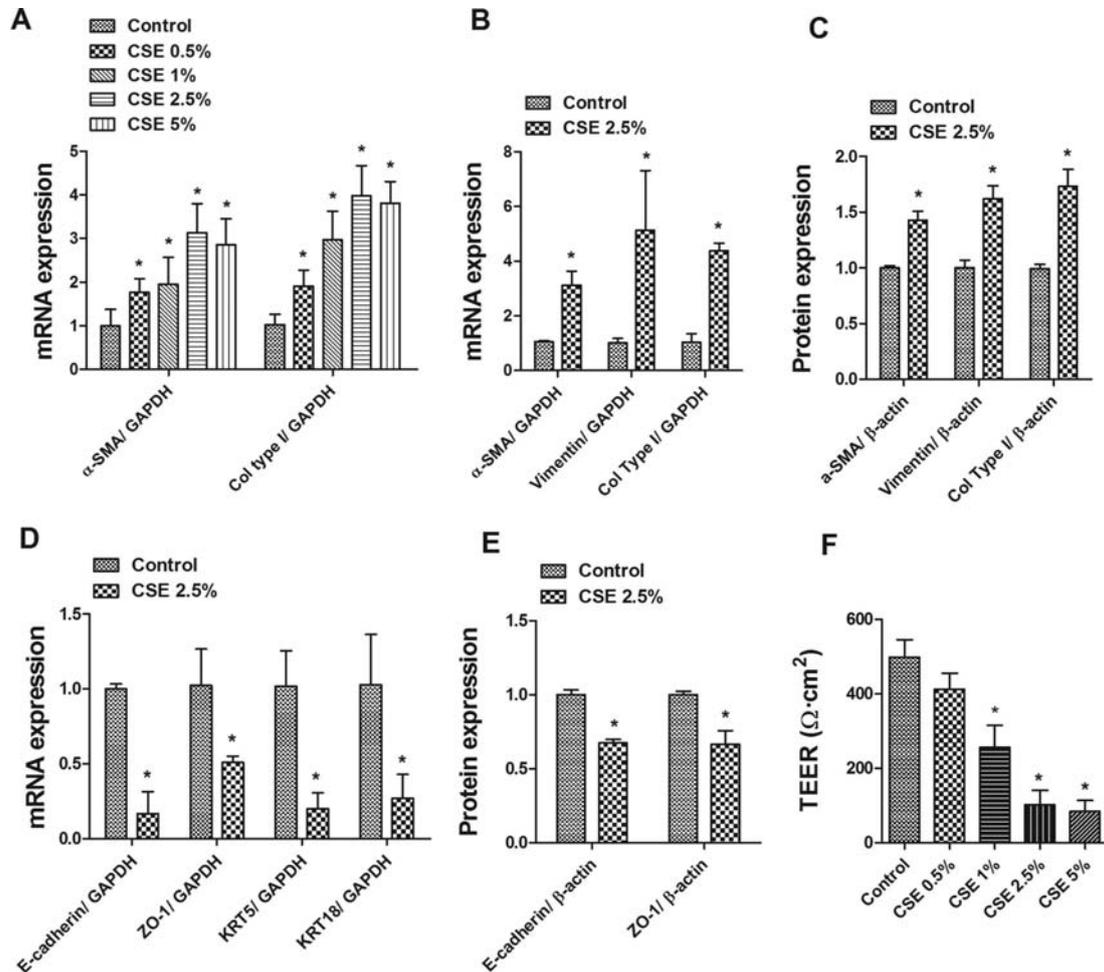


Figure 4 Cigarette smoke extract (CSE) induces epithelial to mesenchymal transition in differentiated human bronchial epithelial cells (HBECs). Differentiated HBECs were treated with 0.5–5% CSE or vehicle for 72 h and total RNA or cell lysates were obtained for real-time PCR (A, B, D) or protein array Zeptosens (C, E). CSE induced (A, B) mRNA transcripts and (C) protein expression of mesenchymal markers α smooth muscle actin, vimentin and collagen type I (Col type I). CSE significantly reduced (D) mRNA transcripts and (E) protein expression of epithelial markers E-cadherin, ZO-1, KRT5 and KRT18. Data are expressed as the ratio to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) for mRNA levels and to β -actin for protein levels and normalised to the solvent control group. (F) Development of transepithelial electrical resistance (TEER) in differentiated HBECs. TEER was measured after 72 h of CSE (0.5–5%) exposure. Results are expressed as mean (SE) of four independent experiments (one cell non-smoker population) per condition. Data analysed by one-way ANOVA followed by post hoc Bonferroni test (A) or Student t test (B–E). * $p < 0.05$ vs solvent controls.

contribute to the thickening of the wall of the small airways caused by fibrosis.

