

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA

DOCTORADO EN BIOMEDICINA Y FARMACIA



**IMPLICACIÓN DE MUC1 COMO MARCADOR DE
CORTICORRESISTENCIA EN LA ENFERMEDAD
PULMONAR OBSTRUCTIVA CRÓNICA**

TESIS DOCTORAL

PRESENTADA POR:

LUCÍA DÍAZ PLATAS

DIRIGIDA POR:

DR. D. JULIO CORTIJO GIMENO

DR. D. JAVIER MILARA PAYÁ

DRA. D^a ADELA SERRANO GIMENO

VALENCIA, 2017



DR. D. JULIO CORTIJO GIMENO
Catedrático Numerario de Universidad
Departamento de Farmacología
Universidad de Valencia

Certifica:

Que la Tesis Doctoral presentada por Dña. Lucía Díaz Platas, con el título:

**“IMPLICACIÓN DE MUC1 COMO MARCADOR DE CORTICORRESISTENCIA EN LA
ENFERMEDAD PULMONAR OBSTRUCTIVA CRÓNICA”**

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, Febrero de 2017.

Dr. Julio Cortijo Gimeno



DR. D. JAVIER MILARA PAYÁ

Farmacéutico Adjunto en el Hospital General Universitario de Valencia
Profesor Asociado de la Universidad Jaume I (UJI)

Certifica:

Que la Tesis Doctoral presentada por Dña. Lucía Díaz Platas, con el título:

**“IMPLICACIÓN DE MUC1 COMO MARCADOR DE CORTICORRESISTENCIA EN LA
ENFERMEDAD PULMONAR OBSTRUCTIVA CRÓNICA”**

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, Febrero de 2017.

Dr. Javier Milara Payá.



DRA. DÑA. ADELA SERRANO GIMENO

Doctor por la Universidad de Valencia

Departamento de Farmacología

Universidad de Valencia

Certifica:

Que la Tesis Doctoral presentada por Dña. Lucía Díaz Platas, con el título:

**“IMPLICACIÓN DE MUC1 COMO MARCADOR DE CORTICORRESISTENCIA EN LA
ENFERMEDAD PULMONAR OBSTRUCTIVA CRÓNICA”**

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, Febrero de 2017.

Dra. Adela Serrano Gimeno.

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

- Ministerio Español de Economía y Competitividad: SAF2014-55322-P. (https://sede.micinn.gob.es/stfls/eSede/Ficheros/2015/Anexo_Preseleccionados_PRP_Proyectos_Excelencia_2014.pdf).
- Subvenciones de la acción estratégica en salud (modalidad proyectos de investigación en salud) del Instituto de Salud Carlos III, dentro del subprograma estatal de generación de conocimiento, en el marco del plan estatal de investigación científica y técnica: FIS CP11/00293 y FIS PI14/01733 (<http://gesdoc.isciii.es/?action=download&id=08/10/2014-fe2a818ac5>)
- Centro de Investigación en Red de Enfermedades Respiratorias: CIBERES apoyado por el Instituto Nacional de Salud Carlos III y los Ministerios españoles de Economía y Competitividad y Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad (CIBERES; CB06/06/0027; <http://www.ciberes.org/>)
- El proyecto “Modelo in vitro de resistencia a esteroides en cultivo de células humanas epiteliales de vías aéreas: estudio de nuevas dianas farmacológicas”, con número de expediente TRA2009-0311 ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación, en el marco del VI Plan Nacional de Investigación Científica, Desarrollo e Innovación Tecnológica 2008-2011. Subprograma de Proyectos de Investigación Fundamental orientada a la transmisión de conocimiento a la empresa (TRACE). (<https://www.boe.es/boe/dias/2010/08/05/pdfs/BOE-A-2010-12605.pdf>)
- Fondos de la Generalitat Valenciana: Prometeo II/2013/014 http://www.cece.gva.es/poci/docs/2013/NUEVAS/RESOLUCIONES/PROMETEO II13_Resolucion_Concesion_c.pdf

AGRADECIMIENTOS.

Me gustaría expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que han contribuido a que esta tesis doctoral haya sido posible.

En primer lugar, a mis directores:

Al Dr. Julio Cortijo, por acogerme con los brazos abiertos y permitirme formar parte de su gran grupo de investigación, por haberme hecho tan fácil compaginar la residencia con la realización de esta tesis, por su experiencia, sus consejos y su exigencia que han hecho que este trabajo de investigación haya sido posible.

Al Dr. Javier Milara, por todo su tiempo, dedicación y paciencia, por enseñarme tantas cosas y siempre con su gran sentido del humor. Gracias Xavi por todo lo que me has enseñado y por habérmelo hecho todo tan fácil.

A la Dra. Adela Serrano, de ella solo puedo decir cosas buenas. Directora espiritual, amiga, compañera y buena persona. Ha tenido muchísima paciencia conmigo, me ha enseñado muchísimas cosas y siempre con una sonrisa. Gracias a ella el laboratorio ha sido como mi segunda casa.

A mis compañer@s de laboratorio. En mi recuerdo me llevo innumerables anécdotas, risas, confianzas.... No hay suficientes palabras para poder explicaros lo que me llevo. Lo que me habéis aportado tanto a nivel profesional como personal es de agradecer. Pili y Soni sin vuestra ayuda este trabajo habría sido literalmente imposible. Gracias por estar siempre ahí incondicionalmente. Grace, tu no lo podrías haber descrito mejor: "lo que la radiación ha unido, que no lo separe el hombre". Gracias por hacerme más fácil trabajar con animales, la verdad es que nuestra combinación de estoicidad y sensibilidad no podría haber sido mejor. Anselm, Bea, Sonia, Tere, Patri, Terelo gracias por aportarme tanto, por vuestra ayuda incondicional y vuestro apoyo tanto dentro como fuera del laboratorio, me llevo mil recuerdos y todos son buenos, sobretodo de nuestras "jaimitadas". Gracias a todos por haber hecho posible que fuese a trabajar todos los días ilusionada y con una sonrisa.

A mis compañeros del Hospital Clínico por haberme hecho tan fácil compaginar mi trabajo allí con la tesis. Alba, Musta, Rafa, Carolina, Carola, Andre...gracias por estar ahí cuando más lo necesitaba.

Stefi gracias por todo lo que me enseñaste fuiste mi tutor en la parte de Imagen, sin ti esto habría sido muy difícil. Te estaré siempre muy agradecida tanto a nivel personal como profesional. Tienes una amiga en el norte para lo que necesites. A José Luis por ponerme en contacto con el Dr. Cortijo y haber hecho posible la realización de este trabajo. A Mónica por haber sido tutora, consejera y amiga, por haberme hecho tan fácil compaginar la tesis con la residencia y por no tomarme por loca, más bien todo lo contrario y ayudarme cada vez que tenía una "ocurrencia investigadora".

A l@s chic@s de IBA, en especial a Cris, Mila y Delfi por haber hecho posible que mi horario cuadrara con las horas de entrega de los radiofármacos y por estar siempre dispuestas a ayudar cuando las dosis ratunas requerían consideraciones especiales.

A mis niñas de Príncipe Felipe: Fatimiña, Manoli, Estrellita, Diana, Estela,... que deciros que no sepáis ya. Gracias por estar ahí siempre y a cualquier hora, por vosotras me sentí siempre en Valencia como en casa. Si alguien me entendía en este campo erais vosotras. Gracias por hacer que el día a día entre vermut y vermut fuese más llevadero.

A mis amig@s, que siendo cada uno de un campo totalmente diferente, siempre han confiado en mí. Por no dejarme nunca sola a pesar de estar separados a más de mil kilómetros. Los días sin las interminables charlas por Skype habrían sido mucho más complicados, gracias. Adri, Maso porque me acompañasteis siempre incluso literalmente en vuestras visitas al laboratorio. Ana, Alba habéis sido un apoyo incondicional. A Deco por aguantarme cuando más lo necesitaba, por apoyarme para que nunca tirase la toalla y por pasarse la mitad de su residencia en Valencia conmigo.

A mi familia. A mi hermano Juan por sentirse orgulloso de mi trabajo. A Kimi por escucharme siempre. Me gustaría expresar un agradecimiento muy especial a mis padres. Todo lo que soy os lo debo a vosotros, es el reflejo de vuestra educación. En vuestros genes llevo el amor por la ciencia que ha hecho posible esta tesis. Gracias por darme todo siempre sin pedir nada a cambio.

Gracias a todos por haber hecho de esta tesis una realidad.

“Investigar es ver lo que todo el mundo ha visto, y pensar lo que nadie más ha pensado.”

Albert Szent Gyorgi

Índice:

1. INTRODUCCIÓN	19
1.1 Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC): Definición.....	21
1.2 Epidemiología de la EPOC.....	22
1.2.1 Prevalencia.....	22
1.2.2. Morbilidad.....	24
1.2.3. Mortalidad.....	26
1.3 Factores de riesgo de la EPOC.....	27
1.3.1 Exposición a sustancias inhaladas.....	28
1.3.2 Factores genéticos.....	31
1.3.3 Estrés oxidativo.....	32
1.3.4 Otros factores de riesgo.....	32
1.4 Diagnóstico y desarrollo de la EPOC.....	33
1.4.1 Diagnóstico de la EPOC mediante espirometría.....	35
1.4.2 Diagnóstico por imagen.....	37
1.4.3 Estadios de la EPOC basados en la severidad de la enfermedad.....	43
1.5 Patogenia de la EPOC: cambios patológicos y patofisiológicos	44
1.6 Aproximaciones farmacológicas en la EPOC.....	49
1.6.1 Aproximaciones farmacológicas clásicas.....	49
1.6.2 Nuevas aproximaciones farmacológicas anti-inflamatorias.....	52
1.6.3 Corticosteroides.....	53
1.6.4 Tratamiento combinado corticosteroides/ broncodilatadores inhalados:.....	62
1.6.5 Otros tratamientos farmacológicos.....	64
1.7 Corticorresistencia en la EPOC.....	65
1.7.1 Mecanismos de corticorresistencia.....	66
1.7.2 Implicaciones terapéuticas de la corticorresistencia.....	78
1.8 Mucinas.....	82
1.8.1. MUC 1.....	90
1.9 MUC1 y EPOC: ¿Posible papel de MUC1 en la aparición de corticorresistencia?	93
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	95

3. METODOLOGÍA	99
3.1 Material.....	101
3.1.1 Fármacos ensayados.....	101
3.1.2 Estímulo: Extracto de humo de tabaco (EHT).....	102
3.1.3 Reactivos utilizados.....	103
3.1.4 Pacientes.....	104
3.1.5 Animales de experimentación.....	105
3.2 Métodos.....	106
3.2.1 Cultivos celulares.....	106
3.2.2 Estimulaciones in vitro.....	108
3.2.3 Modelo animal.....	109
3.2.4 Preparación y administración de fármacos y radiofármacos.....	114
3.2.5 Imagen Molecular.....	114
3.2.6 Extracción de muestras.....	117
3.2.7 Ensayos de inflamación pulmonar.....	117
3.2.8. Histología.....	119
3.2.9 Estudio de la expresión génica: Técnicas de Biología molecular.....	121
3.2.10 Estudio de la expresión proteica.....	126
3.2.11 Inmunoprecipitación.....	127
3.2.12 Silenciamiento de MUC1 por siRNA.....	128
3.2.13 Ensayos ELISA para IL-8, IL-13, GM-CSF, MIP-3 α y MMP9.....	128
3.2.14 Análisis estadístico.....	129
4. RESULTADOS	131
4.1. Estudio de la expresión y distribución de MUC1 en tejido de pacientes fumadores y con EPOC y su implicación en la aparición de corticorresistencia.....	133
4.1.1. La expresión de MUC1 está disminuida en tejido pulmonar humano, en células epiteliales bronquiales primarias y en neutrófilos aislados de fumadores y pacientes EPOC.....	133
4.1.2 La estimulación celular con Extracto de Humo de Tabaco (EHT) induce una disminución de la expresión de MUC1, un aumento de marcadores inflamatorios y una peor respuesta a la dexametasona.....	134
4.1.3 MUC1 participa en el correcto funcionamiento del GR α nuclear. La baja expresión de MUC1 en pacientes EPOC participa en la aparición de resistencia a la dexametasona.....	138

4.2 Efecto de la inhibición de Muc1 en un modelo murino de inflamación pulmonar aguda en ratones C57BL6/J Wild Type y KO para Muc1 expuestos al humo del tabaco. Aproximación clínica	142
4.2.1 Validación del modelo murino de Inflamación pulmonar inducida por Exposición al Humo del Tabaco (EHT).....	142
4.2.2 Efecto farmacológico de la Dexametasona 3 y 10 mg/Kg/día vía oral, en inflamación pulmonar aguda inducida con humo de tabaco en ratones C57BL6/J.....	142
5. DISCUSIÓN.....	157
6. CONCLUSIONES.....	167
7. BIBLIOGRAFÍA.....	171
8. ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	187
9. ANEXO.....	193
9.1 DICTÁMENES: COMISIÓN DE INVESTIGACIÓN Y COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLINICA CEIC.....	195

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC): 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 2016, 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 la inflamación en el desarrollo y en las manifestaciones clínicas de la EPOC [2], ya que los cambios patológicos producidos por una respuesta inflamatoria tienen consecuencias críticas en la progresión de la enfermedad. Las terapias inhaladas actuales, entre ellos los corticoides inhalados, tienen una limitada eficacia ya que se depositan mayoritariamente en las vías aéreas proximales y además se han descrito múltiples mecanismos de corticorresistencia. Por ello, el estudio del origen y de los mecanismos implicados en el desarrollo de esta corticorresistencia y, en particular, de la implicación de las mucinas en ella, podría mejorar el entendimiento de este proceso clave en la EPOC. Además, este conocimiento podría contribuir al desarrollo de opciones terapéuticas dirigidas, que mejorasen la respuesta frente a la inflamación, la limitación del flujo aéreo y tuviesen un impacto importante en el desarrollo y en el carácter progresivo de la EPOC.

1. INTRODUCCIÓN

1.2 Epidemiología de la EPOC.

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 2020 [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].

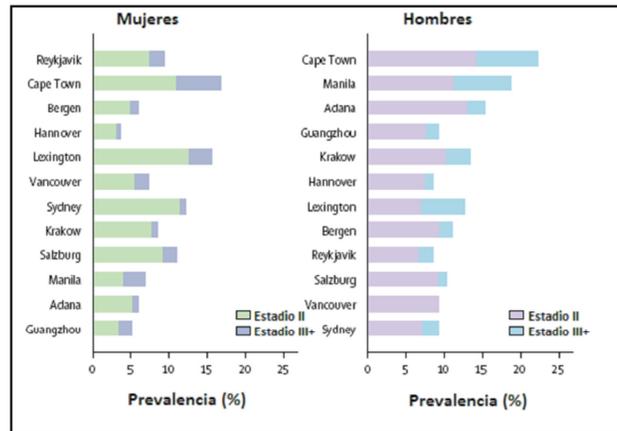


Figura 1. Análisis de la variación internacional en la prevalencia de la EPOC según el estudio BOLD (Tabla adaptada de Buist AS, 2007[16]). Prevalencia de los estadios II y III (o mayores) de la EPOC por género y lugar.

El proyecto PLATINO examinó la prevalencia de la limitación en el flujo aéreo postbroncodilatación 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].

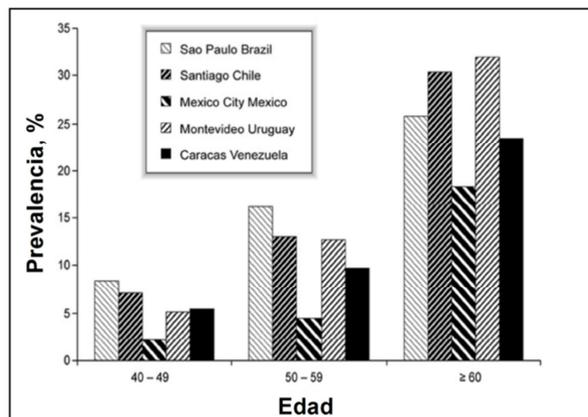


Figura 2. Análisis de la prevalencia de la EPOC según el estudio PLATINO (Tabla adaptada de Menezes AM, 2005 [17]). El proyecto PLATINO examinó la prevalencia de la limitación en el flujo aéreo postbroncodilatación en personas mayores de 40 años en cinco ciudades sudamericanas. Los resultados mostraron diferencias de prevalencia entre países y entre individuos de edades diferentes (con mayor prevalencia por encima de los 60 años).

1. INTRODUCCIÓN

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 o índice Tiffeneau (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 hiperinflación 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].

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].

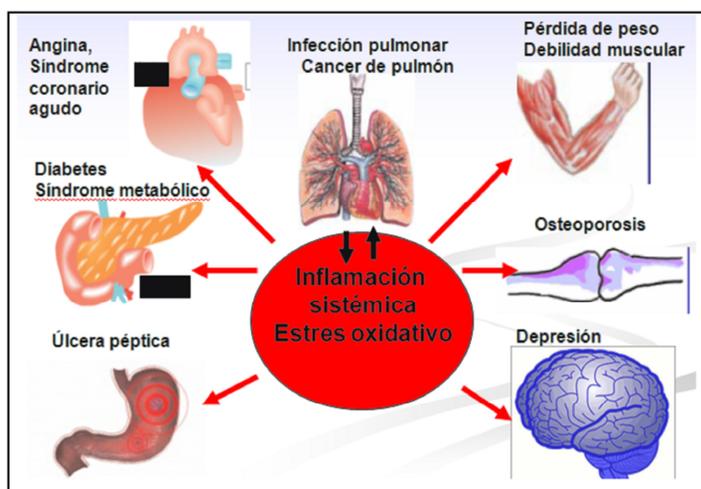


Figura 3. Efectos sistémicos de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). La EPOC se caracteriza por un componente pulmonar principal y también por una serie de efectos extra-pulmonares significativos que contribuyen a que sea considerada una enfermedad heterogénea con diversas manifestaciones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

1. INTRODUCCIÓN

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 2020 [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].

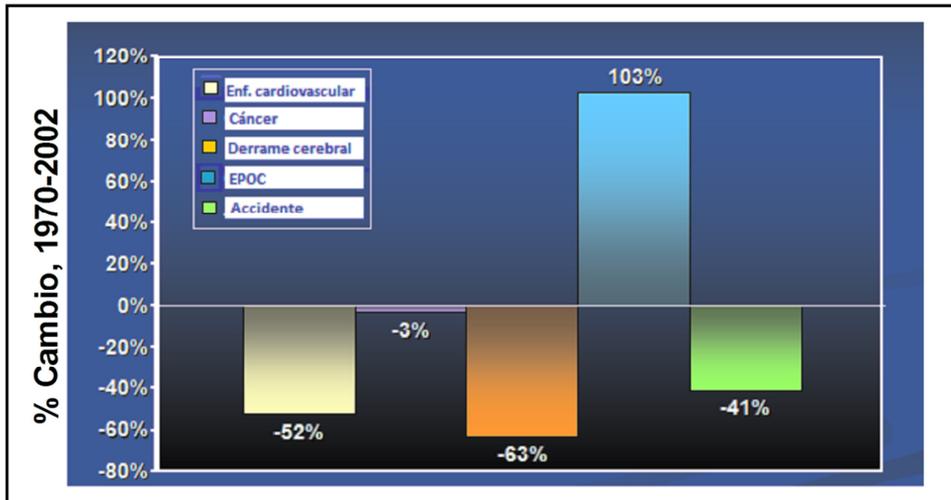


Figura 4. Porcentaje de cambio en los datos de mortalidad atribuidos a las seis principales causas de muerte en Estados Unidos entre 1970-2002. (Figura adaptada de Jemal A, 2005 [30]). En la tabla se reflejan los cambios en mortalidad atribuidos a las seis principales causas de mortalidad en Estados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

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

1. INTRODUCCIÓN

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. Éstos y otros factores se detallan a continuación.

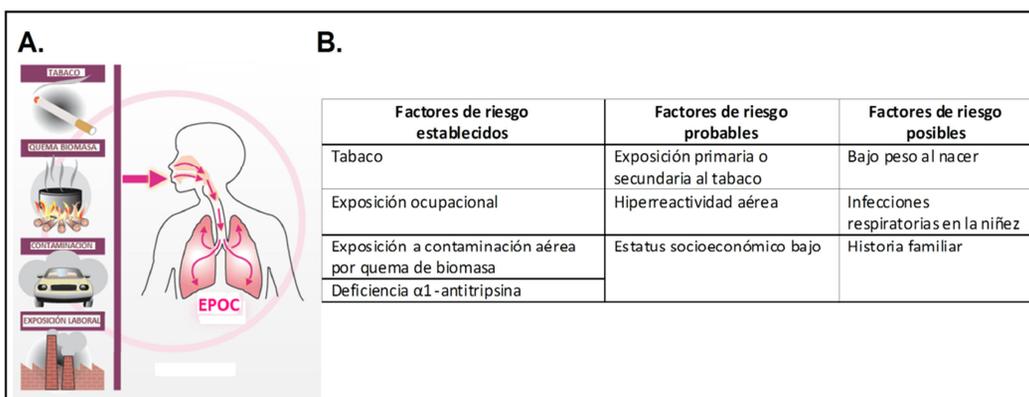


Figura 5. Factores de riesgo que pueden contribuir a la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) (Tabla adaptada de Tager IB et al, 1988 [36]). A. Factores de debidos a la exposición a partículas inhaladas: tabaco, contaminación en espacios confinados, contaminación ambiental y contaminación ocupacional.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

1. INTRODUCCIÓN

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.

1.3.1.3 Exposición sustancias inhaladas en pequeños animales.

La gran implicación en patologías pulmonares de las sustancias inhaladas, han creado la necesidad de realizar modelos animales que intenten reproducir con la mayor exactitud las condiciones ambientales responsables del desarrollo de múltiples patologías de las vías aéreas.

El modelo más empleado en animales de laboratorio ha sido el de Exposición al Humo del Tabaco (EHT). Son múltiples los equipos diseñados y los modelos animales empleados (rata, ratón, cobaya...) [201, 202] que se han utilizado para estudiar la EHT en animales de laboratorio [197, 200]. Desde equipos que exponen el cuerpo entero del sujeto, lo que supone absorción de nicotina y otras toxinas a través de la epidermis, a los denominados “nose-only” que son aquellos que solo expondrían al animal a la inhalación del humo del tabaco a través de las fosas nasales, siendo estos últimos más reproducibles y más parecidos a las condiciones en humanos.

En modelos animales en los que se busca una reacción inflamatoria muy aguda por tratarse de modelos muy cortos en el tiempo suele combinarse la exposición al humo del tabaco con una instilación intranasal previa y única de una toxina (normalmente LPS, Lipopolisacárido) [198] para sensibilizar previamente y desencadenar la respuesta inflamatoria por el humo del tabaco.

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, 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, 61], 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 enfermedad pulmonar obstructiva crónica (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. INTRODUCCIÓN

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 de la EPOC.

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

1. INTRODUCCIÓN

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 anomalías 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 cardíaca 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].

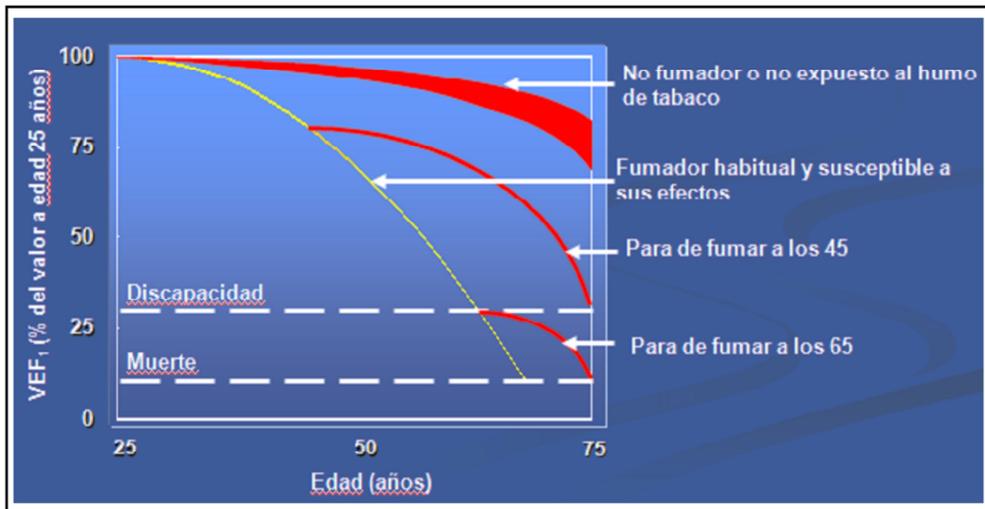


Figura 6. El cese del tabaquismo enlentece el declive en la función pulmonar característico de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) (Figura adaptada de *BTS Guidelines*, 1997 [86]). En la figura se representa el declive en la función pulmonar asociado a la edad, representado por el volumen espiratorio forzado en el primer segundo (VEF_1).

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 de la EPOC 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 volumen espiratorio forzado en el primer segundo (VEF_1) y su ratio (VEF_1/CVF) con la capacidad vital forzada (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

1. INTRODUCCIÓN

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 el volumen de aire que un paciente puede espirar en un segundo tras una inspiración completa. 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, o índice Tiffeneau, 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 extraída de Revisión GOLD, 2016 [2]).

Estadio	Grado de Severidad	VEF_1/CVF	VEF_1
I	Leve	$< 0,70$	$VEF_1 \geq 80\%$ predicho
II	Moderada	$< 0,70$	$50\% \leq VEF_1 < 80\%$ predicho
III	Severa	$< 0,70$	$30\% \leq VEF_1 < 50\%$ predicho
IV	Muy Severa	$< 0,70$	$VEF_1 < 30\%$ predicho

Definición de abreviaturas: VEF_1 : Volumen espiratorio forzado en el primer segundo; CVF: Capacidad vital forzada; Fallo respiratorio: Presión de dióxido de carbono en sangre arterial ($PaCO_2$) mayor que 6,7 kPa (50mmHg) 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 [87], ya que la limitación en el flujo aéreo no completamente reversible se caracteriza por unos valores de VEF_1 y VEF_1/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 Diagnóstico por imagen.

Aunque la técnica de referencia diagnóstica es la espirometría existen otras técnicas objetivas que pueden ser complementarias y que se utilizan ampliamente en la clínica. Las técnicas de diagnóstico por imagen “clásicas” permiten evaluar aquellas entidades patológicas que producen alteraciones morfológicas macroscópicas, por lo que pretendemos obtener de ellas la mayor aproximación posible a una correlación con la anatomía patológica macroscópica. Las técnicas de diagnóstico por imagen metabólicas permiten ver y cuantificar alteraciones funcionales (que suelen predecir a los cambios morfológicos). La combinación de ambas técnicas radiología convencional y medicina nuclear da como resultado las denominadas “técnicas híbridas”, mucho más sensibles y con una mejor resolución que si utilizáramos ambas técnicas por separado.

1.4.2.1 Técnicas Radiológicas Clásicas.

A pesar de los actuales intentos de clasificar a los pacientes con EPOC de acuerdo a fenotipos, al ser la radiología una técnica morfológica, el estudio radiológico pulmonar de la EPOC la sigue dividiendo en sus formas clásicas, enfisema y afectación de la vía aérea [199]. La radiografía convencional de tórax es la primera exploración utilizada en el estudio de la patología pulmonar. En el caso de la EPOC permite detectar signos, principalmente indirectos, de las fases avanzadas de la enfermedad, pero con una baja sensibilidad y especificidad. La tomografía computarizada (TC) es la técnica de uso general con mayor precisión para el estudio morfológico del pulmón, con una buena correlación con la anatomía patológica macroscópica y con las pruebas de función respiratoria, permitiendo diferenciar desde fases precoces entre las diferentes formas de enfisema (centrilobulillar, panlobular y paraseptal) y de afectación de la vía aérea (traqueomalacia, bronquitis crónica, bronquiolitis), así como valorar su distribución, extensión, patologías asociadas y complicaciones. Se ha intentado valorar cuantitativamente ambas formas de afectación pulmonar y, además de las valoraciones visuales subjetivas, se han definido formas más objetivas de cuantificación, visual o mediante aplicaciones informáticas específicas.

Puesto que en la EPOC se producen cambios en la arquitectura del pulmón, es de esperar que la radiología permita su valoración. Los hallazgos radiológicos que se pueden obtener en esta enfermedad suelen dividirse en dos categorías, los correspondientes al enfisema y los de la afectación de la vía aérea; secundariamente, también se puede evaluar la repercusión sobre el árbol arterial pulmonar y, en definitiva, sobre las cavidades cardíacas derechas. Esta división se hace con fines prácticos, ya que en realidad ambas categorías acostumbran a coexistir en

1. INTRODUCCIÓN

distintas proporciones, y hablaremos de predominio de enfisema o de predominio de vía aérea. Las técnicas de diagnóstico por imagen que se utilizan en la práctica clínica son las habituales en la patología pulmonar, es decir, la radiografía convencional y la tomografía computarizada (TC), siendo la segunda mucho más sensible para la detección y caracterización de la patología. Los cambios morfológicos característicos de esta patología son la destrucción pulmonar, las bullas y la hiperinsuflación.

1.4.2.1.1 Tomografía Computarizada.

La tomografía computarizada es la técnica radiológica con mayor sensibilidad y especificidad para el estudio morfológico de la patología broncopulmonar en general, y también para el de la EPOC. Los equipos actuales de tomografía computarizada multidetector (TCMD), y sus adquisiciones volumétricas con cortes finos (alrededor de un milímetro) con capacidad de obtener reconstrucciones en cualquier plano del espacio con una excelente resolución, ofrecen imágenes que permiten estudiar las diferentes estructuras pulmonares, vasculares, bronquiales y, también, la arquitectura del parénquima pulmonar. En este sentido, las imágenes obtenidas permiten valorar morfológicamente la unidad funcional pulmonar elemental, el lobulillo pulmonar secundario, y discernir cuál de sus porciones y, por tanto, de sus componentes, es el afectado, permitiendo un acercamiento a la patología basado en el análisis de cambios morfológicos estructurales a partir de los cuales se intentan establecer correlaciones con la anatomía patológica macroscópica [199]. El característico agrandamiento de los diferentes espacios aéreos que intervienen en el intercambio de gases, es decir, a partir de los bronquiolos respiratorios, con destrucción de las paredes alveolares, es identificable por TC desde fases muy precoces, antes de que la entidad sea diagnosticable clínicamente.

Esta técnica, no sólo es más sensible para la detección del enfisema, sino que también permite valorar su distribución y extensión. Para el análisis por TC del parénquima pulmonar se recomienda su valoración en estaciones de trabajo, con una amplitud y centro de ventana de 1000-1400 / -600-700 unidades Hounsfield (UH). Además, existen aplicaciones informáticas específicas que permiten la manipulación de las imágenes obtenidas con el fin de aumentar nuestra sensibilidad en la detección de formas sutiles, incipientes, de enfisema. La técnica de minIP (mínima intensidad de proyección) utiliza bloques de cortes contiguos de la exploración pulmonar y destaca las áreas de parénquima pulmonar con los valores de atenuación menores, al tiempo que suprime la representación gráfica del pulmón normal y de los vasos pulmonares, con ello, aumenta la sensibilidad de la tomografía computarizada de alta resolución desde el 62% hasta el 81%.

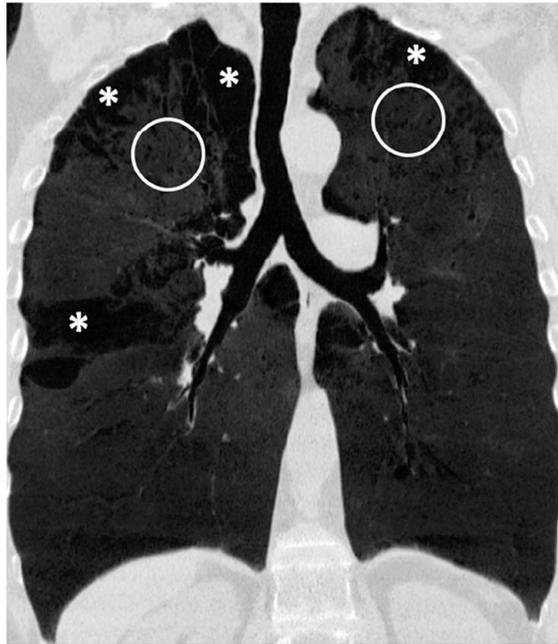


Figura 7. Técnica minIP. (Figura extraída del libro Diagnóstico por imagen de la EPOC [199] Enfisema. Junto a evidentes áreas de hiperclaridad pulmonar (*), se hace visible un fino punteado de focos hiperclaros por enfisema centrilobulillar incipiente (círculos).

Por otra parte, existen aplicaciones específicas que permiten la cuantificación del enfisema, habiéndose demostrado que la valoración visual del mismo sobreestima el grado de afectación.

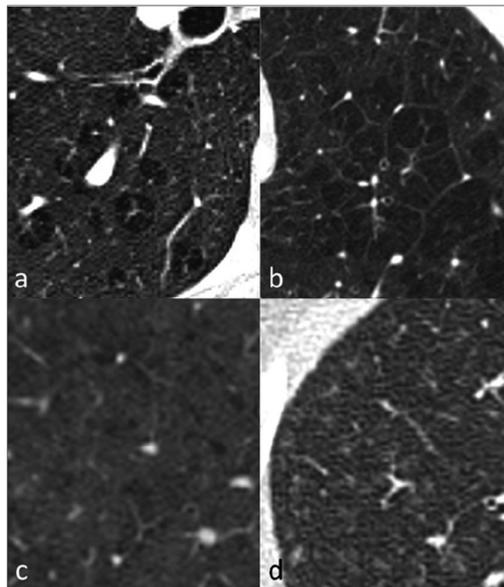


Figura 8. Enfisema centrilobulillar. (Figura extraída del libro Diagnóstico por imagen de la EPOC [199]. a) Hiperclaridades focales redondeadas sin pared, con imágenes lineales ramificadas en su centro. b) Hiperclaridades más extensas que mantienen reconocible la arquitectura lobulillar del pulmón. c) Tenues hiperclaridades perivascuales. d) Nódulos centrilobulillares por bronquiolitis, patología que precede a la aparición del enfisema.

1. INTRODUCCIÓN

1.4.2.2 Tomografía por Emisión de Positrones.

La tomografía por emisión de positrones o PET (por las siglas en inglés de *Positron Emission Tomography*), es una técnica de diagnóstico por imagen molecular propia de una especialidad médica llamada medicina nuclear.

La Tomografía por Emisión de Positrones es una técnica no invasiva de diagnóstico e investigación “in vivo” por imagen capaz de medir la actividad metabólica del organismo bajo estudio. Al igual que el resto de técnicas diagnósticas en Medicina Nuclear como el SPECT (Tomografía por Emisión de Fotón Único), la PET se basa en detectar y analizar la distribución tridimensional que adopta en el interior del cuerpo un radiofármaco de vida media ultracorta administrado a través de una inyección intravenosa. Según qué proceso metabólico se desee estudiar, se emplean diferentes radiofármacos. La PET nos permite ver procesos metabólicos en tiempo real y cuantificarlos [203].

La imagen se obtiene gracias a que los tomógrafos son capaces de detectar los fotones gamma emitidos por el paciente. Estos fotones gamma de 511keV son el producto de una aniquilación entre un positrón, emitido por el radiofármaco PET, y un electrón cortical del cuerpo del paciente. Esta aniquilación da lugar a la emisión, fundamentalmente, de dos fotones. Para que estos fotones acaben por conformar la imagen deben detectarse “en coincidencia”, es decir, al mismo tiempo; en una ventana de tiempo adecuada (nanosegundos), deben provenir de la misma dirección y sentidos opuestos, pero además su energía debe superar un umbral mínimo que certifique que no ha sufrido dispersiones energéticas de importancia en su trayecto (fenómeno de scatter) hasta los detectores. Los detectores de un tomógrafo PET están dispuestos en anillo alrededor del paciente, y gracias a que detectan en coincidencia a los fotones generados en cada aniquilación conformarán la imagen. Para la obtención de la imagen estos fotones detectados son convertidos en señales eléctricas. Esta información posteriormente se somete a procesos de filtrado y reconstrucción, gracias a los cuales se obtiene la imagen [203].

Existen varios radiofármacos marcados con isótopos emisores de positrones de utilidad médica. El isótopo más empleado de ellos es el Flúor-18, que es capaz de unirse a la 2-O-trifluorometilsulfonil manosa para obtener el trazador 18F-Fluordesoxiglucosa (18F-FDG).

La captación celular de la fludesoxiglucosa (18F) se realiza por un sistema transportador tisular específico, que es en parte insulino-dependiente. La fludesoxiglucosa (18F) se transporta, vía membrana celular, de forma similar a la glucosa, pero solo experimenta el primer paso de la

glicólisis formándose fludesoxiglucosa (18F)-6-fosfato, que queda atrapada dentro de las células y no se metaboliza posteriormente. Ya que la desfosforilación posterior por parte de las fosfatasas intracelulares es lenta, la fludesoxiglucosa (18F)-6-fosfato se retiene en el tejido varias horas (mecanismo de atrapamiento). Es decir, la 18F-FDG se comporta metabólicamente igual que su análoga la glucosa, pero al carecer de un hidroxilo en la posición 2 no puede continuar con la ruta glucolítica y queda retenida dentro de la célula, lo que estamos viendo en ese momento es el consumo de glucosa real del organismo bajo estudio. Gracias a lo cual, tendremos la posibilidad de poder identificar, localizar y cuantificar, a través del SUV (Standardized Uptake Value), el consumo de glucosa. Esto resulta un arma de capital importancia al diagnóstico médico, puesto que muestra qué áreas del cuerpo tienen un metabolismo glucídico elevado, que es una característica primordial de las células oncológicas y también inflamatorias.

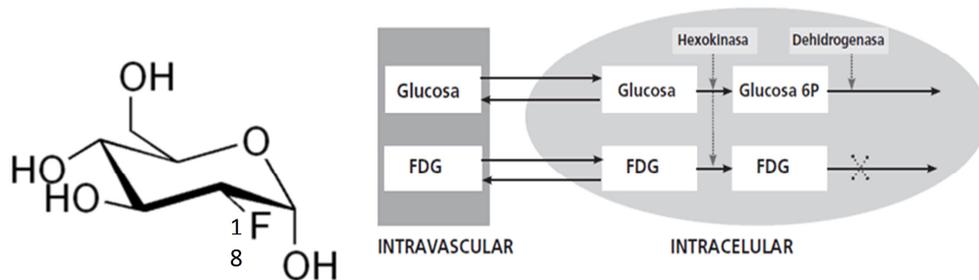


Figura 9. Estructura molecular de 18F-FDG Estructura de una molécula de glucosa en la que el hidroxilo de la posición 2 ha sido sustituido por un isótopo radiactivo, el 18F. A la derecha se observa el fenómeno de “atrapamiento metabólico”: la FDG queda retenida dentro de la célula por no poder continuar con la ruta glucolítica al carecer de ese grupo hidroxilo.

Las células neoplásicas y las inflamatorias tienen un consumo de glucídico elevado, Así, la PET nos permite estimar los focos de crecimiento celular anormal en todo el organismo, en un solo estudio, por ser un estudio de cuerpo entero, por lo tanto nos permitirá conocer la extensión. Pero además sirve, entre otras cosas, para evaluar en estudios de control la respuesta al tratamiento, al comparar el comportamiento del metabolismo en las zonas de interés entre los dos estudios.

Para el paciente la exploración no es molesta ni dolorosa. Se debe consultar en caso de mujeres lactantes o embarazadas ya que en estas situaciones se debe de retrasar la prueba, o bien no realizarse. Se debe acudir en ayunas de 4-6 horas, evitando el ejercicio físico en el día previo a la exploración y sin retirar la medicación habitual. La hiperglucemia puede imposibilitar la obtención de imágenes adecuadas, obligando a repetir el estudio

1. INTRODUCCIÓN

posteriormente. Tras la inyección del radiofármaco, el paciente permanecerá en una habitación en reposo. La exploración tiene una duración aproximada de 30-45 minutos.

Además de la oncología, donde la PET se ha implantado con mucha fuerza como técnica diagnóstica, desplazando al TC como primera opción diagnóstica en algunas indicaciones, otras áreas que se benefician de este tipo de exploraciones son la neurología y la cardiología. También tiene un gran papel en estudios de experimentación clínica.

Si bien es cierto que el rol del PET/TC en el diagnóstico, estadificación y monitorización de las enfermedades neoplásicas está bien establecido. En la actualidad, la utilidad clínica del PET/TC se ha expandido al diagnóstico de enfermedades autoinmunes, inflamatorias e infecciosas, como así también al de patologías no neoplásicas -como vasculitis, aterosclerosis, enfermedades granulomatosas (incluyendo sarcoidosis y enfermedad inflamatoria intestinal)- y al de una variedad de desórdenes neurológicos. Se espera que la disponibilidad de nuevos trazadores en PET/TC expandan sus aplicaciones a una variedad de territorios clínicos.

La tendencia a la utilización de métodos diagnósticos no invasivos y terapéuticos eficientes para procesos infecciosos o inflamatorios está en aumento. Los procedimientos de medicina nuclear son herramientas importantes de evaluación en pacientes con sospecha de infecciones y resultan útiles para la confirmación de las mismas. Su fuerza radica en el hecho de ser procedimientos no invasivos que brindan información, tanto funcional como metabólica, en estadios tempranos del curso de la enfermedad.

La acumulación de FDG también en macrófagos activados y granulocitos convierten al PET en una herramienta de valor en pacientes con enfermedad inflamatoria. La localización del foco de inflamación en el tejido blando u óseo afectado, con la información anatómica adicional de la TC, es de gran interés. De esta manera, tendría su indicación ante la sospecha de EPOC en estadio inicial si la inflamación está activa.

La combinación del sistema multimodal PET-tomografía computarizada (CT) nos permite fusionar las imágenes anatómicas con las imágenes funcionales adquiridas. Las imágenes del CT nos proporcionan información adicional sobre la localización exacta de los procesos metabólicos identificados con el PET.

La combinación PET/TC permite determinar la infección y establecer en forma precisa su localización, facilitando así el diagnóstico y la guía para una estrategia de tratamiento

1.4.2.3 Diagnóstico por Imagen en Experimentación Animal.

En la última década se han adaptado las técnicas de diagnóstico por imágenes a la experimentación animal gracias a los equipos de tomografía microcomputarizada (micro-CT). Esta técnica es idónea para la evaluación de la función pulmonar ya que en particular en el pulmón, existe una diferencia de contraste entre aire y tejido pulmonar que permite cuantificar y comparar la función pulmonar de un mismo sujeto experimental. Además, permite realizar el seguimiento de la evolución animal *in vivo*, sin necesidad de sacrificar sujetos a lo largo del procedimiento experimental para verificar la correcta inducción de la enfermedad o el efecto de un nuevo fármaco en experimentación.

El micro-CT se emplea tanto en enfermedades agudas como crónicas, proporciona información complementaria a la evaluación histológica, dado que la técnica no es destructiva. También se emplean en estudios *in vivo* e *in vitro*. Los animales vivos evalúan la función pulmonar y los tejidos fijados se emplean para estudios estructurales. Recientemente los equipos de micro-CT se han combinado con la tecnología SPECT (Tomografía de Fotón Único) y Tomografía por Emisión de Positrones (PET) lo que permite fusionar imágenes anatómicas con imágenes funcionales capturadas al mismo tiempo además de la posibilidad de realizar estudios dinámicos.

1.4.3 Estadios de la EPOC 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 VEF_1/CVF postbroncodilatador excedía 0,70 en todos los grupos de edad, apoyando el uso de este ratio fijo [88].

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

1. INTRODUCCIÓN

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 (Figura extraída de Revisión GOLD, 2016 [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.

Definición de abreviaturas: EPOC: Enfermedad pulmonar obstructiva crónica; VEF₁: Volumen espiratorio forzado en el primer segundo; CVF: Capacidad vital forzada; Fallo respiratorio: Presión de dióxido de carbono en sangre arterial (PaCO₂) mayor que 6,7 kPa (50mmHg) al nivel del mar.