In the airways EMT has been implicated in several lung fibrotic disorders.¹⁴ However, the hypothesis that lung bronchial fibroblasts may originate directly from HBECs as a result of EMT remains to be elucidated. In this respect, recently investigated in vivo biopsy specimens and ex vivo primary HBEC cultures from lung allograft recipients showed evidence of EMT.¹⁸ In addition, Hackett and colleagues observed EMT in differentiated HBECs in response to TGF- β_1 .⁸ However, there is little knowledge regarding the potential for EMT to occur in COPD. In this regard, Sohal and colleagues recently observed that large airway biopsies from smokers and patients with COPD potentially undergo EMT.^{13–19} However, the findings provided by

these studies were limited since the mesenchymal markers analysed (MMP-9, vimentin and S100A4) are also expressed in other cell types such as leucocytes and endothelial cells.^{20–21} Furthermore, Sohal and colleagues studied EMT in large airways. Since bronchial remodelling in COPD, such as peribronchiolar fibrosis, is mainly located in small conducting airways (bronchioles < 2 mm in diameter), and considering that large and small airways differ in their anatomical and pathophysiological characteristics,²² previous findings need to be corroborated in small bronchi. In the present study we analysed the expression of mesenchymal markers broadly referenced in EMT studies such as the cytoskeleton proteins α -SMA and vimentin as well as the extracellular matrix protein collagen type I,⁷ being α -SMA and collagen type I-specific for the fibroblast/