1.5 Patogenia de la EPOC: cambios patológicos y patofisiológicos

Este apartado presenta una visión global de la patogenia de la EPOC, describiendo de forma general los cambios patológicos observados.

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 [89]. 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].

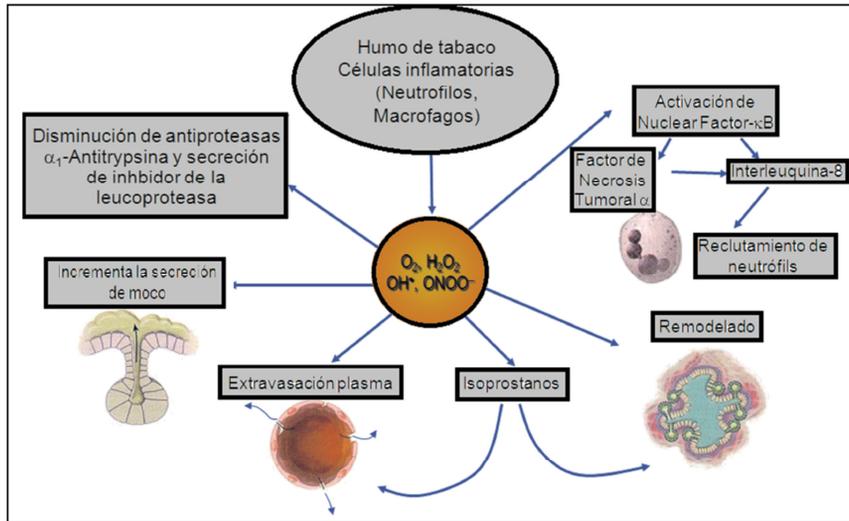


Figura 10. Las consecuencias adversas del estrés oxidativo en la EPOC (Figura adaptada de Barnes PJ, 2000 [90]).

Las células inflamatorias infiltradas también liberan enzimas proteolíticos 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 elastasa neutrofílica como las metaloproteinasas de matriz (MMP) destacan como importantes proteasas que contribuyen a la patogenia de la EPOC [91].

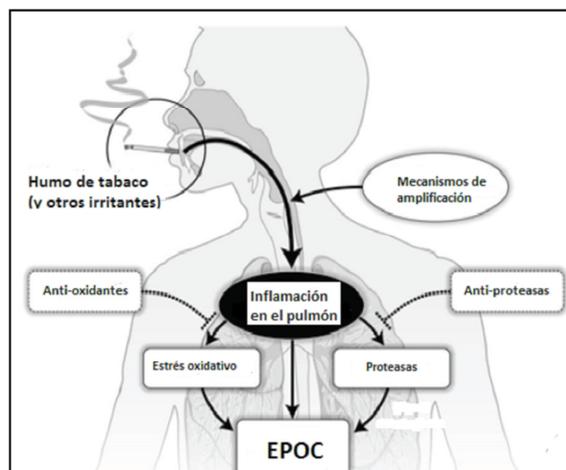


Figura 11. Patogenia en la EPOC (Figura extraída de Revisión GOLD [2]). El humo de tabaco y otro estímulos desencadenan una respuesta inflamatoria que, junto al estrés oxidativo y al daño proteolítico, contribuyen a los cambios patológicos que caracterizan a la EPOC.

1. INTRODUCCIÓN

Al considerar las células inflamatorias presentes en la EPOC, existen evidencias que indican que los neutrófilos son las principales células efectoras en esta enfermedad [92]. 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 CXCL8 y 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 [92].

- 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 [92].

Citocinas 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 proteín quinasa activada por mitógeno (MAPK) [92].
- 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 enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC).

	EPOC LEVE	EPOC SEVERA	EXACERBACIÓN EPOC
Neutrófilo	++	+++	++++
Eosinófilo	0	0	+
Mastocito	0	0	?
Macrófago	+++	++++	++++
Linfocito T	Tc1+	TH1+++ , Tc1+++ , TH17?	?
Linfocito B	+	+++	?
Célula dendrítica	+?	+?	+
Quimiocinas	CXCL8+, CXCL1+, MCP1	CXCL8++	CXCL8+++
Citocinas	TNF-α +	TNF-α ++	TNF-α +++
Mediador lipídico	LTB ₄ +	LTB ₄ ++	TNF-α +++
Estrés oxidativo	++	+++	++++

Definición de abreviaturas: EPOC: Enfermedad pulmonar obstructiva crónica; Tc1+: célula Tc1; CXCL8+: interleuquina 8; CXCL1+: Quimiocina CXC ligando 1; MCP1: Proteína 1 monoattractante de monocitos; TNF-α: Factor α de necrosis tumoral; LTB₄: Leucotrieno B₄; TH1: T helper type 1 ; TH17: T helper 17 .

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.

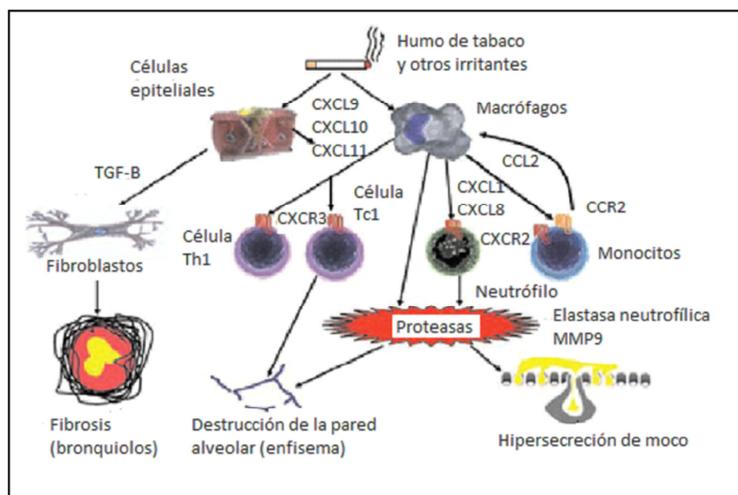


Figura 12. Mecanismos implicados en la inflamación presente en la EPOC. (Figura extraída de Barnes PJ, 2011 [74]). El humo de tabaco y otros irritantes activan a células epiteliales y macrófagos, que liberan diversos factores quimiotácticos que atraen células inflamatorias como: monocitos, neutrófilos 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 elastasa neutrofílica también causa la hipersecreción de moco. Además, las células epiteliales y los macrófagos también liberan factor de crecimiento transformante (TGF-β) que contribuye a la fibrosis de los bronquiolos.

1. INTRODUCCIÓN

Los cambios patológicos que se desarrollan en la EPOC afectan a las vías aéreas proximales y periféricas, al parénquima y a los vasos pulmonares [93], 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, folicúlos 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 13. Cambios patológicos en la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) (Figura extraída de Revisión GOLD [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:

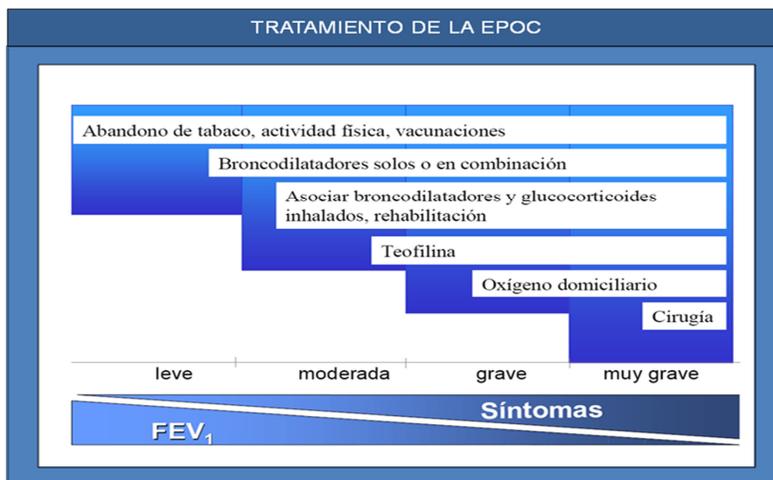
- Limitación del flujo aéreo, por obstrucción de las vías aéreas, que origina la hiperinflación de los pulmones por un vaciado inadecuado durante el proceso de espiración. El enfisema también contribuye en este proceso.
- Anormalidades en el intercambio gaseoso que resultan en hipoxemia e hipercapnia.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

1.6 Aproximaciones farmacológicas en la EPOC.

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 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 [94]. 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 [95]. 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 [94].

En este apartado se describe de forma general el tratamiento farmacológico de la EPOC y de forma más detallada a los corticosteroides por ser el grupo farmacológico objeto de estudio de la presente tesis doctoral, en concreto en situaciones de corticorresistencia.

Tabla 5. Tratamiento de la EPOC



1.6.1 Aproximaciones farmacológicas clásicas.

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

1. INTRODUCCIÓN

Tabla 6. Terapia farmacológica en cada estadio GOLD de la EPOC (Figura extraída de Revisión GOLD, 2016 [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
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.

Definición de abreviaturas: EPOC: Enfermedad pulmonar obstructiva crónica; VEF₁: Volumen espiratorio forzado en el primer segundo; CVF: Capacidad vital forzada; Fallo respiratorio: Presión de dióxido de carbono en sangre arterial (PaCO₂) mayor que 6,7 kPa (50mmHg) al nivel del mar.

Tal y como se observa en la tabla, los broncodilatadores inhalados de larga duración (agonistas β₂ 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 [96].

En la doble broncodilatación [223], se utilizan dos broncodilatadores dirigidos a dos tipos de receptores completamente distintos que actúan juntos para lograr cada uno un efecto en un lugar diferente de los músculos responsables de la obstrucción de las vías respiratorias, lo que aumenta el efecto broncodilatador. Algunas de las combinaciones de broncodilatación dual estudiadas fueron Indacaterol/Glicopirronio o Salbutamol/Ipatropio [224,225]. La doble broncodilatación mejora la función pulmonar, disnea, calidad de vida y previene las agudizaciones en la EPOC [223].

- **Agonistas β₂:** Los agonistas β₂ producen una relajación del músculo liso bronquial mediante la estimulación de los receptores β₂-adrenérgicos, que aumentan el

monofosfato de adenosina cíclico (AMPc) intracelular [97], produciendo un efecto antagonista sobre la broncoconstricción. Se distingue dos subtipos: acción corta o LABA (por su nombre en inglés, long-acting beta-agonists) (Fenoterol, Levalbuterol, Salbutamol, Terbutalina) y acción larga o LABA (por su nombre en inglés, long-acting beta-agonists) (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 [98]. Se distinguen dos subtipos: acción corta o SAMA (por su nombre en inglés, short-acting muscarinic antagonist) (Bromuro de Ipratropio, Bromuro de Oxitropio) y acción larga o LAMA (por su nombre en inglés, long-acting muscarinic antagonist) (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, una mejoría del aclaramiento mucociliar y una reducción de las agudizaciones [99]. Sin embargo, la teofilina, utilizada inicialmente como broncodilatador, ha sido relegada por sus modestos efectos comparados con otros broncodilatadores actuales. 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.
- **Inhibidores de fosfodiesterasa 4:** En los pacientes en estadio GOLD 3 y GOLD 4 con antecedentes de exacerbaciones y broquitis crónica, el inhibidor de la fosodiesterasa 4 rofumiflast, reduce las exacerbaciones combinado con corticoides orales. Dichos efectos también se observan cuando rofumiflast se agrega a broncodilatadores inhalados de acción prolongada; no se han publicado estudios comparativos con corticostereoides inhalados.
- **Corticosteroides orales:** En EPOC no se recomienda en tratamiento a largo plazo con corticosteroides orales.
- **Corticosteroides inhalados:** En los pacientes con EPOC y un $VEF_1 < 60\%$ del valor teórico, el tratamiento regular con corticosteroides inhalados mejora los síntomas, la

1. INTRODUCCIÓN

función pulmonar y la calidad de vida además de que disminuye la frecuencia de las exacerbaciones [2]. La terapia con corticosteroides inhalados se asocia a un incremento del riesgo de neumonía. En algunos pacientes el abandono del tratamiento con corticosteroides inhalados puede derivar en exacerbaciones. No se recomienda la monoterapia con corticoides inhalados a largo plazo.

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 patofisiología 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.

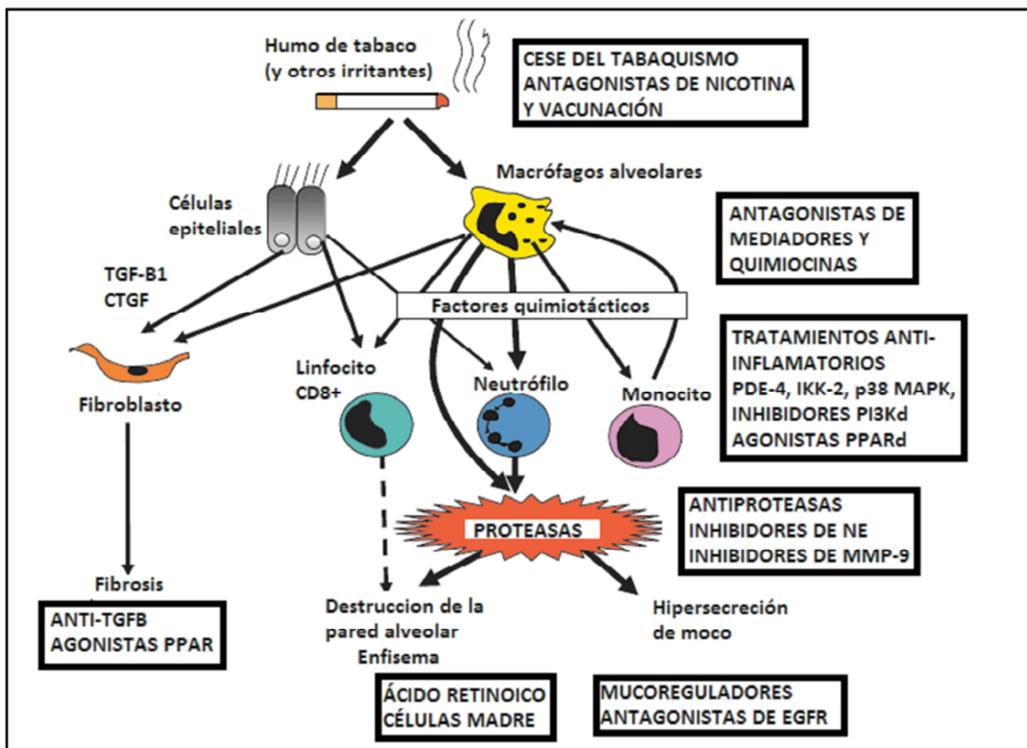


Figura 14. El conocimiento de los mecanismos moleculares y celulares implicados en la respuesta inflamatoria de la EPOC es clave para la identificación de nuevas dianas y el desarrollo de nuevas terapias (Figura adaptada de Barnes PJ, 2010 [95]). En la figura se resaltan algunos de los nuevos tratamientos anti-inflamatorios en desarrollo para la EPOC. Definición de abreviaturas: TGF-β1: Factor de crecimiento transformante β1; PPAR: Proliferador de Peroxisoma Activados los Receptores; PDE4: fosfodiesterasa 4; IKK-2: inhibidor del factor nuclear kappa-B quinasa subunidad beta; MAPK: Protein quinasa activadas por mitógenos; PI3Kd: fosfoinositol 3 quinasa; NE: elastasa neutrofílica; MMP-9: Metaloproteinasas de matriz 9.; EGFR: Receptor del factor de crecimiento epidérmico.

1.6.3 Corticosteroides.

La EPOC es una enfermedad que cursa con una reacción inflamatoria de las vías aéreas frente a factores desencadenantes como el humo de tabaco. De hecho, en el estudio anatomopatológico del lavado broncoalveolar de pacientes con EPOC se observa un incremento de macrófagos, neutrófilos y eosinófilos [205].

El uso de corticosteroides en el tratamiento de la EPOC resulta muy controvertido, existiendo claras discrepancias entre las distintas guías disponibles, no hay consenso sobre su papel en la terapéutica de la EPOC. Probablemente, su utilización en esta enfermedad, se base en la extrapolación de los resultados obtenidos con estos fármacos en el asma: enfermedad de base inflamatoria, en la que los corticosteroides inhalados han demostrado su eficacia en el control de la inflamación; si bien, ambos procesos difieren en su presentación clínica, sustrato inflamatorio y tipo de lesión histológica.

De hecho los principales estudios realizados sobre este tema ofrecen, por el momento, resultados contradictorios y poco concluyentes; no habiéndose observado que la administración de corticosteroides inhalados reduzca el número de células inflamatorias ni los niveles de citocinas en pacientes con EPOC. Siempre que esté indicada la prescripción de corticosteroides resulta preferible su utilización por vía inhalatoria, al presentar por esta vía mejor perfil de seguridad.

En pacientes con EPOC avanzada, los corticosteroides son de utilidad, en el tratamiento de las exacerbaciones. Cuando se utilicen durante un periodo largo de tiempo, la dosis empleada será lo más baja posible; siendo necesario controlar la aparición de osteoporosis y administrar un tratamiento preventivo, especialmente en los mayores a los 65 años. Los corticosteroides inhalados podrían adicionarse al tratamiento con broncodilatadores de acción prolongada en pacientes que presenten un VEF 50 % y que hayan tenido dos o más exacerbaciones en los últimos 12 meses.

1.6.3.1 Generalidades y estructura.

Los corticosteroides o corticoides son una variedad de hormonas del grupo de los esteroides (producida por la corteza de las glándulas suprarrenales) y sus derivados. Los cocorticoides son fármacos antiinflamatorios, antialérgicos e inmunosupresores derivados del cortisol o hidrocortisona, hormona producida por la corteza adrenal esencial para la adaptación al estrés [135]. Están implicados en una variedad de mecanismos fisiológicos, incluyendo aquellos que regulan la inflamación, el sistema inmunitario, el metabolismo de hidratos de carbono, el

1. INTRODUCCIÓN

catabolismo de proteínas, los niveles electrolíticos en plasma y, por último, los que caracterizan la respuesta frente al estrés [135].

Los corticoides son los antiinflamatorios más eficaces; son las únicas drogas activas en todas las etapas y en todo tipo de reacción alérgica, y son efectivos inmunosupresores. Sin embargo, también favorecen la diseminación de infecciones y por ello deben reservarse para aquellos casos en que otros fármacos son probablemente ineficaces o están contraindicados. Nuevas evidencias indican que los corticoides son más inmunorreguladores que inmunosupresores pues no anulan la secreción de ciertas citocinas (IL-4, factor estimulante de colonias macrófágicas y factor de crecimiento transformante- β); aumentan la expresión de correceptores para casi todas las citocinas (subunidad gp-130) y optimizan el curso temporal de la respuesta de los linfocitos T a la IL-2.

Los corticoides también producen efectos endocrinos y metabólicos [137, 138, 143], la mayoría son tiempo-dependientes pues aumentan su actividad ante exposición prolongada.

Una consideración especial merece el **surfactante pulmonar**; los glucocorticoides inducen quinasas específicas para síntesis de fosfolípidos en el pulmón gestante. El estrés parto desencadena la elevación de glucocorticoides maternos y éstos activan la maduración pulmonar para su adaptación aérea. En partos prematuros, la inyección de glucocorticoides acelera el proceso madurativo y en la mayoría de los casos revierte el distrés respiratorio del neonato (SDRI o enfermedad de la membrana hialina).

Tanto las hormonas corticoideas como los fármacos corticoideos atraviesan fácilmente la membrana celular por su alta liposolubilidad y se unen a receptores citoplasmáticos específicos. Estos se caracterizan por tener dos puntos de unión, uno al glucocorticoide y otro al ADN celular [142].

Con la unión el receptor éste se activa y se forma el complejo glucocorticoide-receptor activado que atraviesa la membrana nuclear, se une al ADN y como consecuencia estimula la transcripción de ARN mensajero a ARN ribosomal, que ejerce su acción en diferentes orgánulos celulares, activando o inhibiendo el funcionamiento de procesos enzimáticos celulares de acuerdo con el tipo de tejido donde ejercen su acción [140, 142].

Existen dos tipos de receptores nucleares a través de los cuales ejercen su acción los GC: el receptor glucocorticoide (GR, antiguamente llamado tipo II) y el mineralocorticoide (MR, antiguamente llamado tipo I). Los receptores MR tienen la misma afinidad por los gluco y los mineralocorticoides y no están tan ampliamente distribuidos como los receptores GR, que son exclusivos de los glucocorticoides y están presentes en las células de multitud de órganos, incluido el cerebro.

Receptor mineralocorticoide (MR)	Receptor glucocorticoide (GR)
Proteína 984 aa, pm 107 kDa, 2 isoformas: MR-A y MR-B (la B tiene 15 aa en el extremo N terminal por diferente promotor)	Proteína de 777 aa, pm 94 kDa, 2 isoformas: GR- α y GR- β (difieren en exón 9, la β tiene 15 aa menos en el extremo C terminal)*
Gen codificante NR3C2 en 4q31.1	Gen codificante NR3C1 en 5q31-32
Alta afinidad (Kd = 0.5-2 nM)	Baja afinidad (Kd = 10-20 nM)
<i>Ligandos endógenos:</i> Aldosterona, cortisol y corticosterona <i>Agonista:</i> Fludrocortisona <i>Antagonista:</i> Espironolactona	<i>Ligandos endógenos:</i> Cortisol y corticosterona <i>Agonista:</i> Dexametasona <i>Antagonista:</i> Mifepristona
Ubicación restringida: Tejidos de recuperación de Na ⁺ (TCD, colon, glándulas salivales) SNC (cortezas límbicas e hipotálamo)	Ubicación amplia en todos los tejidos
Ocupado casi todo (90%) a bajas concentraciones	Ocupado al pico matinal (30%) y casi todo (90-95%) bajo estrés

* se supone que GR- β es constitutivo nuclear y actúa como antagonista de GR- α , aunque nuevas evidencias indican que activa también otros genes.

Figura 15. Tipos de receptores glucocorticoides (Figura extraída de la revisión de Serra H. et al. [137])

La regulación promovida por los GC puede ser positiva si produce un aumento en la síntesis de una determinada proteína o negativa si la inhibe. Esta acción reguladora se ejerce mediante la interacción directa del GR con el ADN o con otras proteínas nucleares.

La estructura primaria de GR y MR muestra tres dominios [140, 141, 142]: el extremo N-terminal (NTD), la región intermedia o dominio de unión al ADN (DBD) y el extremo C-terminal o dominio de unión al ligando (LBD).

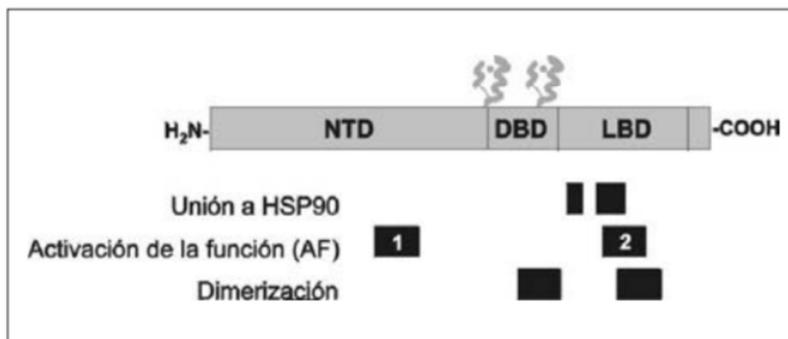


Fig 16. Estructura primaria del GR- α , mostrando los tres dominios funcionales: el NTD o dominio N-terminal que contiene la región de activación AF-1; el DBD o dominio de unión al ADN con los "dedos de zinc" característicos y que contiene las secuencias de dimerización y de localización nuclear (NLS), y el LBD o dominio de unión al ligando que contiene el bolsillo que encierra al corticoide, otra secuencia de dimerización y la región de activación AF-2. Los límites del bolsillo del ligando circunscriben los sitios de unión a chaperonas y hsp90. (Figura extraída de la Revisión de A. Serra et al.[135])

1. INTRODUCCIÓN

Existe diferencia de acción entre los distintos glucocorticoides, todos provocan el mismo efecto; sin embargo, cada uno tiene diferente potencia, latencia y duración de acción [137, 138]. Las modificaciones químicas, fundamentalmente la halogenación, reducen la potencia mineralocorticoide y aumentan la glucocorticoide; esto se correlaciona con la afinidad por sus receptores. De acuerdo al efecto terapéutico se clasifican como de acción:

- *Corta*, duración entre 6-12 horas: hidrocortisona.
- *Intermedia*, duración entre 12-36 horas: prednisolona, metilprednisolona, triamcinolona y deflazacort.
- *Prolongada*, duración entre 36-72 horas: dexametasona y betametasona.

Tabla 7. Potencias de algunos glucocorticoides de uso sistémico (Tabla extraída de la Revisión de Serra et al.[135]).

Fármaco	Potencia glucocorticoide	Potencia mineralocorticoide	Dosis equivalente (mg)
Cortisona	0.80	0.80	25
Hidrocortisona	1	1	20
Deflazacort	2.80	0	7
Prednisona	4	0.80	5
Metilprednisolona	5	0.50	4
Triamcinolona	5	0	4
Dexametasona	30	0	0.75
Betametasona	35	0	0.60

1.6.3.2 Mecanismo de acción.

Los glucocorticoides (GCs) son reguladores fundamentales de una amplia variedad de procesos, incluyendo la homeostasis metabólica, proliferación celular, respuestas inflamatoria e inmune.

Debido a su pequeño tamaño y a la naturaleza lipofílica, los Glucocorticoides difunden libremente a través de la membrana celular y se unen al Dominio de Unión del Ligando (LBD) de GR. Los GCs ejercen sus funciones mediante la unión a su receptor intracelular, el receptor de glucocorticoides (GR), que es un factor de transcripción inducible por ligando que pertenece a la superfamilia de receptores nucleares. En ausencia de su ligando, GR reside predominantemente en el citoplasma, donde está secuestrada en un complejo multimérico de chaperonas formado por la proteína de choque térmico o “heat-shock” 90 (hsp90), hsp70,

hsp90 de unión a proteína p23, inmunofilinas y otros factores que evitan su degradación y ayudan en su maduración. Tras la unión del ligando, GR se transloca al núcleo, donde actúa como un factor de transcripción homodimérico que se une al Elemento de Respuesta de Glucocorticoides (GRE) en regiones promotoras de genes GC-inducible o como una proteína monomérica que coopera con otros factores de transcripción para inducir la transcripción. Ambos procesos se denominan transactivación.

Además de la inducción y la transcripción de genes, GR monomérica también puede reducir la transcripción por la transrepresión, es decir, mediante la inmovilización de otros factores de transcripción, tales como el factor-kappa B nuclear (NF-kB) y activador de la proteína-1 (AP-1). Además, la represión de los genes reguladores de GC, como la osteocalcina, puede ser mediada por la unión de homodímeros de GR a GREs negativos (nGREs) en sus regiones promotoras. Aunque GR inactivo se encuentra principalmente en el citoplasma, no está estrictamente compartimentado. GR y otros receptores de esteroides (SR) son lanzados continuamente entre el núcleo y el citoplasma a través del complejo de poro nuclear (NPC). Ambas formas activadas por ligando y no activadas de GR son constantemente transportadas entre el núcleo y el citoplasma, lo que permite a GR actuar dinámicamente como un sensor. Sin embargo, es el ratio de importación y exportación lo que determina donde se encuentra mayoritariamente GR dentro de la célula [226].

Cuando GR se une a su ligando, varias quinasas pueden fosforilar bajo diferentes condiciones. Estas quinasas incluyen quinasas dependientes de ciclinas (CDK), glucógeno quinasa sintasa 3 (GSK3) y proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPKs). Las fosforilaciones pueden afectar positiva o negativamente a la translocación nuclear y a la actividad transcripcional de GR. Por ejemplo, Ser203 y Ser211 están fosforilados por CDK5 a una mayor medida en presencia de GCs, y esto conduce a una importación nuclear de GR y por lo tanto un aumento de su actividad de transcripción. Sin embargo la fosforilación de Ser226 por c-Jun N-terminal quinasa (JNK) regula negativamente la actividad de GR mediante el aumento de su exportación nuclear [226].

Además, la oxidación de GR también puede influir en su transporte nuclear, como sucede por la oxidación de cisteína 481, lo que dificulta su importación nuclear. Es probable que otras modificaciones después de la traducción puedan influenciar la localización de GR.

En general se ha creído que cuando GR se une a su ligando se disocia del complejo chaperona hsp90 de una manera dependiente de la temperatura y se mueve al núcleo. Sin embargo, estudios recientes contradicen esta teoría y sugieren que la disociación de la chaperona del complejo con GR no precede a la translocación nuclear, pero que se necesita el complejo

(MKP-1). Por ejemplo, en pacientes asmáticos tratados con budesonida inhalada aumenta la expresión de cremallera de leucina inducida por glucocorticoides. Estos efectos podrían contribuir a las acciones antiinflamatorias de corticosteroides mediante interacción GR con GREs negativos o GREs que cruzan el sitio de inicio de la transcripción podría suprimir la transcripción de genes, y este mecanismo podría ser importante en la mediación de los efectos de los esteroides

Los homodímeros en el núcleo siguen varios destinos [136, 138, 139, 143, 144]: Se unen a secuencias consenso sobre el ADN ubicadas unos 300 a 3 000 pares de bases corriente arriba desde el promotor de los genes regulables. La formación de dímeros se explica porque los consensos son palíndromos. Tal unión provoca:

Inducción de genes como anexina I (o lipocortina), proteínas del complejo IκB, enzimas gluconeogénicas (PEP carboxiquinasa), transaminasas, factores de transcripción, chaperonas, moléculas de adaptación, enzimas de síntesis de surfactante, receptores, transportadores y canales iónicos. En este proceso los GR-GR se unen a elementos de respuesta al glucocorticoide (GRE) provocando la apertura de la cromatina y la síntesis de mRNA.

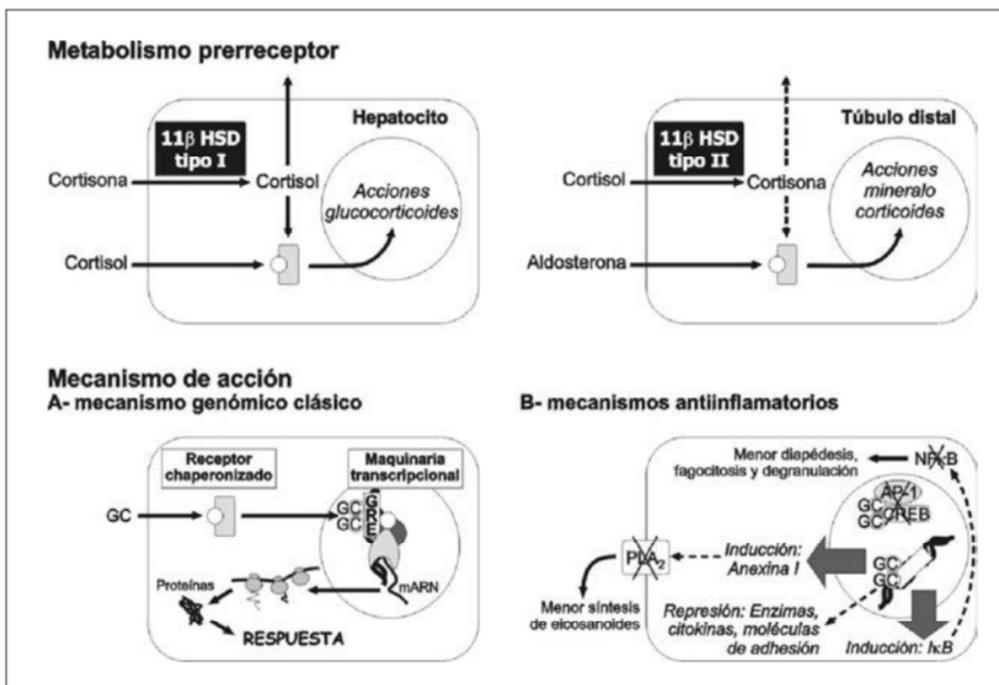


Fig. 18. Arriba: **Metabolismo prerreceptor y mecanismo de acción corticoide según los tejidos.** Las enzimas 11β-HSD activan o inactivan al cortisol (hidrocortisona); de esta forma la isoenzima II evita las acciones mineralocorticoides del cortisol a nivel del túbulo contorneado distal pues el MR es muy afín por la molécula mencionada. Abajo: **Un glucocorticoide -GC- (izquierda) se une a su receptor e inicia acciones genómicas al translocarse al núcleo,** esto induce o reprime genes de respuesta corticoide, como los vinculados a la inflamación (derecha), produciendo los efectos típicos de estos fármacos. AP- 1: Dímero c-fos/c-jun; CREB: Proteína de unión al CRE o elemento de respuesta al AMPc; GRE: elemento de respuesta glucocorticoide; IκB: Inhibidor del NFκB; NFκB: Factor nuclear κB; PLA2 : Fosfolipasa A2

1. INTRODUCCIÓN

1.6.3.2.2 Supresión génica.

La principal acción de los corticosteroides en la supresión de la inflamación es inhibir múltiples genes inflamatorios activados que codifican para citocinas, quimiocinas, moléculas de adhesión, inflamatorias, enzimas, y receptores. Estos genes inflamatorios son activados por factores de transcripción proinflamatorios, tales como el factor nuclear kB (NF-kB) y el activador de la proteína 1 (AP-1), ambos son por lo general activados en las vías respiratorias de los pacientes con asma y los pacientes con EPOC.

Interactúan con moléculas correpresoras para atenuar la asociada a NF-kB, invirtiendo así la acetilación de histona y la remodelación de la cromatina.

El GR es acetilado en la unión de corticosteroides, y esto parece ser necesario para la unión a GREs, mientras que necesita ser desacetilado por HDAC2 asociar con el complejo NF-kB y así suprimir los genes inflamatorios

También median la represión de genes como proopiomelanocortina, prolactina, somatotrofina, osteocalcina, proteínas de ritmo circadiano y de control del ciclo celular. Para esto, los GR-GR se unen a elementos de respuesta negativa al glucocorticoide (nGRE) que activa el empaquetado de la cromatina.

Inhibición de la producción y secreción de citocinas proinflamatorias como interleukina (IL)-1, IL-2, IL-3, IL-5, IL-6, IL-8, IL-12, factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interferón gamma (IFN- γ) y factor estimulante de colonias granulocíticas y macrofágicas (GM-CSF), por interferencia directa sobre las cascadas y mecanismos genómicos.

1.6.3.2.3 Otros mecanismos.

Los glucocorticoides, como otras hormonas esteroideas [148], muestran actividad no genómica [137]. Se deben la inhibición de:

- Acumulación de macrófagos y neutrófilos en focos inflamatorios, por reprimir la expresión de las moléculas de adhesión endoteliales y la síntesis del activador de plasminógeno.
- Síntesis y liberación de autacoides y de enzimas lisosomales en las reacciones de fase aguda.
- Degranulación y respuesta de los mastocitos a la IgE.
- Expansión clonal y citotoxicidad espontánea mediada por células T.

- Secuestran otros activadores transcripcionales como AP-1, CREB, STAT o NFκB, ocasionando una represión indirecta de ciertos genes proinflamatorios como ciclooxigenasa 2 (COX-2), óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y metaloproteasas.

Mecanismos adicionales pueden contribuir a las acciones de los corticosteroides. Los corticosteroides tienen efectos inhibitorios potentes sobre las vías de señalización MAPK a través la inducción de MKP-1, y esto podría inhibir la expresión de múltiples genes inflamatorios en pacientes con asma y EPOC. Algunos genes inflamatorios, tales como TNFα, suelen tener mRNA inestable que se degrada rápidamente por ARNasas específicas pero se estabilizan cuando las células son estimuladas por mediadores inflamatorios. Los corticosteroides revierten este efecto de manera que hay una rápida degradación de mRNA y una reducción de la secreción de proteínas inflamatorias.

Esto puede ser mediado a través de la expresión génica aumentada de las proteínas que desestabilizan los ARNm de las proteínas inflamatorias.

Es decir, la unión de estas moléculas al GRα induce su translocación al núcleo, donde dimeriza constituyéndose un factor de transcripción para el dominio de expresión del receptor de glucocorticoides. La unión a este dominio activa la transcripción de genes anti-inflamatorios e inhibe la de genes pro-inflamatorios.

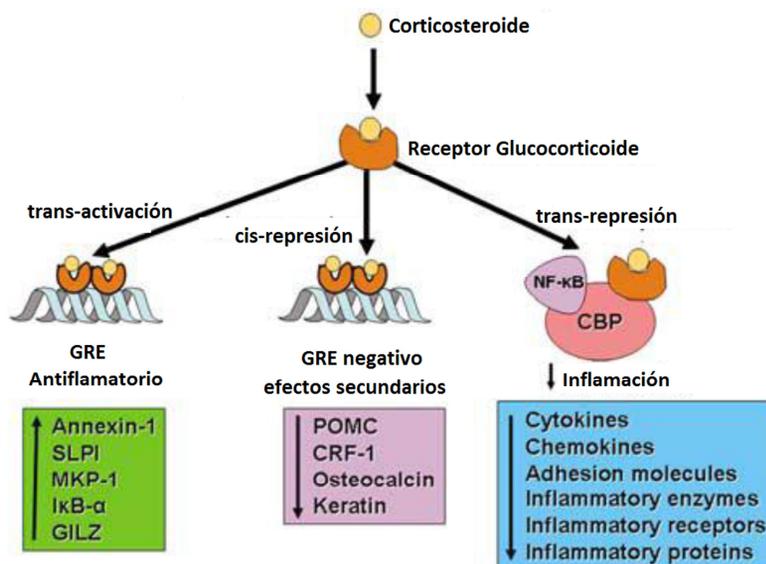


Figura 19 Los corticosteroides reducen la inflamación mediante activación o represión génica. El esquema representa las diferentes vías de transcripción génica por la que los corticosteroides ejercen su función anti-inflamatoria. Tras atravesar la membrana celular, el corticosteroide se une al Receptor de Glucocorticoides, que se transloca al núcleo y forma homodímeros. Estos homodímeros de GR se unen a los dominios GRE que codifica para proteínas anti-inflamatorias o bloquean a moléculas co-activadoras como CBP que transportan factores de transcripción pro-inflamatorios como NF-κB. Adaptado de la referencia

1. INTRODUCCIÓN

1.6.4 Tratamiento combinado corticosteroides/ broncodilatadores inhalados:

La combinación inhalada de corticosteroides con Agonistas- β_2 de acción prolongada es más efectiva que cualquiera de los dos componentes administrados individualmente para mejorar la función pulmonar, el estado de salud y para reducir las exacerbaciones en pacientes con EPOC de moderada a muy grave.

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 [100]. 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.

La combinación más común es Furoato de fluticasona (corticosteroide sintético trifluorinado con una potente actividad antiinflamatoria).con salmeterol o. (agonista selectivo β_2 -adrenérgico de acción prolongada (LABA)). El efecto farmacológico de los fármacos agonistas β_2 -adrenérgicos son al menos en parte atribuibles a la estimulación de la adenilato ciclasa intracelular, la enzima que cataliza la transformación de la adenosín trifosfato (ATP) a la adenosín monofosfato - 3',5' cíclico (AMP cíclico). El aumento en los niveles del AMP cíclico produce la relajación del músculo liso bronquial y la inhibición de la liberación de mediadores de la hipersensibilidad inmediata de las células, especialmente de los mastocitos.

Se han descrito en numerosos estudios [150,151,152] que se producen interacciones moleculares entre los corticosteroides y LABAs, por las que los esteroides activan el gen del receptor β_2 aumentando el número de receptores y la sensibilidad, y los LABAs preparan al receptor glucocorticoide para la activación dependiente de esteroides y aumentan la translocación nuclear celular. Estas interacciones sinérgicas se reflejan en un aumento de la actividad anti-inflamatoria, que se ha demostrado in vitro e in vivo en una variedad de células inflamatorias relevantes para la fisiopatología del asma y EPOC. En estudios de biopsias de las

vías respiratorias con furoato de fluticasona y vilanterol se ha demostrado también la sinergia entre corticosteroides y LABAs a las dosis clínicas de los medicamentos en pacientes con EPOC.

Los estudios TORCH [134] y UPLIFT [149] son, probablemente, los ensayos clínicos más ambiciosos realizados en la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). Desafortunadamente, los objetivos principales no se cumplieron. Comparado con placebo, la terapia combinada de salmeterol y fluticasona no redujo de forma significativa la mortalidad por todas las causas, y el tiotropio tampoco consiguió enlentecer el deterioro de la función pulmonar a lo largo de 4 años. Sin embargo, el análisis cuidadoso de los resultados minimiza la desilusión inicial e invita al optimismo moderado por cuanto ambos ensayos muestran una disminución en el número de exacerbaciones, una mejora en la calidad de vida relacionada con la salud (CVRS) y, en líneas generales, un buen perfil de seguridad a lo largo del tiempo. Además, se observan algunas señales beneficiosas en términos de supervivencia. Este aspecto abre nuevas expectativas por cuanto sugiere que más allá de la función pulmonar existen otras dianas terapéuticas de importancia pronóstica. Analizados en su conjunto, el estudio UPLIFT y el TORCH confirman y enfatizan el papel pivotal de los broncodilatadores de acción prolongada en el manejo de la EPOC. Los corticoides inhalados, administrados en monoterapia, aunque reducen exacerbaciones y mejoran la CVRS, no parecen aportar beneficios sobre la supervivencia y, por el contrario, incrementan el riesgo de efectos secundarios. No obstante, cuando se asocian al tratamiento broncodilatador, parecen potenciar sus beneficios.

El estudio TORCH (TOwards a Revolution in COPD Health) fue un gran estudio prospectivo y aleatorizado realizado en pacientes con EPOC. A parte de destacar por su objetivo principal: valorar los beneficios de la sinergia de corticosteroides inhalados con agonistas beta2, el estudio también destacó por ser la primera vez que se evaluó el impacto de un tratamiento, no sólo sobre el VEF1, sino también sobre la mortalidad, abriendo las puertas a un nuevo enfoque en el manejo de esta enfermedad.

Pese a esta escasa respuesta, una revisión reciente sugiere que los corticoides inhalados, solos o, más probablemente, en combinación con broncodilatadores beta-adrenérgicos de acción prolongada, pueden reducir la mortalidad global de los pacientes con EPOC hasta en un 27% [20]. El mecanismo de mejora no está establecido, sin embargo los autores sostienen que la reducción en el número de las exacerbaciones en pacientes con EPOC moderada y grave podría ser una explicación [153].

1. INTRODUCCIÓN

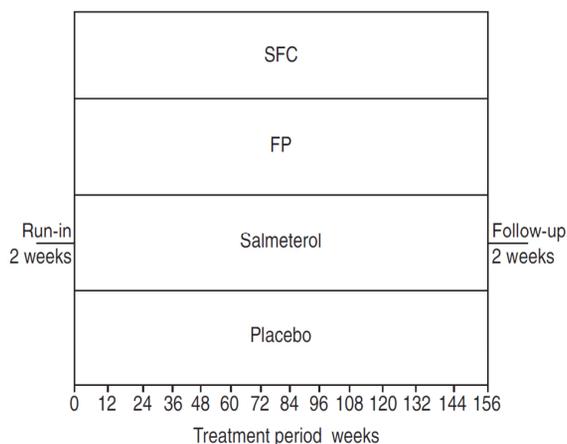


Figura 20. Diseño del estudio TORCH "TOwards a Revolution in COPD Health". Estudio de supervivencia. El objetivo de este estudio fue determinar el impacto de la combinación de salmeterol/propionato de fluticasona (SFC) y el uso individual de ambos fármacos por separado en la supervivencia de los pacientes con EPOC

Se trata de un estudio multicéntrico, aleatorizado, doble ciego, de grupos paralelos, controlado con placebo. En el que se incluyeron 6.200 pacientes con EPOC moderada a grave fueron asignados al azar tratamiento combinada SFC (50/500 mg), fluticasona, propionato de metilo (500 mg), salmeterol (50 mg) o placebo durante 3 años. El principal punto final fue la mortalidad por todas las causas; criterios secundarios de valoración fueron la morbilidad relacionada con la EPOC, tasa de exacerbaciones y el estado de salud.