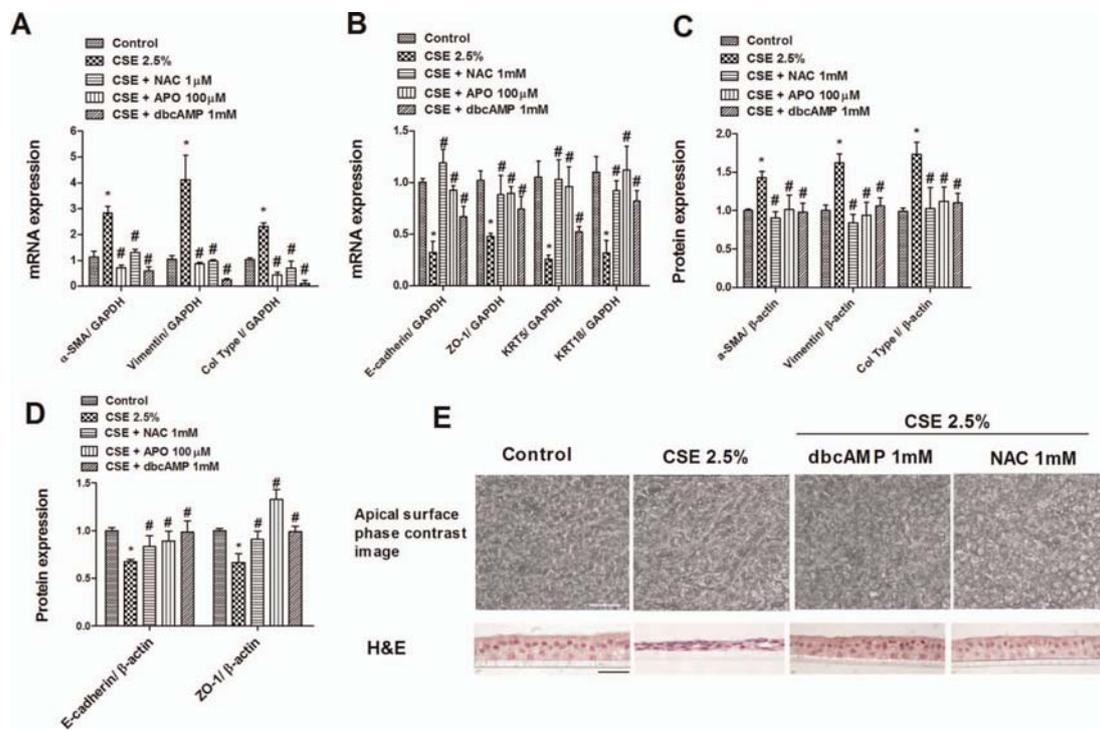


Figure 5 Cigarette smoke extract (CSE)-induced epithelial to mesenchymal transition is partially mediated by intracellular reactive oxygen species and inhibited by adenosine cyclic monophosphate (cAMP). Differentiated human bronchial epithelial cells (HBECs) were incubated with the antioxidants N-acetyl-L-cysteine (NAC; 1 mM) or apocynin (APO; 100 μM), or with the cAMP analogue dibutyryl cAMP (dbcAMP; 1 mM) for 30 min before CSE (2.5%) stimulation for 72 h. (A, B) Total RNA and (C, D) protein were isolated for real-time PCR and protein array Zeptosens analysis, respectively. CSE-induced upregulation of (A) mRNA and (C) protein expression of mesenchymal markers α smooth muscle actin, vimentin and collagen type I (Col type I) was inhibited by NAC, APO and dbcAMP. CSE-induced downregulation of (B) mRNA and (D) protein expression of epithelial markers E-cadherin, ZO-1, KRT5 and KRT18 was inhibited by NAC, APO and dbcAMP. Data are expressed as the ratio to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) for mRNA levels and to β -actin for protein levels and normalised to the solvent control group. Results are expressed as mean (SE) of n=4 (four cell non-smoker population) experiments per condition. Data analysed by two-way ANOVA followed by post hoc Bonferroni tests. * $p < 0.05$ vs solvent controls; # $p < 0.05$ vs CSE. (E) Morphological changes in differentiated HBECs after 72 h of exposure to 2.5% CSE showed a mesenchymal morphology with reduced cell-cell contact as assessed by phase contrast light microscopy (apical surface) and H&E section histology. Morphological changes were inhibited by NAC and dbcAMP. Representative images are shown (scale bar 40 μm).

myofibroblast phenotype.^{7 23} Since EMT is characterised by the loss of epithelial cobblestone or cuboidal morphology and a marked reduction in epithelial E-cadherin, ZO-1 and cytokeratin expression, we also analysed the loss of expression of these epithelial markers as indicators of the EMT process. In this regard, positive KRT5 cells in cells from smokers and patients with COPD were also positive for mesenchymal collagen I and vimentin positive cells (figure 2). During the process of EMT some epithelial and mesenchymal cell markers are known to be co-expressed within individual cells,²⁴ which might explain why we have observed positive cells for both markers in HBECs from smokers and patients with COPD.

To our knowledge, this is the first report showing α -SMA in basal epithelial cells as a marker of human myofibroblasts in the small bronchi of smokers and patients with COPD. In this respect, recent work in a model of α -SMA-Cre/R26R mice of bleomycin-induced pulmonary fibrosis also showed upregulation of α -SMA in basal bronchial epithelial cells, supporting an in vivo EMT process in the bronchial epithelium.²⁵ Vimentin was also immunostained in basal epithelial cells from smokers and patients with COPD, as previously observed in large airways,²⁶

and the expression of collagen type I was also upregulated in small bronchi of smokers and patients with COPD.

The epithelial markers E-cadherin and ZO-1 proteins were found to be downregulated in primary HBECs and the epithelium of small bronchi from smokers and patients with COPD. However, E-cadherin and ZO-1 mRNA expression was not decreased in smokers. These contradictory findings may be explained by E-cadherin and ZO-1 mRNA and protein expression being regulated at different levels. Thus, cell membrane E-cadherin and ZO-1 proteins as part of TJs between epithelial cells are degraded by different metalloproteinases released by the effect of oxidant agents such as cigarette smoke. In fact, it has been observed previously that ZO-1 is one means by which occludin is anchored to the cytoskeleton to maintain TJ. In the presence of oxidative stress, ZO-1:occludin association and E-cadherin is decreased and causes the diffuse cytoplasmic redistribution and degradation by metalloproteinases^{27 28} excluding transcriptional mechanisms. Another independent system is governed by transcriptional mechanisms in which the effect of some remodelling factors such as TGF- β ₁ may reduce mRNA transcription of ZO-1 and E-cadherin.²⁹ The differences

Chronic obstructive pulmonary disease

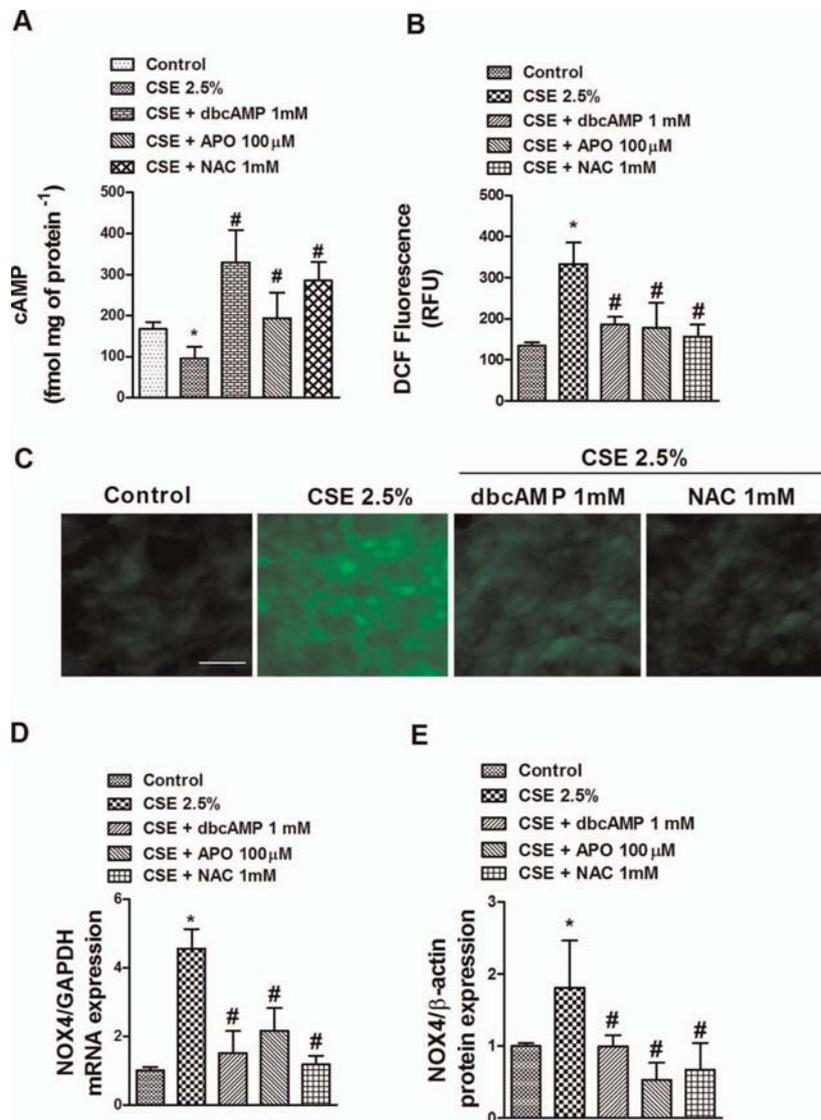


Figure 6 Cigarette smoke extract (CSE) reduces adenosine cyclic monophosphate (cAMP) intracellular levels and increases reactive oxygen species (ROS) and NOX4 expression in differentiated human bronchial epithelial cells (HBECS). Differentiated HBECS were incubated with the antioxidants N-acetyl-L-cysteine (NAC; 1 mM) or apocynin (APO; 100 µM), or with the cAMP analogue dibutyryl cAMP (dbcAMP; 1 mM) for 30 min before CSE (2.5%) stimulation for 72 h (A, D, E) or 30 min (B, C). (A) CSE-induced loss of intracellular cAMP was inhibited by NAC, APO and positive control dbcAMP. (B) ROS were determined by means of DCF fluorescence intensity after CSE stimulation in the presence or absence of NAC, APO or dbcAMP. (C) Representative images of positive DCF fluorescence in differentiated HBECS (scale bar 20 µm). (D, E) CSE induced mRNA and protein expression of NOX4 which were significantly inhibited by dbcAMP, APO and NAC (D, E). Data are expressed as the ratio to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) for mRNA levels and to β-actin for protein levels and normalised to the solvent control group. Results are expressed as means (SE) of n=4 (four cell non-smoker population) experiments per condition. Data analysed by two-way ANOVA followed by post hoc Bonferroni tests. *p<0.05 vs solvent controls; #p<0.05 vs CSE. RFU, relative fluorescence units.

between mRNA and protein expression of ZO-1 and E-cadherin observed between smokers and patients with COPD could therefore be due to a predominant role of protein degradation in bronchial epithelial cells from patients with COPD because of a high level of metalloproteinase expression in their lung tissues.³⁰ Accordingly, we found higher basal levels of MMP-9 in cells from patients with COPD than in smokers.

Despite the novelty of our results, some limitations should be highlighted. In particular, both the primary cell culture and lung tissue analysed could be criticised. The loss of cell phenotype in prolonged culture is well described and could modify the results in primary HBECS. However, our primary ex vivo cell culture experiments were performed in HBECS that were grown around the explants of small bronchi until they reached approximately