1.6.5 Otros tratamientos farmacológicos.

1.6.5.1 Vacunas:

La vacunación puede reducir de manera significativa la morbimortalidad en pacientes EPOC en un 50% [206, 207] y es altamente recomendable en pacientes EPOC de avanzada edad [208]. Concretamente la vacuna neumocócica se recomienda en pacientes EPOC mayores de 65 años y ha mostrado una reducción de la incidencia de la neumonía comunitaria adquirida en pacientes más jóvenes de 65 años pero con un VEF1 predicho < 40% [209].

La vacuna para influenza virus también se ha asociado a una reducción en el riesgo de mortalidad de pacientes EPOC [210].

1.6.5.2 Terapia α 1-antitripsina

El tratamiento con AAT purificada es recomendado por las principales sociedades científicas (American Thoracic Society, European Respiratory Society y la Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica) en los pacientes con enfisema pulmonar con un déficit de AAT grave y con fenotipo homocigoto PiZZ o variantes raras deficitarias.

Sus criterios de inclusión y exclusión están bien definidos en las normativas específicas [211]. Se trata de un tratamiento muy caro y no disponible en todos los países, por eso previamente a su administración todo paciente con EPOC, y en especial si se trata de un fenotipo enfisema,

debe tener al menos una medición de sus concentraciones de AAT sérica para confirmar la idoneidad del tratamiento.

1.6.5.3 Antibióticos

Se ha demostrado que el uso de antibióticos de modo profiláctico en pacientes EPOC, no tiene ningún efecto sobre el número de exacerbaciones. Estudios basados en la eficacia de la quimioprofilaxis antibiótica durante los meses de invierno durante un periodo de 5 años concluyeron que no existen beneficios [212].

1.6.5.4 Mucolíticos

El empleo de agentes con acción mucolítica resulta un tema controvertido ya que aunque su uso pueda dar lugar a un ligero descenso del número de episodios de exacerbación en pacientes con EPOC, las evidencias disponibles en este sentido son limitadas [213, 214].

La utilización de mucolíticos podría considerarse, especialmente, en pacientes con EPOC estable que presentan tos productiva crónica, aunque al parecer los beneficios observados son escasos [215]. Reservándose el tratamiento continuado para aquellos pacientes que presenten una mejoría clínica evidente en términos de reducción de la frecuencia de tos y de la producción de esputo.

1.6.5.5 Agentes antioxidantes

Los antioxidantes y en particular N-acetil cisteína, han demostrado en estudios recientes que reducen la frecuencia de las exacerbaciones, su administración podría tener por tanto un importante rol en el tratamiento de pacientes con exacerbaciones recurrentes [216].

1.6.5.6 Antitusivos

La tos aunque es un molesto síntoma en los pacientes EPOC, posee un papel protector significativo [217]. Por ello, el uso regular de antitusivos en pacientes EPOC no está recomendado.

1.7 Corticorresistencia en la EPOC.

En muy raras ocasiones, los pacientes asmáticos son completamente resistentes a los corticosteroides, incluso en dosis orales altas. La mayoría de pacientes con Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC) (aunque hay algunos pacientes con “El síndrome del solapamiento”, aquellos que tienen características de asma y muestran una respuesta terapéutica a los corticosteroides) son resistentes incluso altas dosis de corticosteroides inhalados u orales. De hecho, hay algunas similitudes entre la inflamación de las vías

1. INTRODUCCIÓN

respiratorias observada en los pacientes con asma grave y aquellos con EPOC, lo que podría indicar que hay varios mecanismos comunes de resistencia a los esteroides entre estas dos enfermedades. La aparición de resistencia a los esteroides no se limita solo a patologías respiratorias sino que es una característica de varias enfermedades inmunes e inflamatorias, incluyendo artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria intestinal, y lupus sistémico [230].

Son múltiples los estudios que ponen en evidencia la pérdida de respuesta con el tiempo a los corticoides en varias enfermedades inflamatorias, entre ellas la EPOC. Cuatro grandes ensayos clínicos controlados de 3 años de duración en corticosteroides inhalados han demostrado poco efecto en reducir la progresión de la EPOC, puesto que no frenan, al menos de forma significativa, el descenso acelerado del FEV1, aunque hay una reducción en el número de exacerbaciones [154,157]. Ni los corticosteroides inhalados ni orales suprimen la inflamación en los pulmones, y los macrófagos alveolares parecen ser resistentes a los GCs. Además, se ha sugerido que la inflamación neutrofílica que caracteriza la EPOC, a diferencia de la inflamación que caracteriza el asma eosinofílica, es insensible a los GCs. La pobreza de estos resultados parece indicar una cierta resistencia activa de los corticoides en la EPOC, al menos a nivel pulmonar. De hecho, dosis altas de estas sustancias fallan en reducir citocinas y quimosinas [158].

Por otro lado como ya ha sido comentado, la combinación de un esteroide y de acción prolongada β 2-agonista se administra mediante inhalación son más eficaces que cualquier fármaco solo, y podría haber algo de sinergia molecular entre estos agentes.

Estudios recientes han propuesto la existencia de un perfil específico de mediadores inflamatorios moleculares que son resistentes al efecto de los corticosteroides. Entre el perfil molecular diferente, neutrófilos y monocitos humanos de pacientes sanos y EPOC pueden mostrar resistencia corticoide para la secreción y la Expresión de IL1 β , IL-8, IL-18, TNF, GM-CSF, CCL-5, MMP-2 y MMP -9 entre otros [232, 233].

1.7.1 Mecanismos de corticorresistencia.

Han sido identificados varios mecanismos moleculares que permiten explicar la pérdida de la eficacia antiinflamatoria de los corticosteroides.

Tabla 8. Mecanismos de corticorresistencia. ERK, Extracellular signal-regulated kinase; MAP, mitogen-activated protein; MIF, macrophage migration inhibitory factor; Treg, CD41 regulatory T cell. (Tabla modificada de la revisión de Peter J. Barnes [230])

Mecanismos moleculares de corticorresistencia en pacientes asmáticos y pacientes con EPOC
• Aumento de expresión de GRβ
• Modificación de GR
↑ Fosforilación ↓ Translocación nuclear
↑ p38MAPK α por IL-2 plus IL-4 or IL-13
↑ p38MAPK γ
↑ JNK1
↑ ERK
↓ MKP-1
↓ PP2A
Nitrosilación: ↑ NO a partir de la NO sintasa inducible
Ubiquitination: ↑ degradación por proteasoma
• Acetilación de histonas defectuoso
↓ acetilación de la lisina-5 en la histona 4 en pacientes con asma grave
↓ HDAC-2 en pacientes con EPOC, asma grave y fumadores
↑ Estrés oxidativo
↑ Activación PI3K γ
• Resistencia glucocorticoide familiar
• Mecanismos inmunitarios
↓ células Treg (↓ IL-19, ↓ Vitamina D3)
↑ TH17 (IL-17)
• Aumento de los factores de transcripción proinflamatorios
AP-1, JNK

1.7.1.1 Aumento de expresión de GR- β .

Los posibles mecanismos a los que se le ha atribuido la falta de respuesta a estos fármacos son múltiples. El primero en el tiempo sobre el que más se ha investigado se centra en las dos isoformas de los receptores GR. Existen dos formas de receptores GR α y β [165]. Ambas formas α y β -GR están presentes en todos los tejidos que se han investigado [166,167]; sin embargo la capacidad de unión de su ligando a GR α ha sido el objetivo principal de

1. INTRODUCCIÓN

investigación [165, 167]. Los niveles de expresión de GR varían entre tipos celulares y entre individuos, pero en todos los casos los niveles de expresión de mRNA α -GR han sido mayores que los observados en GR β [167]. Está descrito la existencia de dos isoformas de α -GR : $\alpha 1$ y $\alpha 2$, mediante Northern-blot se determinaron pequeñas diferencias en su estructura sin embargo la traslación de ambas tiene como resultado las mismas proteínas de GR. El hecho de que se expresen en muchos tipos celulares indica que juega un rol importante en la respuesta a glucocorticoides. Ha sido demostrado que GR β actúa como dominio negativo inhibiendo la transcripción de la actividad de GR α en un ratio menos a 1. Una expresión mayoritaria de β -GR-mRNA sobre α -GR-mRNA explicaría la pérdida de respuesta a corticoides en casos de corticorresistencia observados en asma y EPOC

Ya en 1998 S.H.Korn [164] y colaboradores demostraron como en células epiteliales bronquiales los niveles de ARNm de α y β -GR fueron más bajos en pacientes EPOC sin tratamiento con glucocorticoides (EPOC-GC) que en los pacientes control. Sin embargo los niveles de ARNm de GR fueron similares (ligeramente más altos) entre los pacientes EPOC que si fueron tratados con glucocorticoides (EPOC+GC) y el grupo de control.

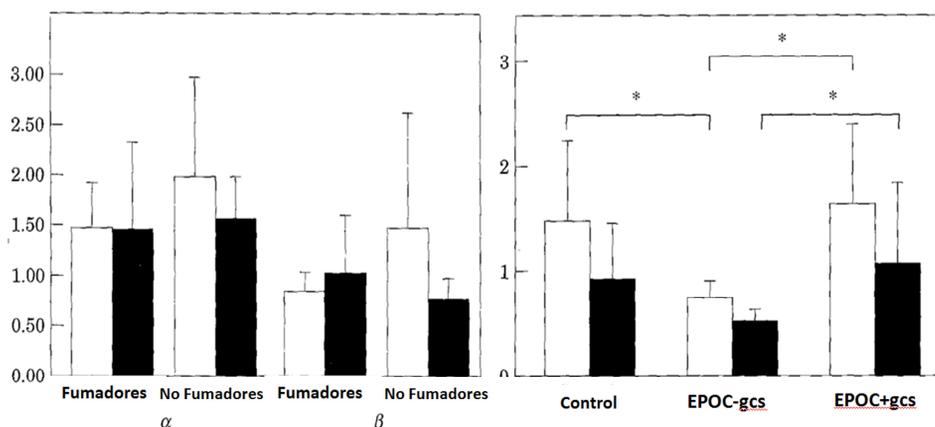


Figura 21. La expresión de GR-mRNA de células epiteliales bronquiales es menor en los fumadores y en pacientes EPOC. En pacientes EPOC tratados con glucocorticoides se produce un aumento de la expresión del receptor GR tanto α como β . Media \pm SD (figuras extraídas de la revisión de S.H. Korn y col. [164].

Jeffrey C. Webster [168] y colaboradores demostraron como las citocinas proinflamatorias regulan la expresión del gen del receptor de glucocorticoides y dan lugar a la acumulación de la isoforma β que es un modulador negativo. En este estudio utilizan dexametasona (uno de los fármacos empleados en el desarrollo de esta tesis doctoral) para estudiar el mecanismo de generación de resistencia a glucocorticoides. Debido a que

El aumento de expresión GR β ha sido descrito en pacientes con asma resistente a GC. GR β es inducida por citocinas proinflamatorias y tiene la capacidad de competir por la unión de GR α a GREs, actuando así como un inhibidor. También se incrementa por superantígenos microbianos, tales como enterotoxina estafilocócica, lo que podría dar cuenta de resistencia a los esteroides en algunos pacientes con asma. La activación excesiva de AP-1 podría ser un mecanismo de resistencia en pacientes asmáticos (y posiblemente de los pacientes con EPOC), ya que la AP-1 interacciona físicamente con el GR, de ese modo la prevención de su unión a GREs y otros factores de transcripción.

1.7.1.2 Modificación de GR.

Posteriormente se han ido identificado varios mecanismos moleculares distintos que contribuyen a la disminución de los efectos antiinflamatorios de los glucocorticoides. Otro mecanismo que puede desarrollar corticorresistencia es la falta de MKP-1. Se sabe que la MKP-1 es un inhibidor endógeno de varios MAPK que median parcialmente corticorresistencia. Los niveles de MKP-1 están disminuidos en pacientes asmáticos con respuestas pobres a glucocorticoides [229]. En este contexto, MKP-1 puede ser regulada por MIF que es una citoquina proinflamatoria que tiene efectos potentes anti-glucocorticoides.

A nivel respiratorio el fenómeno de resistencia a los corticoides ha sido ampliamente estudiado. En los pacientes con asma grave, han sido identificados varios mecanismos moleculares que podrían explicar la reducción de la respuesta a los corticoides, que incluyen disminución de la translocación nuclear del receptor de glucocorticoides (GC) α después de la unión de GC. Esto podría ser debido a la modificación de la GR por medio de la fosforilación como resultado de la activación de varias quinasas (p38 mitógeno-activada proteína quinasa α , p38 activada por mitógenos y proteína quinasa, y c-Jun N-terminal quinasa 1), que a su vez podría ser debido a la reducción de la actividad y la expresión de fosfatasa, tales como fosfatasa activada por mitógenos proteína quinasa 1 y la proteína fosfatasa A2.

Por otra parte, los glucocorticoides pueden ser el blanco de la glicoproteína-P que los transporta fuera de las células. Aunque la aparición de corticorresistencia se ha relacionado con la alta expresión de la glicoproteína P en algunas enfermedades inflamatorias, el papel de esta glicoproteína en enfermedades pulmonares es en gran parte desconocida [229].

En los pacientes con asma corticorresistente se sobreexpresa un GR defectuoso vinculante a una translocación nuclear deficiente. IL-2 e IL-4 se sobreexpresan in vitro en las vías respiratorias de pacientes corticorresistentes, estas citocinas reduce la translocación nuclear

1. INTRODUCCIÓN

de GR y la afinidad de unión dentro de los núcleos de linfocitos T. IL-13 imita este efecto en monocitos. El mecanismo por el cual estas citocinas reducen la función de GR parece estar mediado a través de la fosforilación del GR a través de p38MAPK, y su efecto es bloqueado por el inhibidor p38MAPK. El GR puede ser fosforilado por varias quinasas que pueden alterar su unión, la estabilidad, la translocación al núcleo, la unión a ADN y la interacción con otras proteínas, tales como factores de transcripción y chaperonas moleculares (figura 22). p38MAPK muestra un mayor grado de activación en los macrófagos alveolares de los pacientes asmáticos con una mala respuesta a los corticosteroides que en los de los pacientes que muestran una buena respuesta. Inhibidores selectivos de p38MAPK aumentan la capacidad de respuesta a los corticosteroides en los macrófagos alveolares en pacientes con asma severa. El inhibidor de p38MAPK ha demostrado inhibir fosforilación de la serina 226 (Ser226) por el GR, que es inducido por la exposición a IL-2 e IL-4.

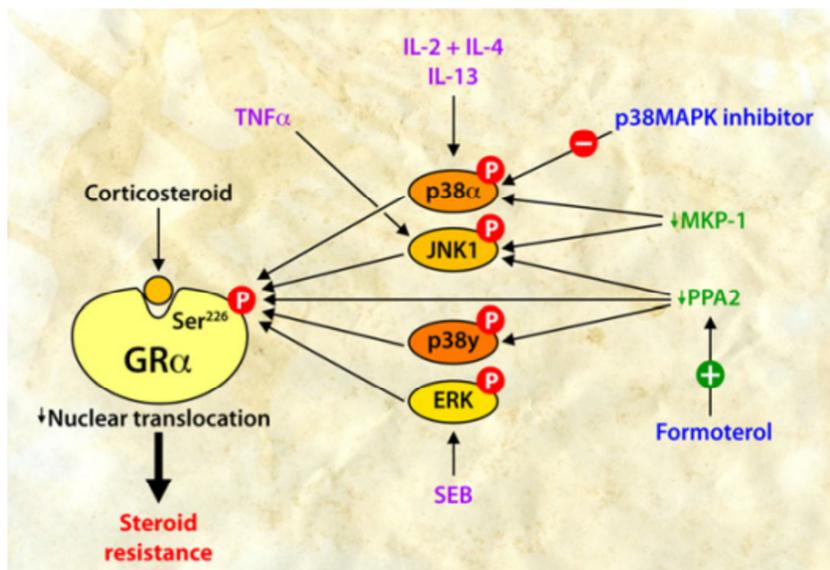


Figura 22. La fosforilación en la serina 226 GRA (Ser226) impide la translocación nuclear, que conduce a resistencia a los GC. El GR puede ser fosforilado por varias quinasas: p38MAPKa (P38A), que se activa por IL-2 e IL-4 o IL-13 e inhibida por los inhibidores de p38MAPK; JNK, que es activado por TNF- α ; p38MAPK-g (p38g), que también es activada por IL-2e IL-4; señal extracelular regulada quinasa (ERK), que se activa por estafilococos enterotoxina B (SEB). Estas quinasas se desfosforilaron por las fosfatasas MKP-1 y PP2A, ambos de los cuales son defectuosos en las células de pacientes con asma grave. PP2A se incrementa por el formoterol, LABA. (Figura extraída de la revisión de Peter J. Barnes et al [230]).

Otra quinasa MAPK, es la c-Jun N-terminal (JNK), que es activado por TNF- α y otras citocinas proinflamatorias, también fosforila directamente al GR Ser226 e inhibe la unión a GRE. Varios superantígenos microbianos, como la enterotoxina estafilocócica B, inducen resistencia a los GC en las células T in vitro a través de la activación de la vía extracelular regulada por es quinasa, lo que resulta en la fosforilación de GR. MKP-1, un inhibidor endógeno de la p38MAPK

y de las vías de JNK, se activa por los GC. Los macrófagos de los ratones knockout de genes muestran una reducción de MKP1 anti-inflamatorios respuestas a los corticosteroides *in vitro*. En macrófagos alveolares de pacientes con asma grave con reducidos la capacidad de respuesta de esteroides, hay una reducción significativa de MKP-1 expresión después de tratamiento con corticosteroides, que se correlaciona con aumento de la actividad de p38MAPK.

El Factor Inhibidor de la Migración de Macrófagos (MIF) es una citoquina proinflamatoria que tiene unos potentes efectos anticorticoides. Es inducida por los GC y parece inhibir sus efectos anti-inflamatorios, principalmente a través de la inhibición de la inducción de MKP-1. MIF también ha sido implicado en la patogénesis de la inflamación alérgica en modelos murinos y en la resistencia a los GC en pacientes asmáticos. Su papel en los pacientes con EPOC aún no se ha explorado.

1.7.1.3 Acetilación de histonas defectuosa.

Uno de los mecanismos más estudiados de corticorresistencia está relacionada con el estrés oxidativo en los pulmones y la consiguiente reducción en la actividad de la histona deacetilasa (HDAC)-2. Esto contribuye tanto a la mejora de la expresión de mediadores proinflamatorios y el deterioro de la capacidad de la GR α para reprimir la expresión de genes proinflamatorios. La reducción oxidante mediada por la actividad HDAC-2 es, en parte, resultado de una elevación en el fosfoinositol 3-quinasa delta (PI3K δ) [228]. El bloqueo de la vía PI3Kdelta restaura la función glucocorticoide tanto *in vitro* como en modelos *in vivo*, y en células primarias de la enfermedad.

La Histona desacetilasa HDAC2 regula los genes de transcripción a través de la eliminación del grupo acetilo de las histonas. Los glucocorticoides, el tratamiento más potente antiinflamatorio disponible para enfermedades inflamatorias, inhiben la expresión de genes inflamatorios mediante la contratación de HDAC2 a los genes activados. En los pulmones de pacientes que fuman y tienen enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) o asma, los glucocorticoides no son suficientemente eficaces para suprimir la inflamación de las vías respiratorias debido a la disminución del nivel HDAC2 causado por el humo del cigarrillo. Es conocido que la USP17 proteasa específica de ubiquitina interactúa con HDAC2. Deubiquitina y estabiliza el nivel de proteína de la HDAC2. En las células epiteliales y macrófagos de las vías respiratorias expuestas al extracto del humo de tabaco, HDAC2 está excesivamente ubiquitinizada y degradada en el proteasoma atribuido a la baja expresión de USP17. Por otra parte, la sobreexpresión en bloque de USP17 conlleva la destrucción de HDAC2 inducida por el

1. INTRODUCCIÓN

extracto de humo de cigarrillo. Estos resultados proporcionan una nueva visión de los mecanismos de resistencia a los glucocorticoides en la enfermedad inflamatoria de las vías respiratorias. Existen moléculas pequeñas que pueden inducir específicamente la expresión de USP17 podrían ser útiles en la reversión de la resistencia a glucocorticoides [227]. Por lo tanto, el estudio en condiciones de estrés oxidativo inducido por el humo del tabaco tanto in vitro como in vivo en un modelo animal en presencia de dexametasona puede ser de valor añadido para conocer más a fondo los mecanismos de corticorresistencia.

Otros mecanismos propuestos incluyen la expresión de GR β ya comentada anteriormente, que compite con GC y por lo tanto inhibe la activación de GR α ; se ha descrito que un aumento de la secreción del factor inhibidor de la migración de los macrófagos (MIF); competiría con la proteína activadora del factor de transcripción 1 produciendo una reducción de la expresión de la histona deacetilasa (HDAC) 2. HDAC2 parece mediar, tal como se ha descrito anteriormente, la acción de los esteroides para apagar genes inflamatorios activados, pero en pacientes con EPOC, pacientes con asma grave y fumadores, la actividad HDAC2 y la expresión se reducen por estrés oxidativo a través de la activación de fosfoinositida δ 3-quinasa.

Tal como se discutió anteriormente, la acetilación de histonas juega un papel crítico en la regulación de los genes inflamatorios y el mecanismo de acción de los glucocorticoides. Los GC activan genes como MKP1, a través de la acetilación de residuos de lisina específicos (K5 y K16) en la histona. En una pequeña proporción de pacientes con asma resistente a GC, el GR se transloca al núcleo normalmente después de la exposición dexametasona pero si no hay acetilación en K5 la transactivación de los genes no ocurre. Estos pacientes muestran una mala respuesta a altas dosis de corticosteroides inhalados, pero a diferencia de la mayoría de los pacientes con asma resistente a GC, parecen tener menos efectos secundarios porque muchos de ellos están mediados a través de la unión a GRE. El reclutamiento de genes por HDAC2 a los genes inflamatorios activados es el principal mecanismo de la represión de genes inflamatorios por los corticosteroides y reducción de la actividad HDAC2, y la expresión se reduce en algunas enfermedades en las que los pacientes responden peor. Se ha descrito una expresión disminuida de HDAC2 en macrófagos alveolares de las vías respiratorias de pacientes con EPOC y cambios similares se encontraron en macrófagos alveolares de pacientes con asma y en las vías respiratorias de los pacientes fumadores. La resistencia a los GC de los macrófagos broncoalveolares de los pacientes con EPOC es revocada por la sobreexpresión de HDAC2

1.7.1.3.1 Estrés oxidativo.

Son varios los estudios que establecen una correlación entre la aparición de corticorresistencia por mecanismos que ya han sido descritos y el estrés oxidativo producido por la exposición al humo de tabaco.

El estrés oxidativo se define por un desequilibrio oxidante-antioxidante. Desempeña un papel importante en la inducción y persistencia de daño a los tejidos en la EPOC [161]. Hay múltiples fuentes reactivas de oxígeno: ambientales (por ejemplo el humo del tabaco), locales, (macrófagos activados alveolares y neutrófilos) e intracelulares (metabolismo aeróbico controlado por la respiración mitocondrial). En este sentido, el estrés oxidativo es una respuesta adaptativa del sistema inmune mediada por el factor nuclear κB y activador de la proteína-1, con el fin de neutralizar agentes infecciosos y conservar el equilibrio redox intracelular, en particular a través del sistema de glutatión [162].

Sin embargo, el estrés oxidativo intenso y persistente en el tiempo perjudica la integridad del tejido a través diversos mecanismos, entre ellos el desequilibrio de proteasa / antiproteasa, la peroxidación lipídica y vascular produciendo un envejecimiento acelerado.

Especies reactivas de oxígeno están implicadas en: la hipersecreción de moco y alteración de la depuración mucociliar; la proliferación de fibroblastos y destrucción de la matriz extracelular; la apoptosis de células endoteliales; y la activación de la respuesta inflamatoria. Sin embargo, los mecanismos determinantes del control del balance redox tanto a nivel extra como intracelular, que implican la función mitocondrial y sistemas antioxidantes, son solamente parcialmente conocidos.

La susceptibilidad de ciertos genes y una respuesta insuficientemente antioxidante con niveles reducidos de moléculas anti envejecimiento están posiblemente involucrados en diversos grados en la progresión acelerada de la EPOC. De hecho, el estrés oxidativo del sistema respiratorio observado en la EPOC presenta ciertas similitudes observadas en el envejecimiento celular [163].

Las células inflamatorias (por ejemplo, los macrófagos alveolares) en pacientes con EPOC inducen la disfunción del sistema acetilasa/histona deacetilasa, que es sensible al equilibrio redox. Como consecuencia, la reducción de los niveles de la histona deacetilasa (HDAC) contribuyen a la alteración de la respuesta celular a los efectos antiinflamatorios de los corticosteroides, que ha sido observado en varios estudios in vitro

1. INTRODUCCIÓN

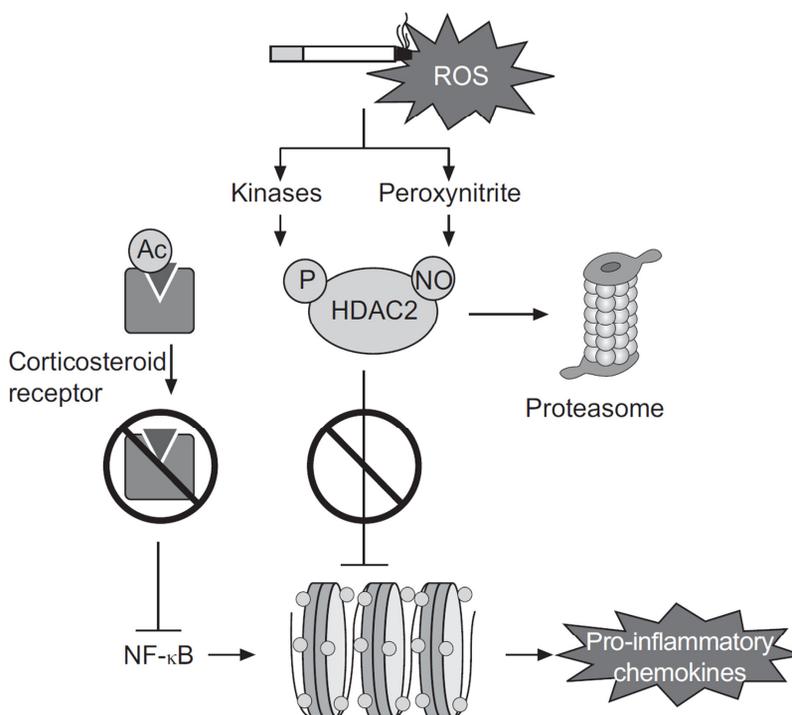


Figura 23. Esquema de estrés oxidativo y de uno de los principales mecanismos de corticorresistencia .(figura extraída de la revisión de N. Roche [160]) La estimulación de macrófagos alveolares por la vía proinflamatoria que activa el factor nuclear KB (NF) y otros factores de transcripción que a su vez activan la histona acetiltransferasa , que conduce a la acetilación de la histona y , posteriormente a la transcripción de genes que codifican la respuesta proinflamatoria mediante la liberación de quimiocinas . Los corticosteroides invierten este mecanismo mediante la unión a receptores de glucocorticoides y el reclutamiento de la histona deacetilasa (HDAC). En pacientes con EPOC, el humo del cigarrillo genera estrés oxidativo (actuando a través de la formación de peroxinitrito). Esto perjudica la actividad de HDAC2. En consecuencia, la respuesta inflamatoria a la activación de NF-kB se amplifica, y el efecto antiinflamatorio de los corticosteroides se reduce. (ROS : especies reactivas del oxígeno)

1.7.1.3.2 Importancia del humo del tabaco en la EPOC.

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 [154]. El efecto de humo de tabaco en los bronquiolos de pacientes con EPOC está siendo estudiado como diana para potenciales terapias [119], dado el creciente interés por el relevante papel de los bronquiolos en el desarrollo de esta enfermedad.

1.7.1.3.2.1 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 μm de diámetro, queda atrapada en dicho filtro [155].

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% [155]. 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%) [155].

La complejidad del humo de tabaco se refleja en la tabla 11 que muestra 3794 componentes del tabaco agrupados según sus grupos funcionales [156]. 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 9. Compuestos identificados en el tabaco y en el humo de tabaco. (Tabla extraída de Stedman RL, 1968 [156]).

Grupos funcionales	Número de compuestos en el tabaco	Número de compuestos en el humo de tabaco	Número de compuestos en el tabaco y en el humo de tabaco.
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 índoles	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. INTRODUCCIÓN

Sin embargo actualmente, se cree que el humo de tabaco contiene más de 6000 compuestos y que dicha cifra continuará creciendo paralelamente al desarrollo de nuevas técnicas analíticas

El humo de tabaco se podría separar en dos componentes; componente vapor y componente de partículas. El componente de vapor arbitrariamente es definido como aquella parte del humo en forma de aerosol capaz de atravesar un filtro de fibra de cristal de Cambridge. El componente particular es aquella parte que queda retenida en un filtro de fibra de cristal con un diámetro comprendido entre 0.1 - 1.0 μm

Sin embargo, esta definición no refleja en su totalidad las condiciones existentes en el humo de tabaco recién generado, porque algunos componentes se degradan o volatilizan en poco tiempo.

De todos los componentes existentes existen algunos altamente implicados en la fisiopatología de la EPOC tal y como se indica en la siguiente tabla.

Tabla 10. Agentes del humo de tabaco causantes de la EPOC

AGENTES CAUSANTES DE LA EPOC	
PATOLOGIA	AGENTES CAUSALES
EPOC	Cianuro de hidrógeno, Aldehídos volátiles, Óxidos de nitrógeno, Monóxido de carbono, Alquitrán

1.7.1.3.2.2 Especies Reactivas de Oxígeno (ERO), EPOC y Corticorresistencia.

El humo de tabaco promueve una potente reacción inflamatoria en las vías aéreas y los alveólos de fumadores, un proceso que conduce a la destrucción proteolítica alveolar o enfisema y al remodelando de las vías aéreas [49].

Las ERO, que incluyen el ión superóxido (O_2^-), el radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), juegan un papel central en una variedad de rutas de señalización intracelulares [91] que contribuyen de manera relevante a la formación y progresión del remodelado de las vías aéreas en patologías como la EPOC.

Las ERO participan como segundos mensajeros intracelulares siendo sintetizadas por el complejo adenina dinucleótido nicotinamida fosfato oxidasa (NADPH oxidasa). Las ERO intracelulares son capaces de fosforilar y activar diferentes proteínas intracelulares dando lugar a la transcripción de diferentes genes así como a la inducción de diferentes funciones celulares.

Numerosos estudios atribuyen a la inflamación un papel preponderante en la etiopatogenia de la enfermedad; no obstante, la complejidad de este proceso, en el que se incluyen diferentes tipos celulares y una amplia variedad de mediadores inflamatorios, es enorme. De hecho, la relación existente entre los diferentes tipos celulares, las citocinas y la secuencia de eventos que concluyen con la limitación al flujo aéreo, la destrucción del parénquima pulmonar y las manifestaciones extrapulmonares está por dilucidar. La constatación de que la EPOC es una enfermedad inflamatoria crónica compleja pasa por revisar cuáles son los principales hallazgos inflamatorios, evaluar su relación con las manifestaciones clínicas de la enfermedad, tanto pulmonares como sistémicas y, en última instancia, conocer el papel que desempeña el tratamiento antiinflamatorio

1.7.1.4 Predisposición genética.

La resistencia a los GCs parece ser más común dentro de las familias, lo que sugiere que los factores genéticos pueden determinar una peor respuesta a estos fármacos.

En pacientes con asma sensible a corticosteroides y pacientes con asma corticorresistente fueron identificados 11 genes que discriminaban entre estos pacientes [230], lo que indica que podría ser posible tener una prueba genómica para la resistencia a los GC. Debido a que el fenómeno de corticorresistencia es mucho mayor en EPOC que en asma sería de utilidad tener un marcador genético que nos permitiese identificar pacientes con una potencial resistencia a los corticoides y evitar así fracasos terapéuticos.

1.7.1.5 Mecanismos inmunitarios.

IL-10 es una citoquina antiinflamatoria e inmunorreguladora que es secretada por las células T reguladoras (Treg) en respuesta a GC. En los pacientes con asma resistente a GC IL-10 no es secretada por las células Treg, este proceso es restaurado por la vitamina D3 25-hidroxi (calcitriol), in vitro.

El número de células TH17 que secretan IL-17 y citocinas afines parece estar aumentado en pacientes con asma grave y EPOC y podría desencadenar procesos inflamatorios mediados por

1. INTRODUCCIÓN

neutrófilos. En ratones las células Th17 parecen ser resistentes a GC pero no han sido estudiados modelos en el contexto de patología de las vías respiratorias.

Estudios in vitro revelaron que IL-17 aumenta la expresión de GR β en las células epiteliales de las vías respiratorias y esta acción no es suprimida por exposición a GC.

Son múltiples los mecanismos de corticorresistencia que han sido estudiados, pero también son muchos los que se desconocen. A modo de resumen de los mecanismos descritos la corticorresistencia en EPOC se debe a:

- Isoformas del receptor de corticosteroides:
 - Disminución de los receptores isoforma α .
 - Aumento de los receptores de corticosteroides de la isoforma β .
 - Desequilibrio de la relación entre estas dos isoformas del receptor de corticosteroides.
- Incremento en la expresión de factores de transcripción proinflamatorios , tales como :
 - Factor nuclear kappa beta (NF - $\kappa\beta$)
 - Activador de la proteína - 1 (AP- 1)
- Modificaciones de los receptores de corticosteroides :
 - El aumento de la fosforilación de residuos disminuye la capacidad de translocación nuclear.

La fosforilación GR α en Ser226 contribuye a resistencia a los esteroides mediante la prevención de la traslocación nuclear. Este residuo se ha descrito para ser fosforilados por:

- La activación de mitógeno p38 activada MAP quinasa (p38MAPK) .
- Aumento de la quinasa regulada por señales extracelulares (ERK) .
- Aumento de la quinasa c - Jun N -terminal (JNK)
- Disminución de MKP1 .
- Defecto en la acetilación de histonas

1.7.2 Implicaciones terapéuticas de la corticorresistencia.

Una reducción en la capacidad de respuesta a los efectos antiinflamatorios de los corticosteroides es una barrera importante para la gestión eficaz de pacientes con asma grave y en la mayoría de los pacientes con Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC). Los mecanismos moleculares que conducen a la resistencia a los corticosteroides se comprenden mejor ahora, y esto ha identificado nuevos objetivos para la terapia. Está claro que hay varias

vías moleculares que llevan a cabo la aparición de corticorresistencia, lo que implica que puede haber varios enfoques terapéuticos para la superación de la resistencia a los esteroides y para tratar más eficazmente a te grupo de pacientes.

Se han desarrollado estrategias para la gestión de resistencia a los esteroides entre las que se incluyen fármacos anti-inflamatorios alternativos, un enfoque novedoso es revertir resistencia a los esteroides mediante el aumento de la expresión de HDAC2, que se puede conseguir con la teofilina e inhibidores de inhibidores de la fosfoinositida delta 3-quinasa (PI3K). Los agonistas beta2 de acción prolongada también pueden aumentar la capacidad de respuesta de esteroides mediante la inversión de la fosforilación GR α . La identificación de los mecanismos moleculares de la resistencia a los esteroides en pacientes asmáticos y pacientes con EPOC puede conducir a tratamientos antiinflamatorios más eficaces.

Una nueva estrategia para el tratamiento de pacientes con corticorresisncia es la reversión de la resistencia a los esteroides interfiriendo con las vías que la causan. La comprensión de estas vías ha puesto de relieve varios objetivos terapéuticos, tales como p38MAPK, como se discutió anteriormente. Tal vez el objetivo más atractivo es HDAC2 porque la restauración de HDAC2 mediante un vector plasmídico ha demostrado que restaura la sensibilidad a GC en los macrófagos de los pacientes con EPOC que son normalmente resistentes.

Otra estrategia popular para el tratamiento de asma severa y EPOC es el desarrollo de tratamientos antiinflamatorios de amplio espectro como una alternativa a los corticosteroides. Es muy difícil desarrollar estos medicamentos debido a los efectos secundarios sistémicos que producen al ser administrados por vía oral, lo que lleva a la búsqueda de fármacos que son eficaces a través de la vía inhalatoria. Entre ellos los inhibidores de la Fosfodiesterasa (PDE) 4 están en desarrollo clínico para el tratamiento de la EPOC y el asma severa, y el roflumilast oral ya está comercializado como el primer fármaco anti-inflamatorio para EPOC. Sin embargo, la dosis oral está limitada por los efectos secundarios que se deben también a la inhibición de PDE4, incluyendo náuseas, diarrea y dolores de cabeza. Varios inhibidores de p38MAPK han estado en desarrollo clínico y en teoría podrían ser particularmente eficaces porque la activación de p38MAPK parece reducir la capacidad de respuesta de esteroides en pacientes con asma y con EPOC. Inhibidores selectivos de p38MAPK están ahora en desarrollo clínico para EPOC y asma grave, pero la dosis está limitada por los efectos secundarios después de la administración oral. En pacientes con artritis reumatoide ha sido descrita una pérdida de eficacia (tolerancia) después de la administración prolongada, lo que sugiere que los inhalados también puedan desarrollarla [230].

1. INTRODUCCIÓN

El estrés oxidativo es un importante mecanismo que conduce a la aparición de resistencia a esteroides en pacientes con EPOC. En los fumadores se produce a través de la reducción en la expresión de HDAC2, lo que podría sugerir que los antioxidantes también deberían revertir la resistencia a corticosteroides. Actualmente los antioxidantes disponibles son poco eficaces porque se inactivan por el estrés oxidativo, pero hay un interés considerable en activadores del factor de transcripción como el factor nuclear derivado de eritroide-2 (Nrf2), que regula la expresión de varios genes antioxidantes. Nrf2 tiene una actividad marcadamente reducida en células de pacientes con EPOC y esto es vinculado a una expresión reducida de HDAC2, que normalmente mantiene esta proteína desacetilado y activa [230]. El sulforafano es un activador de Nrf2 y ha demostrado aumentar la expresión de HDAC2 y disminuir la resistencia a los esteroides en ratones expuestos al humo del tabaco y en macrófagos de pacientes con EPOC. La curcumina que se encuentra en la especie cúrcuma usada en el curry, también aumenta la expresión de HDAC2 después de que se haya reducido por estrés oxidativo y en concentraciones más bajas que las requeridas para lograr efectos antioxidantes.

Los macrólidos, incluyendo macrólidos no antibióticos también han logrado revertir la corticorresistencia a través de la inhibición de PI3K. Está bien establecido que la adición de los agonistas β_2 de acción prolongada (LABA) para los GCs mejora el control del asma en un grado mayor que ambos por separado incluso a dosis aumentadas. La evidencia acumulada sugiere que LABAs podrían mejorar la función de los corticosteroides mediante el aumento de la translocación nuclear del GR, aumentando así los efectos antiinflamatorios.

La fosforilación en GR Ser226 inducida en CMSP por IL-2 además de la estimulación de IL-4 se invierte por el formoterol LABA aunque la inhibición de la JNK1 y p38MAPK. Los efectos de formoterol pueden estar mediados por la activación de la proteína fosfatasa de fosfatasa A2, que invierte la fosforilación de la GR y JNK1. Sin embargo, este efecto de formoterol no es inhibido por antagonistas de los receptores β_2 in vitro, lo que sugiere un receptor independiente. LABA también podría revertir la resistencia a esteroides inducida por el estrés oxidativo a través de un mecanismo diferente que implica inhibición de la PI3K. Curiosamente, tanto formoterol y salmeterol restauran la capacidad de respuesta de esteroides en células de pacientes con asma grave, mientras que sólo el formoterol tiene este efecto en las células de pacientes con EPOC, lo que sugiere que el agonista completo efecto de formoterol en comparación con el efecto agonista parcial de salmeterol puede ser necesario invertir la resistencia esteroide cuando hay un mayor grado de estrés oxidativo. LABA también mejorar el aumento de expresión en MKP-1 inducido por esteroides, y más eficazmente la inhibición de p38MAPK y JNK, un efecto que es mediada por proteína quinasa A.

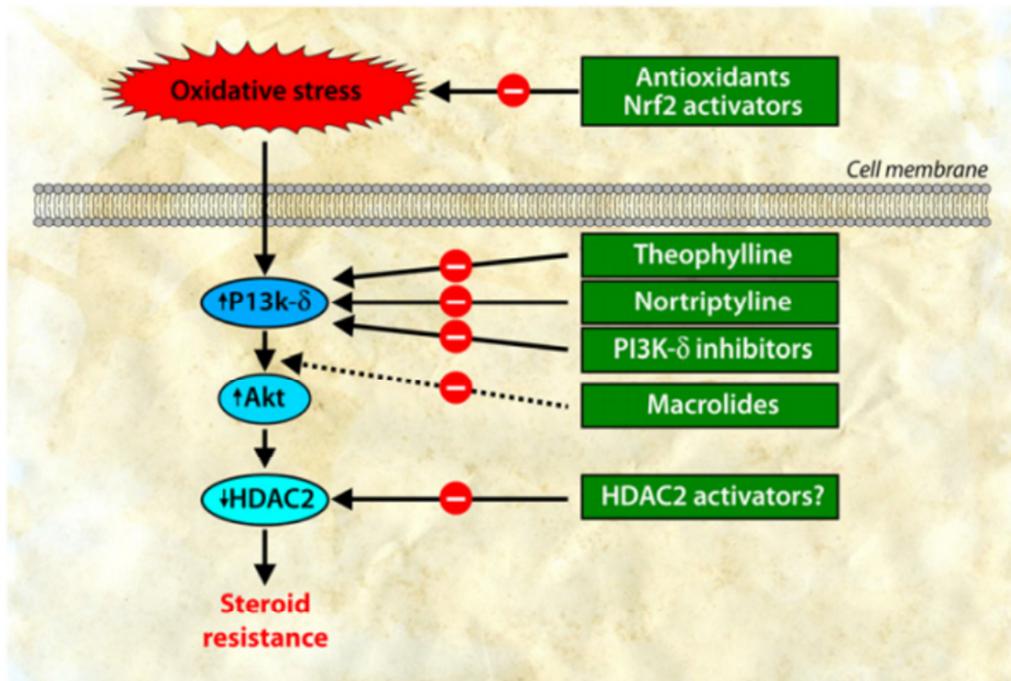


Figura 24. La resistencia a esteroides como resultado del estrés oxidativo puede ser revertida por varios fármacos que aumentan la expresión de HDAC2. Se aumenta la actividad HDAC2 por la teofilina y la nortriptilina que inhiben PI3Kd. También por antioxidantes, incluyendo activadores Nrf2, y por macrólidos, que se dirigen a la vía PI3K. En el futuro podrían ser descubiertos nuevos fármacos que activen directamente HDAC2.

Es necesario comprender los mecanismos moleculares mediante el cual los corticosteroides suprimen la inflamación para comprender los diversos mecanismos de resistencia a los esteroides en pacientes asmáticos y pacientes con EPOC. Otra de las estrategias posibles para combatirla sería mediante la regulación de ciertos genes que son inducibles por los glucocorticoides [230].