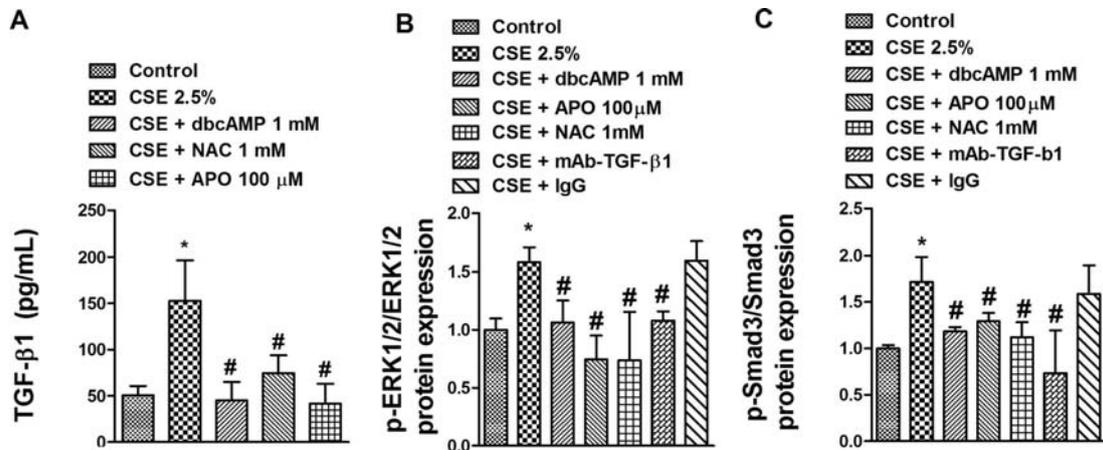


Figure 7 Cigarette smoke extract (CSE) increases secretion of transforming growth factor β_1 (TGF- β_1) and phosphorylation of ERK1/2 and Smad3 in differentiated human bronchial epithelial cells (HBECS). Differentiated HBECS were incubated with the antioxidants N-acetyl-L-cysteine (NAC; 1 mM) or apocynin (APO; 100 μ M), or with the cyclic monophosphate (cAMP) analogue dibutyryl cAMP (dbcAMP; 1 mM) for 30 min before CSE (2.5%) stimulation for 72 h. In panels B and C an anti-TGF- β_1 antibody (mAb-TGF- β_1 ; 4 μ g/ml) and its negative control non-immune IgG were added for 30 min before CSE 2.5% stimulation for 72 h. Cell culture supernatant and protein content were extracted to quantify (A) TGF- β_1 release, (B) ERK1/2 phosphorylation and (C) Smad3 phosphorylation. (B, C) Phospho-Smad3 and phospho-ERK1/2 protein levels were expressed as the ratio to total ERK1/2 and Smad3, respectively, and normalised to the solvent control group. Results are expressed as mean (SE) of n=4 (four cell non-smoker population) experiments per condition. Data analysed by two-way ANOVA followed by post hoc Bonferroni tests. *p<0.05 vs solvent controls; #p<0.05 vs CSE.

100% of confluence, forming an epithelial cell layer (without passages and without trypsinisation) on KRT5 positive cells in order to prevent phenotypic changes, as previously outlined.¹⁸

On the other hand, the lung tissues studied were from patients undergoing lung surgery for lung carcinoma. Since EMT has been well characterised in epithelial lung malignant disease,³¹ it

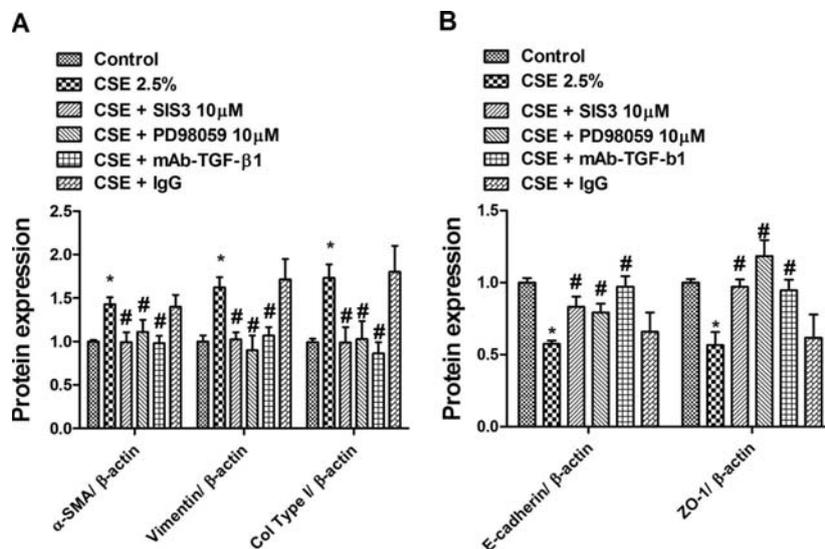


Figure 8 Cigarette smoke extract (CSE)-induced epithelial to mesenchymal transition is partially mediated by an autocrine transforming growth factor β_1 (TGF- β_1) effect and its downstream signalling phospho-ERK1/2 and phospho-Smad3. Differentiated human bronchial epithelial cells (HBECS) were incubated with the Smad3 inhibitor SIS3 (10 μ M), the ERK1/2 inhibitor PD98059 (10 μ M), the anti-TGF- β_1 antibody (mAb-TGF- β_1 ; 4 μ g/ml) or its negative control non-immune IgG for 30 min before CSE (2.5%) stimulation for 72 h. After incubation periods, differentiated HBECS were lysed and protein array Zeptosens performed. (A) CSE-induced upregulation of α smooth muscle actin, vimentin and collagen type I (Col type I) mesenchymal markers was inhibited by SIS3, PD98059 and mAb-TGF- β_1 . (B) CSE-induced downregulation of E-cadherin and ZO-1 epithelial markers was inhibited by SIS3, PD98059 and mAb-TGF- β_1 . (A, B) Data are expressed as the ratio to β -actin for protein levels and normalised to the solvent control group. Results are expressed as means (SE) of n=4 (four cell non-smoker population) experiments per condition. Data analysed by two-way ANOVA followed by post hoc Bonferroni tests. *p<0.05 vs solvent controls; #p<0.05 vs CSE.

Chronic obstructive pulmonary disease

could be argued that the EMT expression profile is due to spread of tumour lesions. However, samples of distal lung, located as far away as possible from the tumour, were carefully checked histologically to exclude the presence of tumour.

Another limitation could be related to the fact that the observed increase in the expression of mesenchymal markers in the epithelium is related to the decline in lung function while increased mesenchymal markers are also observed in smokers with normal lung function. This apparent contradiction may be explained by the fact that remodelling is a set of processes affecting whole airways which differ between smokers and patients with COPD. Patients who are smokers show less goblet cell and submucosal gland hyperplasia than patients with COPD,² absence of loss of alveolar wall, less vascular remodelling³² and less airway wall thickening and smooth muscle deposition around bronchi,³³ all contributing to lung function. Thus, although mesenchymal markers were upregulated in smokers with normal lung function, this may be considered as an initial step in small bronchial remodelling contributing to lung function over time together with the other remodelling processes.

Next we analysed possible mediators involved in the EMT process. A hypothesis generated from animal models is that cigarette smoke drives small airways remodelling by induction of profibrotic growth factors (eg, connective tissue growth factor, platelet-derived growth factor- β and TGF- β_1) from the airway wall.³⁴ These growth factors, which have also been implicated as inducers of EMT, could contribute to peribronchiolar fibrosis. Supporting this hypothesis, several *in vitro* studies have shown that components of cigarette smoke such as nicotine and benzo(a)pyrene induce EMT in immortalised airway epithelial cells.^{35–36} In this study we first showed evidence that differentiated HBECs undergo EMT in response to cigarette smoke, as demonstrated by specific markers and phenotypic changes. Cigarette smoke contains a high number of ROS that may activate latent TGF- β_1 release.³⁷ Previous data support the hypothesis that cigarette smoke may release the active form of TGF- β_1 , activating its downstream signalling Smad2/3 cascade in bronchial rat explants to promote small bronchi remodelling.³⁷ In addition, both cigarette smoke and TGF- β_1 also promote the activation of ERK1/2 signalling in HBECs,³⁸ suggesting a role for Smad3 and ERK1/2 phosphorylation in cigarette smoke-induced EMT. In this study we add new evidence to the mechanism by which CSE increases the release of the active form of TGF- β_1 , the phosphorylation of Smad3 and ERK1/2, thus promoting the EMT process in differentiated HBECs. The release of TGF- β_1 and the downstream phosphorylation of Smad3 and ERK1/2 were activated by ROS generated by CSE since the antioxidants NAC and APO—as well as blocking TGF- β_1 with mAb-TGF- β_1 —almost suppressed CSE-induced TGF- β_1 signalling and EMT. These *in vitro* findings are of clinical relevance since the phosphorylated forms of ERK1/2 and Smad3 were upregulated in primary HBECs from smokers and patients with COPD.

The importance of oxidant-mediated TGF- β release as well as ROS in fibrotic diseases has been previously documented.³⁹ In fact, myofibroblast transformation in lung fibrotic disorders following TGF- β_1 stimulation is partially mediated by the NADPH oxidase unit NOX4.³⁹ The plasmatic membrane unit NOX4 does not require interaction and activation by cytosolic regulatory subunits, so its activation is directly related to its expression.⁴⁰ In this study, CSE increased intracellular ROS as well as NOX4 expression in differentiated HBECs. Furthermore, NOX4 expression was upregulated in primary HBECs from smokers and patients with COPD and located on bronchial epithelial cells and leucocyte infiltrates in human small bronchi, confirming activation of oxidative stress in the tissues studied.

Considering the established role for cAMP as an inhibitor of ROS in epithelial cells as well as the subsequent EMT process,¹⁰ we explored whether cAMP could modulate CSE-induced EMT in differentiated HBECs. In our *in vitro* model CSE induced the loss of cAMP, probably by an increase in the degrading cAMP phosphodiesterase 4 (PDE4) activity, as we recently reported in HBECs.¹⁵ The addition of dbcAMP as an analogue of cAMP reduced ROS, TGF- β_1 secretion and their downstream signalling phospho-ERK1/2 and phospho-Smad3 as well as the EMT process. Modulation of cAMP levels could therefore be an appropriate therapy to attenuate EMT and small bronchi remodelling in patients with COPD.

A rational sequence of mechanistic events by which CSE induces EMT in HBECs therefore includes activation of the NADPH oxidase system and upregulation of the NADPH oxidase component NOX4 to produce intracellular ROS. Thus, ROS decrease cAMP levels through the increase in PDE4 activity. In a subsequent event, the increase in intracellular ROS together with the reduction in cAMP contributes to the release of TGF- β_1 . TGF- β_1 activates Smad3 and ERK1/2, contributing to the increase in EMT.