1. INTRODUCCIÓN

Tabla 11 Genes inducibles por corticoides cuya modulación podría combatir la corticorresistencia. AP-1: activador proteína-1; GPCR: receptor acoplado de proteína-G, LPS: lipopolisacárido, NF-kB: factor nuclear -kB, TLR4: toll-like receptor 4. (Tabla extraída y modificada de Thunicia Moodley [231])

Genes inducibles por glucocorticoides con potencial actividad terapéutica en la EPOC	
GILZ(TSC22D3)	Cremallera de leucina que codifica un gen miembro de la familia de dominio 3 (TSC22D3) inducida por glucocorticoides: es un gen inducible por glucocorticoides que inhibe la transcripción, tanto la actividad de NF-kB como de AP-1. Su expresión también puede ser modestamente mejorada por los LABA. Es conocido que la inducción de este gen suprime varios índices de inflamación
RGS2	Gen factor de crecimiento transformante β -estimulado: Codifica una proteína de activación GTPasa que se apaga por la señalización de GPCRs Gq-ligado. En el músculo liso bronquial, RGS2 es aumentada cooperativamente por glucocorticoides y LABA y ejerce un efecto broncoprotector; en epiteliales y otras células la expresión de RGS2 puede atenuar la liberación de mediadores proinflamatorios
CD200	Los macrófagos alveolares pulmonares tienen una alta expresión constitutiva de CD200R. La señalización a través de este receptor implica la interacción de células con otras células (por ejemplo los epitelios de las vías respiratorias) La expresión inducida por GCs se puede mejorar con agonistas afines como el formoterol y el roflumilast solos o combinados. Los estudios en ratones han demostrado que la interacción CD200/CD200R bloquea la activación de macrófagos como respuesta proinflamatoria y la generación de citoquinas. En las exacerbaciones agudas de la EPOC se activan, principalmente, por episodios prolongados de inflamación excesiva en respuesta a las infecciones bacterianas y virales. La regulación positiva farmacológica de CD200 en las células epiteliales de las vías respiratorias en la EPOC podría atenuar la inflamación y reducir la frecuencia de las exacerbaciones
CRISPLD2	Anteriormente se le atribuyeron otras funciones, recientemente se sabe que CRISPLD2 codifica como una proteína de secreción frente al estímulo de LPS en mamíferos (en seres humanos y ratones). Mejorar la inducción de la expresión CRISPLD2 podría contribuir a la reducción de exacerbaciones de EPOC producidas por infecciones con bacterias gram-negativas mediante la regulación negativa de TLR4 (mediadora de respuesta proinflamatorias).

Por todo esto, el grupo de pacientes corticorresistentes suponen un nuevo reto. Es por tanto relevante identificar grupos de pacientes que por los datos clínicos y analíticos puedan ser dirigidos hacia un determinado tratamiento, así como encontrar nuevos fármacos y dianas terapéuticas que mejoren la evolución de la enfermedad y la calidad de vida de estos enfermos.

1.8 Mucinas.

Las mucinas son una familia de proteínas de alto peso molecular y altamente glicosiladas producidas por las células de los tejidos epiteliales.

Se han distinguido al menos 22 genes humanos responsables de la codificación de mucinas por medio de la clonación de ADNc, de los cuales 16 han sido identificados en pulmón (MUC1, MUC2, MUC4, MUC5AC, MUC5B, MUC7, MUC8, MUC11, MUC13, MUC15, MUC16, MUC18, MUC19, MUC20, MUC21, and MUC22) [172,181-183].

Las mucinas están involucradas en la regulación de diversos procesos celulares tanto en condiciones normales como patológicas. La actividad y localización de las mucinas es mediada por varios mecanismos moleculares incluyendo, entre ellos, discretas interacciones con otras proteínas. Un conocimiento de las interacciones bioquímicas de las mucinas con otras proteínas, junto con una apreciación de su significado en situaciones patofisiológicas podría abrir la puerta al desarrollo de nuevos agentes terapéuticos [179].

La principal característica de las mucinas es su capacidad para formar geles; es por ello que son un componente clave en la mayoría de las secreciones con aspecto de gel, cumpliendo funciones que van desde la lubricación, la protección de superficies o la señalización celular pasando por la formación de barreras físicas y químicas donde con frecuencia juegan un papel inhibitorio [179]. Algunas mucinas se encuentran relacionadas con el control de la mineralización de tejidos, incluyendo por ejemplo la formación del nácar en moluscos, calcificación en equinodermos [169] y formación de hueso en vertebrados [170]. Estas proteínas cumplen también una función en el sistema inmune atrapando organismos patógenos. La sobreexpresión de mucinas, en especial de la MUC1 se encuentra asociada a muchos tipos de cáncer [171].

Basándonos en su localización subcelular, tenemos dos tipos de mucinas, las que son secretadas al espacio extracelular y las que están unidas a la membrana celular. Las mucinas secretadas (MUC2, MUC5AC, MUC5B, MUC6-8 y MUC19) carecen de un dominio transmembrana. Por otro lado están las mucinas ligadas a la membrana celular debido a la presencia de un dominio hidrofóbico que favorece su retención en la membrana plasmática (MUC1, MUC3, MUC4, MUC12-17 y MUC20) que son proteínas ancladas a la membrana tipo I, con un dominio de membrana que abarca una región NH₂-terminal extracelular (en contacto con el exterior actúa como sensor) y una región COOH-terminal intracelular con cola citoplasmática (CT), que actúa como receptor y permite su participación en la señalización intracelular [145]. Por lo tanto, estas mucinas unidas a la membrana no sólo modulan las interacciones extracelulares en las superficies celulares epiteliales sino que también participan en la señalización intracelular. Por el contrario, las mucinas secretadas son las glicoproteínas más abundantes en la composición del moco, siendo directamente responsables de sus propiedades viscoelásticas y de formación de gel.

Aunque todas las mucinas son codificadas por diferentes genes, comparten estructuras proteicas primarias con características similares.

Las mucinas maduras se encuentran compuestas por dos regiones bien definidas:

1. INTRODUCCIÓN

- Las regiones terminales amino y carboxilo se encuentran muy levemente glicosiladas, aunque son ricas en cisteína. Los residuos de cisteína participan en el establecimiento de enlaces disulfuro dentro y entre los monómeros de mucina.
- Una gran región central formada por múltiples repeticiones en tándem de 10 a 80 residuos donde al menos la mitad de los aminoácidos son serinas o treoninas. Esta área es modificada post-traduccionalmente por el agregado de cientos de residuos oligosacáridos unidos por enlaces O-glicosídicos. También es posible encontrar oligosacáridos unidos por enlaces N-glicosídicos, aunque en mucha menor proporción.

Tabla 12-: Mucinas, características y modulación por corticosteroides. (Tabla modificada de la revisión de 2014 de Peiró T. y col [204].)

Mucina	Tipo	Localización	Rol fisiológico y patológico	Efecto corticoesteroide
MUC 1	MT	<p>Pulmón y vías respiratorias (revestimiento de células epiteliales del pulmón y células alveolares tipo II) Mucosa nasal normal. Pólipos nasales.</p> <p>Otros: En casi todo el epitelio. En las células hematopoyéticas, células T activadas (linfocitos, células dendríticas). En esperma. En las células endoteliales de la córnea. Pecho. Páncreas</p>	<p>Responsable de la naturaleza viscoelástica de la mucosidad. Papel como barrera protectora contra los patógenos invasores y productos químicos: Ayuda en la depuración mucociliar de cuerpos extraños. Proporciona defensa de las vías respiratorias superiores e inferiores.</p> <p>Papel antiinflamatorio durante la infección de las vías respiratorias. Control de la respuesta inflamatoria a través de la inhibición de la señalización de los TLR.</p> <p>Asociado con diferenciación de células epiteliales (en el estómago, páncreas, pulmón, tráquea, riñón, glándulas salivares y mamas y el tracto reproductor femenino).</p> <p>Molécula asociada a ciertos tumores (frecuente sobreexpresión y glicosilación aberrante en muchos tipos de cáncer, incluyendo el de mama, páncreas, colon, pulmón y cáncer de endometrio). Promueve la metástasis del cáncer y la formación de tumores.</p> <p>Funciones de los diferentes segmentos de MUC1:</p> <p>-Ectodominio (anti-adhesivo, pro-adhesivo, hidratación y la lubricación de las superficies celulares, la señalización de ERBB). -Cola citoplasmática (transducción de señales y la transcripción; participación en el crecimiento y la proliferación celular, mecanismos de protección de las células, regulación de la apoptosis).</p>	<p>Sí</p> <p>Estudios in vitro : La dexametasona aumenta la expresión de MUC1 en células de líneas oncológicas. La dexametasona aumenta la expresión de MUC1 en las células epiteliales de las córnea humana</p> <p>Estudios in vivo : La terapia con corticosteroides aumenta la expresión de MUC1 en pólipos nasales.</p>

1. INTRODUCCIÓN

Mucina	Tipo	Localización	Rol fisiológico y patológico	Efecto corticosteroide
MUC 2	S	Pulmón y las vías respiratorias. Mucosa nasal normal. Pólipos nasales. Otro: Intestino (yeyuno , íleon ,colon).	Principal mucina secretada en el intestino grueso. Papel importante en: la defensa del huésped innata, la regulación de la secreción, procesos de absorción, resistencia a la colonización, mantenimiento de la integridad de la barrera de moco en el intestino grueso. La expresión de MUC2 se correlaciona con enfermedades, tales como colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn.	Sí Estudios in vitro : La budesonida inhibe la inducción de MUC2 por Mediadores de la inflamación en las células epiteliales de las vías respiratorias.
MUC 3	MT	Epitelio gastrointestinal (colon, intestino delgado, vesícula biliar)	Principal mucina secretada en el intestino grueso. Papel importante en: la defensa innata del huésped, la regulación de la secreción, procesos de absorción, resistencia a la colonización, Contribuyen en el mantenimiento de la integridad y a la protección de la barrera de moco en el intestino grueso La expresión de MUC3 se correlaciona con la aparición de enfermedades inflamatorias intestinales como colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn.	Sí Estudios in vitro : Los esteroides regulan al alza la expresión de MUC3 en células del cáncer de mama.
MUC 4	MT	En la superficie epitelial del pulmón y las vías respiratorias. En la mucosa nasal normal. Pólipos nasales. Otros: Epitelio (ojo, cavidad oral, glándulas lacrimales, glándulas salivares, cuello uterino, próstata, estómago, colon y glándula mamaria) .	Responsable de la naturaleza viscoelástica de la mucosidad. Papel como barrera protectora contra los patógenos invasores y productos químicos : ayuda en la depuración mucociliar de cuerpos extraños. Proporciona defensa de las vías respiratorias superiores e inferiores. Implicado en la progresión tumoral mediante la inducción de aumento del crecimiento, la proliferación y la supervivencia de la célula. La expresión aberrante en tumores de ovario y en lesiones pancreáticas malignas. Es frecuente un aumento de la expresión en cáncer de pulmón, mama y colon. Funciones de los diferentes segmentos MUC4 : -Ectodominio (Anti- adhesivo, hidratación y lubricación de la superficie celular, ERBB de señalización).	Sí Estudios in vitro : La dexametasona inhibe la expresión de MUC4 en poliposis nasal La dexametasona disminuye la expresión de MUC4 en las células epiteliales de la córnea humana. Efecto Inhibitorio de los corticosteroides en aumento de la expresión de mRNA de MUC4 en pólipo nasales. Estudios in vivo : La terapia con corticosteroides aumenta la expresión MUC4 en los pólipos nasales.
MUC5AC	S	Epitelio pulmonar y las vías respiratorias (células caliciformes) Mucosa nasal normal. Pólipos nasales. Otros: Ojos.	Principal mucina formadora de moco en el tracto respiratorio. Responsable de la naturaleza viscoelástica de la mucosidad. Protección y estabilización de la superficie ciliado Papel como barrera protectora contra los patógenos invasores y	Sí Estudios in vitro : La dexametasona disminuye la expresión de MUC5AC en células epiteliales humanas, en epitelio bronquial y en rata en células epiteliales

1. INTRODUCCIÓN

Mucina	Tipo	Localización	Rol fisiológico y patológico	Efecto corticosteroide
		Estómago	<p>productos químicos : Ayuda en la depuración mucociliar de cuerpos extraños .</p> <p>Proporciona defensa de las vías respiratorias superiores e inferiores. Contribuye a la función de la barrera defensiva y la reología del moco de las vías respiratorias.</p> <p>Marcador para la metaplasia de células calciformes.</p> <p>Asociado con enfermedades respiratorias, principalmente con asma.</p>	<p>de las vías respiratorias</p> <p>La budesonida inhibe la inducción de MUC5AC por mediadores de la inflamación en las células epiteliales de las vías respiratoria</p> <p>Estudios in vivo: Los corticosteroides disminuyen la secreción de mucina MUC5AC en pólipos nasales.</p>
MUC5B	S	<p>Epitelio pulmonar y de las vías respiratorias (glándulas submucosas)</p> <p>Mucosa nasal normal. Pólipos nasales.</p> <p>Otros: Glándulas salivales. glándulas submandibulares</p>	<p>De las principales mucinas formadoras de moco en el tracto respiratorio. Responsable de la naturaleza viscoelástica de la mucosidad. Protección y estabilización de la superficie ciliada.</p> <p>Papel como barrera protectora contra los patógenos invasores y productos químicos.</p> <p>Ayuda en la depuración mucociliar de cuerpos extraños.</p> <p>Proporciona una defensa de las vías respiratorias superiores e inferiores. Contribuye a la función de la barrera defensiva y la reología del moco de las vías respiratorias.</p> <p>Asociado con enfermedades respiratorias, principalmente con EPOC.</p> <p>Interacción entre MUC5B y diferentes proteínas salivales (Importante en el mantenimiento de la fisiología oral: mejora de la protección física, la integridad del esmalte)</p>	<p>Sí</p> <p>Estudios in vivo : Los corticosteroides disminuyen la secreción de mucina MUC5B en pólipos nasales.</p>
MUC6	S	Estómago, íleon, vesícula biliar. Pecho.	MUC6 se expresa en cáncer de mama: benigno y maligno	<p>Sí</p> <p>Estudios in vitro: Los esteroides regulan al alza la expresión de MUC6 en cultivos celulares en cáncer de mama.</p>
MUC7	S	<p>Pulmón y vías respiratorias. Mucosa nasal normal. Pólipos nasales.</p> <p>Otro: Glándulas salivales, sublinguales y glándulas submandibulares. glándula lagrimal .</p>	<p>Mucina secretada pero no formadora de gel.</p> <p>La interacción entre las mucinas y diferentes proteínas salivales son importantes en el mantenimiento de la fisiología oral (mejora de la protección física, la integridad del esmalte)</p>	Desconocido
MUC8	S	<p>Pulmón y vías respiratorias. Mucosa nasal normal. Pólipos nasales.</p>	<p>Sobreexpresión de MUC8 en los pólipos nasales.</p> <p>MUC8 como un marcador de células ciliadas en el epitelio nasal humano</p>	<p>Sí</p> <p>Estudios in vitro: Dexametasona suprime la expresión de MUC8 cultivos celulares de epiteliales nasales humanas</p>

1. INTRODUCCIÓN

Mucina	Tipo	Localización	Rol fisiológico y patológico	Efecto corticosteroide
MUC9	S y MT	Ovarios. Trompas de Falopio	MUC9 se expresa epiteliales de tumores de ovario. MUC9 o glicoproteína del oviducto (OVGP1) está presente en el suero de las mujeres con cáncer de ovario y se ha descrito como posible marcador de suero para la detección de cáncer de ovario	Desconocido
MUC10		Mucina submandibular.	Mucina salivar.	
MUC11	MT	Pulmón Otro: Colon Tracto reproductivo.		Desconocido
MUC12	MT	Estómago, colon, páncreas, próstata, útero.		Desconocido
MUC13	MT	Pulmón y vías respiratorias. Otro: Colon, tráquea, riñón, intestino, epitelio conjuntival.	Expresado de forma aberrante en cáncer gástrico, colorrectal, de ovario, páncreas, pulmón y carcinomas de ovario. La sobreexpresión de MUC13 aumenta el crecimiento celular, la formación de colonias, la migración celular y la invasión.	Desconocido
MUC15	MT	Pulmón y vías respiratorias. Otros: Colon, intestino delgado, próstata, placenta, glándulas salivares, glándula tiroides, moderadamente en el riñón, epitelio conjuntival.	La expresión aberrante de MUC15 se correlaciona con el desarrollo de adenocarcinoma de colon. MUC15 es un potencial marcador de malignidad y de pronóstico en carcinoma papilar de tiroides.	Desconocido.
MUC16	MT	Células epiteliales superficiales de pulmón y vías respiratorias Pólipos nasales. Otros: El epitelio de la superficie ocular, órganos reproductivos y mesotelio que recubre las cavidades del cuerpo (cavidad pleural, peritoneal y pélvica). epitelio conjuntival.	Papel como barrera protectora contra los patógenos invasores y productos químicos. Sobreexpresado en el cáncer de ovario y de endometrio. Marcador en suero para el cáncer de ovario (CA 125) .	Sí Estudios in vitro: Dexametasona regula al alza la expresión de MUC16 en células epiteliales de la córnea humana. La dexametasona aumenta la expresión de MUC16 en pólipos nasales.
MUC17	MT	Tracto gastrointestinal (duodeno, colon, estómago) epitelio conjuntival.	MUC17 tiene un papel en la protección de la mucosa intestinal contra patógenos lumbinales. MUC17 se expresa en células de absorción intestinal en cáncer de páncreas y cáncer de colon. La expresión aberrante de MUC17 se correlaciona con adenocarcinoma ductal de páncreas.	Desconocido

1. INTRODUCCIÓN

Mucina	Tipo	Localización	Rol fisiológico y patológico	Efecto corticosteroide
MUC18	MT	Pulmón y vías aéreas. Otros: Mama	Se ha demostrado que MUC18 tiene un papel en la promoción de las metástasis en varios tumores, como el cáncer de mama y melanoma por el aumento de su motilidad, invasión y la tumorigénesis. MUC18 amplifica la inflamación pulmonar durante la infección bacteriana.	Desconocido
MUC19	S	Pulmón y vías respiratorias (tráquea) Otros: Glándula salival.	Mayor mucina de la glándula salival.	Desconocido
MUC20	MT	Pulmón, vías respiratorias. Otros: Placenta, colon, próstata, hígado	Aumentado en patología renal.	Desconocido.
MUC21	MT	Pulmón y vías aéreas.	MUC21 modula la adhesión celular Marcador para adenocarcinomas de pulmón.	Desconocido.
MUC22	MT	Pulmón y vía aéreas		Desconocido

Abreviaturas: MT: Membrane-tethered (Mucina de membrana); S: Mucina Secretada.

Las mucinas presentan una sobreexpresión en enfermedades pulmonares tales como el asma, bronquitis, EPOC, o fibrosis quística. Dos mucinas de membrana, MUC1 y MUC4 han sido extensivamente estudiadas en relación a su implicación patológica en el proceso de estas enfermedades [176-178]. Las mucinas se encuentran bajo investigación como posibles marcadores diagnósticos para la ocurrencia de procesos malignos y otras enfermedades en los cuales se presenta una producción excesiva o aberrante de las mismas.

Bajo estímulo la proteína MARCKS (myristylated alanine-rich C kinase substrate-sustrato para la kinasa C rica en alanina miristilada) se coordina la secreción de mucina a partir de las vesículas llenas de mucina presentes dentro de las células epiteliales especializadas [173]. La fusión de estas vesículas con la membrana plasmática provoca la liberación de la mucina, al tiempo que el intercambio de Ca²⁺ por Na⁺ aumenta unas 600 veces. El resultado es un producto viscoelástico formado por un entretrejido de moléculas de mucina, las cuales combinadas con otras secreciones (por ejemplo las producidas por el epitelio respiratorio y las glándulas submucosas) forman el moco [174, 175].

Basándose en la localización anatómica en el organismo así como en la compleja estructura de las mucinas, se sugirió hace bastante tiempo las propiedades multifacéticas del moco, necesarias para la defensa del huésped: antimicrobianas, antiproteasas, antioxidantes y antiflamatorias [184] Jacquot et al. fueron los primeros en demostrar las propiedades de las mucinas en las

secreciones de las vías aéreas. Las mucinas de las vías aéreas son extremadamente hidrofóbicas. Recientes análisis proteómicos de las mucinas revelaron que están estrechamente asociadas con varias proteínas con las que comparten propiedades [185, 186].

Las principales mucinas secretadas en las vías aéreas son la MUC5AC y MUC5B, mientras que la MUC2 se secreta principalmente en intestino aunque también en pequeña proporción en las vías aéreas.

MUC5AC y MUC5B son las mucinas principales productoras de gel en las vías aéreas y por lo tanto ambas contribuyen como barrera defensiva además de tener un papel regulatorio de los fluidos de las vías aéreas [180]. MUC5B es una mucina de las glándulas submucosas. MUC5AC ha sido usada como marcador de metaplasia celular. Ambas son producidas también por células calciformes. Aunque el papel exacto de ambas en las vías aéreas tiene que ser completamente dilucidado, se ha sugerido que durante la inflamación de las vías aéreas es inducida la expresión de MUC5AC, [187] mientras que la expresión de MUC5B es constitutiva [187, 188]. También se ha demostrado que MUC5AC está más asociado con asma [186, 188, 190] mientras que MUC5B con EPOC [191]. La sobreproducción de moco es un factor que contribuye a la progresión de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). Se ha demostrado que la composición polimérica de mucina o las propiedades son diferentes en el esputo de individuos con EPOC y los fumadores sin obstrucción del flujo aéreo.

La eliminación del moco es la primera barrera defensiva de unas vías aéreas normales frente a patógenos transportados por el aire y frente a contaminantes. Sin embargo, la hipersecreción de moco, una característica importante de la EPOC, contribuye a la progresión de la enfermedad. Las recetas de algunos medicamentos mucolíticos como N-acetilcisteína y la carbocisteína, han demostrado beneficios en el tratamiento de la EPOC. Las mucinas constituyen los principales componentes sólidos del moco, proporcionándole sus propiedades viscosas y elásticas permitiendo su función defensiva. Las principales mucinas expresadas en las vías aéreas son: tres mucinas ancladas a membrana (MUC1, MUC4, y MUC16) y tres mucinas secretadas formadoras de gel (MUC2, MUC5AC, MUC5B y). A pesar de que la sobre-expresión de mucinas ancladas a membrana se ha observado en los pulmones de paciente con EPOC, por el momento no ha sido evaluado de qué forma específica afecta a la EPOC. Se han estudiado los múltiples efectos de MUC1: efectos inmunosupresores, adhesión-bacteriana, anti-inflamatorios y tumorigénicos. Todo ello sugiere que MUC1 puede contribuir a inmunosupresión, remodelación de las vías aéreas, obstrucción de moco, colonización bacteriana y la alteración de la integridad del epitelio en la EPOC. La regulación de la síntesis de mucina y la secreción se entiende cada vez mejor. La sobre-expresión de mucinas en la

1. INTRODUCCIÓN

EPOC es causada probablemente por una combinación de productos microbianos, contaminantes ambientales y mediadores de la inflamación. Además son necesarios estudios posteriores para determinar la función individual y la señal regulatoria de cada mucina en las vías respiratorias y en la EPOC, para poder conocer mejor el mecanismo de la enfermedad y el desarrollo de nuevas terapias.