In summary, our data provide evidence of an active EMT process in the small bronchi of smokers and patients with COPD which may potentially contribute to the thickening of the wall of the small airways. *In vitro* studies show that cigarette smoke may induce EMT, modulating the TGF- β_1 pathway as well as ROS and cAMP levels. Future treatments directed at these molecular pathways could potentially attenuate *in vivo* EMT and small bronchial remodelling of patients with COPD.

Acknowledgements We thank G Juan and E Guijarro, Respiratory and Surgery Units, Hospital General, Valencia, Spain for facilitating clinical data and tissue collection.

Contributors Concept and design: JM, JC. Acquisition of data: JM, TP, AS. Analysis and interpretation of data: JM, JC, AS, TP. Drafting the article or revising it critically for important intellectual content: JC, JM. All authors approved the final version of the manuscript.

Funding This work was supported by grants SAF2011-26443 (JC), FIS CP11/00293 (JM), CIBERES (CB06/06/0027), ADE10/00020 (Spanish Government), ACIF/2010/114 (TP) and research grants from Regional Government (Prometeo/2008/045, 'Generalitat Valenciana'). Support from the CENIT programme (Spanish Government) was obtained.

Competing interests None.

Ethics approval This study has been approved by the ethics committee of the University General Hospital of Valencia, Spain.

Patient consent Obtained.

Provenance and peer review Not commissioned; externally peer-reviewed.

REFERENCES

- Hogg JC, Chu F, Utokaparch S, *et al*. The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2004;350:2645–53.
- Kirkham S, Kolsum U, Rousseau K, *et al*. MUC5B is the major mucin in the gel phase of sputum in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;178:1033–9.
- Jeffery PK. Remodeling and inflammation of bronchi in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* 2004;1:176–83.
- Scotton CJ, Chambers RC. Molecular targets in pulmonary fibrosis: the myofibroblast in focus. *Chest* 2007;132:1311–21.
- Higgins DF, Kimura K, Bernhardt WM, *et al*. Hypoxia promotes fibrogenesis *in vivo* via HIF-1 stimulation of epithelial-to-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 2007;117:3810–20.
- Rhyu DY, Yang Y, Ha H, *et al*. Role of reactive oxygen species in TGF-beta1-induced mitogen-activated protein kinase activation and epithelial-mesenchymal transition in renal tubular epithelial cells. *J Am Soc Nephrol* 2005;16:667–75.
- Willis BC, Borok Z. TGF-beta-induced EMT: mechanisms and implications for fibrotic lung disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007;293:L525–34.

- 8 Hackett TL, Warner SM, Stefanowicz D, *et al.* Induction of epithelial-mesenchymal transition in primary airway epithelial cells from patients with asthma by transforming growth factor-beta1. *Am J Respir Crit Care Med* 2009;180:122–33.
- 9 Kim KK, Kugler MC, Wolters PJ, *et al.* Alveolar epithelial cell mesenchymal transition develops in vivo during pulmonary fibrosis and is regulated by the extracellular matrix. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:13180–5.
- 10 Zhang A, Wang MH, Dong Z, *et al.* Prostaglandin E2 is a potent inhibitor of epithelial-to-mesenchymal transition: interaction with hepatocyte growth factor. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006;291:F1323–31.
- 11 Liu Y, Gao W, Zhang D. Effects of cigarette smoke extract on A549 cells and human lung fibroblasts treated with transforming growth factor-beta1 in a coculture system. *Clin Exp Med* 2010;10:159–67.
- 12 Veljkovic E, Jiricny J, Menigatti M, *et al.* Chronic exposure to cigarette smoke condensate in vitro induces epithelial to mesenchymal transition-like changes in human bronchial epithelial cells, BEAS-2B. *Toxicol In Vitro* 2011;25:446–53.
- 13 Sohal SS, Reid D, Soltani A, *et al.* Evaluation of epithelial mesenchymal transition in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Res* 2011;12:130.
- 14 Milara J, Navarro R, Juan G, *et al.* Sphingosine-1-phosphate is increased in patients with idiopathic pulmonary fibrosis and mediates epithelial to mesenchymal transition. *Thorax* 2012;67:147–56.
- 15 Milara J, Armengot M, Banuls P, *et al.* Roflumilast N-oxide, a PDE4 inhibitor, improves cilia motility and ciliated human bronchial epithelial cells compromised by cigarette smoke in vitro. *Br J Pharmacol* 2012;166:2243–62.
- 16 Cortijo J, Mata M, Milara J, *et al.* Acridinium inhibits cholinergic and tobacco smoke-induced MUC5AC in human airways. *Eur Respir J* 2011;37:244–54.
- 17 Milara J, Serrano A, Peiro T, *et al.* Acridinium inhibits human lung fibroblast to myofibroblast transition. *Thorax* 2012;67:229–37.
- 18 Ward C, Forrest IA, Murphy DM, *et al.* Phenotype of airway epithelial cells suggests epithelial to mesenchymal cell transition in clinically stable lung transplant recipients. *Thorax* 2005;60:865–71.
- 19 Sohal SS, Reid D, Soltani A, *et al.* Reticular basement membrane fragmentation and potential epithelial mesenchymal transition is exaggerated in the airways of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *Respirology* 2010;15:930–8.
- 20 Okada H, Ban S, Nagao S, *et al.* Progressive renal fibrosis in murine polycystic kidney disease: an immunohistochemical observation. *Kidney Int* 2000;58:587–97.
- 21 Strutz F, Okada H, Lo CW, *et al.* Identification and characterization of a fibroblast marker: FSP1. *J Cell Biol* 1995;130:393–405.
- 22 Burgel PR. The role of small airways in obstructive airway diseases. *Eur Respir Rev* 2011;20:23–33.
- 23 Iwano M, Plieth D, Danoff TM, *et al.* Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis. *J Clin Invest* 2002;110:341–50.
- 24 Willis BC, Liebler JM, Luby-Phelps K, *et al.* Induction of epithelial-mesenchymal transition in alveolar epithelial cells by transforming growth factor-beta1: potential role in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Pathol* 2005;166:1321–32.
- 25 Wu Z, Yang L, Cai L, *et al.* Detection of epithelial to mesenchymal transition in airways of a bleomycin induced pulmonary fibrosis model derived from an alpha-smooth muscle actin-Cre transgenic mouse. *Respir Res* 2007;8:1.
- 26 Harju T, Kinnula VL, Paakko P, *et al.* Variability in the precursor proteins of collagen I and III in different stages of COPD. *Respir Res* 2010;11:165.
- 27 Olivera D, Knall C, Boggs S, *et al.* Cytoskeletal modulation and tyrosine phosphorylation of tight junction proteins are associated with mainstream cigarette smoke-induced permeability of airway epithelium. *Exp Toxicol Pathol* 2010;62:133–43.
- 28 Rao RK, Basuroy S, Rao VU, *et al.* Tyrosine phosphorylation and dissociation of occludin-ZO-1 and E-cadherin-beta-catenin complexes from the cytoskeleton by oxidative stress. *Biochem J* 2002;368:471–81.
- 29 Kolosonek E, Savai R, Ghofrani HA, *et al.* Expression and activity of phosphodiesterase isoforms during epithelial mesenchymal transition: the role of phosphodiesterase 4. *Mol Biol Cell* 2009;20:4751–65.
- 30 Finlay GA, Russell KJ, McMahon KJ, *et al.* Elevated levels of matrix metalloproteinases in bronchoalveolar lavage fluid of emphysematous patients. *Thorax* 1997;52:502–6.
- 31 Shih JY, Yang PC. The EMT regulator slug and lung carcinogenesis. *Carcinogenesis* 2011;32:1299–304.
- 32 Santos S, Peinado VI, Ramirez J, *et al.* Characterization of pulmonary vascular remodelling in smokers and patients with mild COPD. *Eur Respir J* 2002;19:632–8.
- 33 Corsico A, Milanese M, Baraldo S, *et al.* Small airway morphology and lung function in the transition from normality to chronic airway obstruction. *J Appl Physiol* 2003;95:441–7.
- 34 Churg A, Zhou S, Preobrazhenska O, *et al.* Expression of profibrotic mediators in small airways versus parenchyma after cigarette smoke exposure. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2009;40:268–76.
- 35 Dasgupta P, Rizwani W, Pillai S, *et al.* Nicotine induces cell proliferation, invasion and epithelial-mesenchymal transition in a variety of human cancer cell lines. *Int J Cancer* 2009;124:36–45.
- 36 Yoshino I, Kometani T, Shoji F, *et al.* Induction of epithelial-mesenchymal transition-related genes by benzo[a]pyrene in lung cancer cells. *Cancer* 2007;110:369–74.
- 37 Wang RD, Wright JL, Churg A. Transforming growth factor-beta1 drives airway remodeling in cigarette smoke-exposed tracheal explants. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2005;33:387–93.
- 38 Hellermann GR, Nagy SB, Kong X, *et al.* Mechanism of cigarette smoke condensate-induced acute inflammatory response in human bronchial epithelial cells. *Respir Res* 2002;3:22.
- 39 Hecker L, Vittal R, Jones T, *et al.* NADPH oxidase-4 mediates myofibroblast activation and fibrogenic responses to lung injury. *Nat Med* 2009;15:1077–81.
- 40 Petry A, Weitnauer M, Grolach A. Receptor activation of NADPH oxidases. *Antioxid Redox Signal* 2010;13:467–87.