Un polimorfismo del promotor de MUC5B está asociado con fibrosis pulmonar. Con la aparición de los ratones Knockout tanto para MUC5AC como para MUC5B se espera que sus papeles se conozcan más detalladamente.

1.8.1. MUC1.

MUC1 suele representar mucina humana mientras que Muc1 se utiliza para animales, aunque es habitual que estos términos se utilicen indistintamente.

Es una mucina anclada a la membrana localizada en la superficie de las mucosas de células epiteliales y células hematopoyéticas. Su expresión también ha sido demostrada en células endoteliales corneales. El papel de MUC1 en oncología ha sido muy estudiado. Ha sido documentada la expresión de MUC1/Muc1 en tejidos pulmonares, en células epiteliales de las vías respiratorias y en células alveolares tipo II [193]. MUC1 también se expresa en las células epiteliales de la superficie apical de revestimiento del pulmón

MUC1 fue el primer gen de mucinas clonado [192, 193] como antígeno oncológico. Está establecido que MUC1 se sobreexpresa y está aberrantemente glicosilada en diferentes adenocarcinomas. Está compuesta por compuesta por dos subunidades asociadas no covalentemente: subunidad N-terminal, conteniendo un VNTR de 20 aminoácidos altamente glicosilados y la subunidad C-terminal compuesta de un corto dominio extracelular, un dominio transmembrana, y una cola citoplasmática de 72 aa. La porción glicosilada extracelular media las propiedades antiadhesivas de las células que la expresan. La cola citoplasmática tiene sitios de unión para Grb2/Sos y β -catenina pudiendo ser fosforilada por quinasas incluyendo el receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR), c-Src y GSK-3 β . Al fosforilarse, secuestra β -catenina disminuyendo su disponibilidad para unirse a E-caderina, y por lo tanto inhibe la adhesión celular mediada por esta [234]. En cáncer de mama, se ha visto que MUC1 puede estimular la vía de señalización de ErbB1 al inhibir su ubiquitinización y degradación, y al favorecer su internalización y reciclaje. Indirectamente al estimular la interacción MUC1-Erb, se activan las quinasas reguladas por señalización extracelular (Erk 1 y 2), aumentando la proliferación celular. MUC1 también puede regular la señalización de la ERK al modular la

transcripción de genes para MEK1, Raf1 y c-jun. La fosforilación de la cola citoplasmática también se asocia a la señalización por la vía de la protein-quinasa activada por mitógenos (MAPK). Recientemente se ha revelado que la cola citoplasmática se puede unir directamente a diversos efectores relacionados a la transformación maligna tales como el p53, receptores de estrógenos α , inhibidor de las kinasas Kb y proteínas de choque térmico [234,235].

Ha sido demostrado el papel antiinflamatorio de MUC1 mediante un proceso de inhibición de señalización de los TLR (Toll-like-receptor) [194]. Desde que el estímulo desencadenante de un proceso inflamatorio es inducido se activan los Toll-like-receptor (TLR5) [195]. Ambos TLR5 y MUC1 están presentes en la superficie de revestimiento de las vías aéreas, ha sido postulado que la presencia de MUC1 suprime la señalización de TLR 5. Este efecto inhibitorio de MUC1 fue demostrado en cultivo celular de células epiteliales pero no solo sobre TLR 5 sino también sobre los otros TLR incluyendo TLR 2, 3, 4, 7 Y 9 [196]. Esto sugiere que MUC1 puede ser un regulador negativo de la señalización de TLR.

Además el efecto antiinflamatorio de MUC1 no requiere de la molécula entera, solamente es necesario el dominio citoplasmático de MUC1 [194, 197].

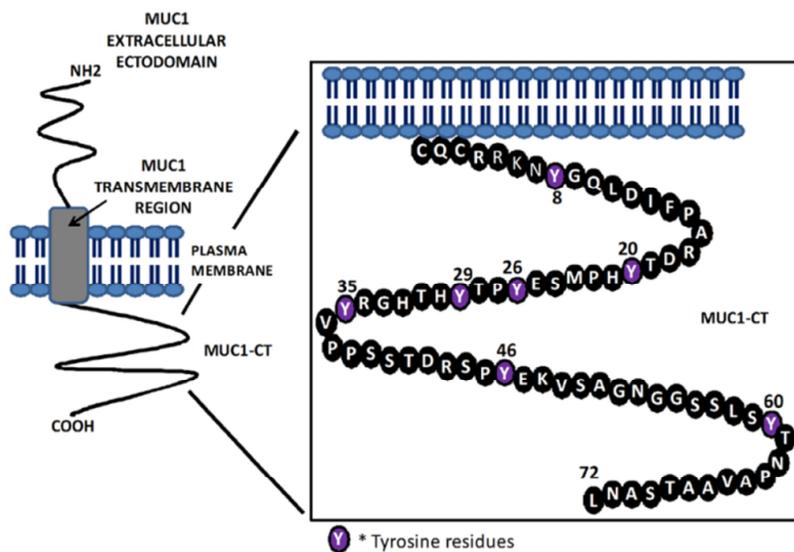


Figura 25.- Estructura de MUC1. (figura extraída de la revisión de Peiro et al. del 2014 [204]) La mucina de membrana MUC1 se compone por tres subunidades distintas: un gran ectodominio extracelular fuertemente glicosilado, una región de un solo paso transmembrana y una cola citoplásmica intracelular (CT) que contiene varias tirosinas conservadas evolutivamente (Y).

También se ha postulado sobre el papel perjudicial de MUC1 en pulmón, debido a estudios que han demostrado que TNF- α (uno de los principales mediadores proinflamatorios de las vías aéreas) aumenta la expresión de MUC1

1. INTRODUCCIÓN

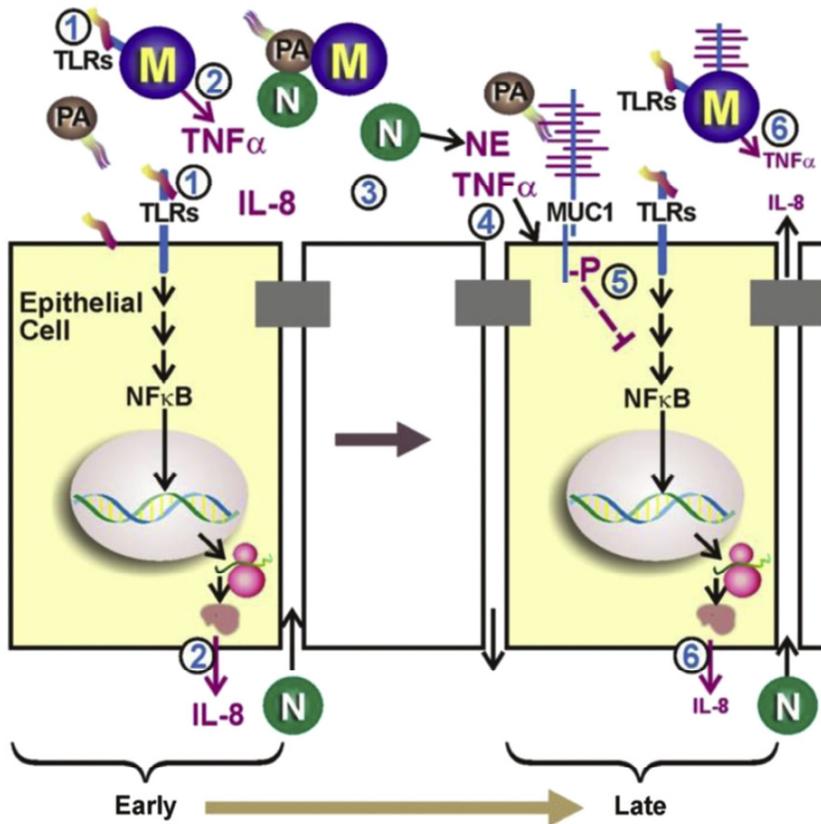


Figura 26. Mecanismo antiinflamatorio de MUC1. (figura extraída de la revisión del 2012 de Kwang Chul Kim [179])(Paso 1) Durante la etapa temprana de inflamación se activan los TLR y NF- κ B en las células epiteliales y macrófagos (M). (2) La activación de NF- κ B conduce a aumento de la expresión de TNF- α y de IL-8, que se secretan posteriormente (3) la IL-8 recluta neutrófilos (N) a través de la barrera epitelial que liberan NE en el lumen de las vías respiratorias. (4) NE y un TNF activan una sobreexpresión del gen MUC1 que resulta en el aumento de expresión de Mucina MUC1 en la superficie apical de las células epiteliales del pulmón. (5). Durante la etapa tardía del proceso inflamatorio, la fosforilación de tirosina del dominio MUC1-CT conduce a la inhibición de la señalización de TLR y (6) El descenso de regulación de la inflamación.

Dada la importancia de la inflamación durante el estadio inicial en La EPOC y el efecto "universal" antiinflamatorio de MUC1, junto con la importancia de la expresión en pulmón de MUC1 se ha generado un alto interés en los últimos tiempos.

Además evidencias recientes mostraron que los glucocorticoides incrementan la expresión de MUC1 *in vitro* [236] así como a nivel epitelial tras el tratamiento con corticosteroides orales durante dos semanas [237]. Sin embargo, la asociación entre la eficacia de corticosteroides orales y la expresión de MUC1 así como la posible interacción entre glucocorticoides, el receptor de glucocorticoides (GR) y MUC1 son todavía desconocidas. Esta cuestión crítica nos llevó a investigar la regulación de MUC1 expresión en las vías respiratorias, concretamente en EPOC.

1.9 MUC1 y EPOC: ¿Posible papel de MUC1 en la aparición de corticorresistencia?

Durante los últimos años ha habido una creciente conciencia de la importancia de la expresión de mucinas ancladas a membrana en diferentes enfermedades. Centrándose sobre todo en las enfermedades respiratorias, su expresión se ha relacionado con funciones de protección contra partículas inflamatorias o agentes infecciosos [204], por lo tanto la investigación en las mucinas se ha dirigido hacia la investigación de sus posibles beneficios anti-inflamatorios. Su presencia en la superficie celular, les confiere una alta accesibilidad, y su interacción con múltiples proteínas, les confiere una capacidad para regular diferentes vías de señalización, subrayar su importancia biológica y su potencial implicación en las estrategias terapéuticas.

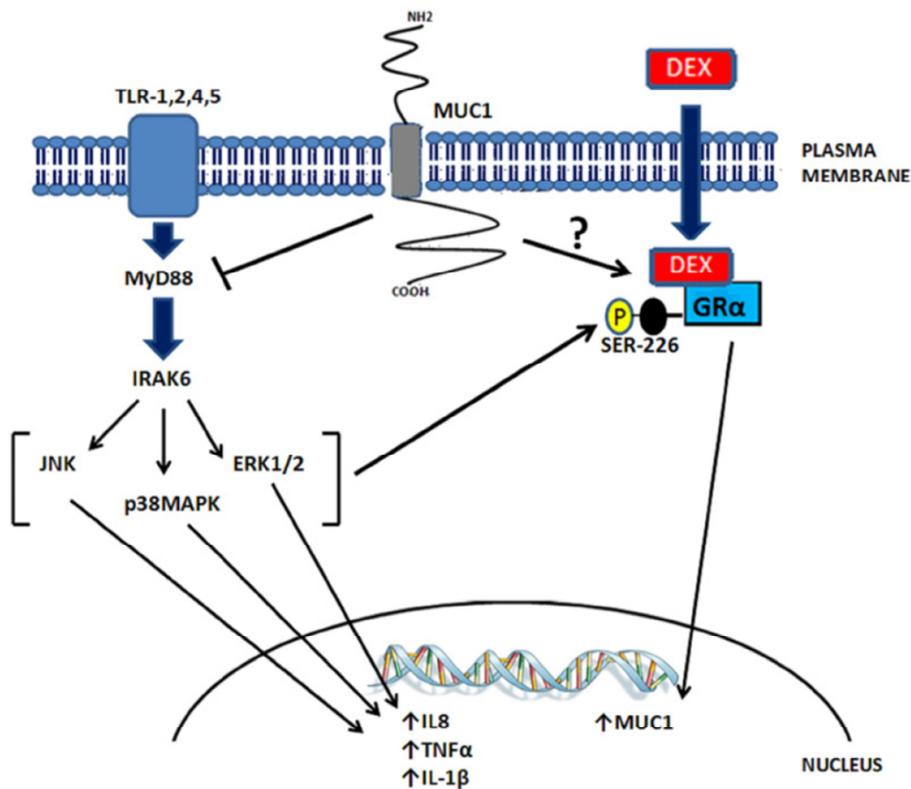


Figura 27. Diagrama que muestra los mecanismos de acción anti-inflamatoria de MUC1. (figura extraída de la revisión de [204]). MUC1 es conocida por sus propiedades para inhibir varios receptores tipo TOLL (TLR) a través del reclutamiento de MyD88. Esto desencadena en diversas cascadas de señalización, tales como c-Jun N-terminal quinasa (JNK), mitógeno p38 activado MAP quinasa (p38MAPK) y quinasa extracelular regulada por señal (ERK1 / 2), lo que llevaría a la transcripción de diferentes genes pro-inflamatorios. Se sabe que la dexametasona (DEX), entre otros corticosteroides, aumenta la expresión de MUC1 anclada a membrana lo que daría lugar a un incremento de su capacidad anti-inflamatoria. Sin embargo, ciertas modificaciones de los receptores de corticosteroides (GR), tales como un aumento de la fosforilación GRα (P) en Ser226, mediada por JNK, p38MAPK y ERK1 / 2, contribuye a la resistencia a los esteroides mediante la prevención de la translocación nuclear, por lo que podría tener un efecto en la expresión de MUC1. Además, la posibilidad de una interacción potencial entre la cola citoplasmática de MUC1 (MUC1-CT), corticosteroides y sus receptores es actualmente desconocida.

1. INTRODUCCIÓN

En nuestro grupo tenemos datos relativos a la disminución de expresión de MUC1 en pacientes con poliposis resistentes a corticosteroides. Esto ha orientado a que nuestra investigación actual se centre en la evaluación de la relación mecánica entre MUC1 y la eficacia anti-inflamatoria de corticosteroides.

Se conocen propiedades de MUC1 en inflamación de las vías aéreas por estar relacionada con su capacidad para inhibir varios TLR [202], en particular a través MyD88 [204]. Esta inhibición evita diversas cascadas de señalización, que daría lugar a la transcripción de diferentes genes pro-inflamatorios. Además, como se describió anteriormente, MUC1 también se conoce por su capacidad para mediar en la translocación de varios factores de transcripción en el núcleo, donde éstos ejercen su función [208-210]. Sin embargo, hasta ahora, la posibilidad de una potencial interacción entre MUC1-CT y corticosteroides y sus receptores es desconocido.

En nuestra opinión, la relevancia de estudiar una potencial interacción entre mucinas, particularmente MUC1 y corticosteroides se debe a la posibilidad de proporcionar una explicación mecanicista que contribuiría a entender por qué estos medicamentos no son capaces de reprimir la inflamación en este subgrupo particular de pacientes, que son los pacientes EPOC resistentes a corticoides caracterizados por exhibir una expresión reducida de MUC1.

En conclusión, la EPOC se comporta como una enfermedad inflamatoria crónica de enorme complejidad, en la que existe una amplificación de los mecanismos inflamatorios de defensa y un cierto grado de corticorresistencia. Esa inflamación, no sólo afecta a los diferentes componentes del pulmón, sino que también parece vincularse a las manifestaciones sistémicas de la enfermedad, por lo que el conocimiento profundo de todos los mecanismos implicados en la cascada inflamatoria puede tener futuras e importantes connotaciones terapéutica

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

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 el papel de los corticosteroides en la EPOC sobretodo en pacientes con EPOC avanzada y en el tratamiento de las exacerbaciones [100], siendo muy común la pérdida de eficacia a estos fármacos.
- Una reducción en la capacidad de respuesta a los efectos antiinflamatorios de los corticosteroides es una barrera importante para la gestión eficaz en la mayoría de los pacientes con EPOC. Los mecanismos moleculares que conducen a la resistencia a los corticosteroides se comprenden mejor ahora, y esto ha identificado nuevos objetivos para la terapia.
- 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 como uno de los principales factores de corticorresistencia mediado por el estrés oxidativo que produce
- Al igual que para otras enfermedades inflamatorias han sido identificados marcadores de resistencia a los corticoides no ha sido así para la EPOC. Uno de los pocos marcadores de resistencia a varios fármacos identificada para la EPOC es la MRP1 (Multidrug resistance-associated protein-1) [238].
- Se ha descrito el papel antiinflamatorio de MUC1 en las vías aéreas. Inicialmente se le había atribuido a esta mucina un papel perjudicial en la desencadenación de respuesta inflamatoria debido a que TNF- α aumenta la expresión de MUC1 en enfermedades con un gran componente inflamatorio como la que caracteriza a la EPOC.
- MUC1 ha sido descrita en la superficie de células epiteliales alveolares y bronquiales inducida por diversos factores y además, ha sido implicada en otras enfermedades de las vías aéreas (poliposis) con un importante componente corticorresistente.
- Recientemente se ha descrito por nuestro grupo y por otros estudios la infraexpresión de MUC1 en pacientes con poliposis corticorresistentes.

Basándonos en los antecedentes anteriormente descritos es razonable hipotetizar que MUC1 puede jugar un papel importante mediando la acción anti-inflamatoria de los corticoides en la EPOC.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo es analizar el papel de MUC1 como mediador de los efectos anti-inflamatorios de los corticoides en la EPOC.

Con el fin de evaluar la validez de la hipótesis planteada, se establecen los siguientes subobjetivos:

- Analizar la expresión de MUC1 en tejido pulmonar de sujetos sanos, fumadores y pacientes EPOC
- Analizar el efecto de la falta de expresión de MUC1 sobre el efecto anti-inflamatorio de los corticosteroides tanto en modelos celulares *in vitro* como en modelos animales

3. METODOLOGÍA

3.1 Material.

3.1.1 Fármacos ensayados.

Los fármacos empleados en este estudio han sido la Dexametasona como antiinflamatorio y la ^{18}F -Fluorodesoxiglucosa (^{18}F -FDG) como radiofármaco diagnóstico.

La **dexametasona** es un potente glucocorticoide sintético con acciones que se asemejan a las de las hormonas esteroideas. Actúa como antiinflamatorio e inmunosupresor. Su potencia es de unas 20-30 veces la de la hidrocortisona y 4-5 veces mayor que la prednisona. La dexametasona se usa para tratar patologías de origen inflamatorio y enfermedades autoinmunes.

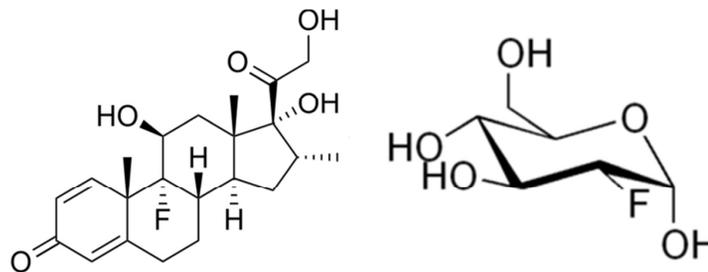


Figura 28: Estructura de la dexametasona (izquierda) y de la ^{18}F -FDG (derecha).

La ^{18}F -FDG (^{18}F -Fluorodesoxiglucosa) es muy utilizada en el diagnóstico médico por imagen, concretamente en la modalidad de Tomografía por Emisión de Positrones (PET).

La FDG, como análoga de la glucosa, es incorporada principalmente por aquellas células con elevadas tasas de metabolismo glucídico, como las células oncológicas y las inflamatorias. Tiene una distribución fisiológica en cerebro, en riñón y vejiga por tener eliminación mayoritariamente urinaria. Al carecer del grupo hidroxilo en el carbono de la posición 2 la fosforilación no se produce e impide que sea liberada al medio extracelular. El oxígeno 2 de la molécula de glucosa es necesario para continuar el proceso de glucólisis, por lo que, al igual que ocurre con la 2-desoxi-D-glucosa, la FDG no puede ser metabolizada en las células y por ello la FDG-6-fosfato formada no entra en la ruta glicolítica antes de que decaiga la radiactividad. Como resultado, la distribución de ^{18}F -FDG es un reflejo en tiempo real del metabolismo glucídico del órgano bajo estudio en el momento de la adquisición de las imágenes.

3. METODOLOGÍA

En una **segunda parte** de este trabajo se han estudiado los efectos del fármaco en ensayo sobre un modelo murino de inflamación pulmonar por exposición al humo de tabaco (EHT).

➤ **Dexametasona.**

Tal y como se ha descrito anteriormente, la dexametasona (9-fluoro-11 β ,17,21-trihidroxi-16 α -metil pregna-1,4-dieno-3,20-diona, C22H29FO5) es un fármaco aprobado para el tratamiento de la EPOC severa [111]. En este trabajo se ha empleado el compuesto soluble en agua comercializado por Sigma-Aldrich, considerado uno de los principales corticosteroides, para estudiar sus posibles efectos sobre la corticorresistencia asociada a una disminución de la expresión de MUC1 en la EPOC.

La dexametasona se ha utilizado a las dosis de 3mg/kg y 10mg/kg en el modelo murino, corresponde a la curva de concentración más estudiada en otros modelos animales de inflamación pulmonar [218], concentración requerida para una inhibición total y selectiva de la inflamación. Para utilizar las concentraciones requeridas, se preparó una concentración stock de 25mg/ml y se realizaron diluciones posteriores vehiculizadas en Metocell® para administración oral forzada. Para los cultivos celulares se preparó el medio con distintas concentraciones crecientes de dexametasona al (0,01nM- 10 μ M).

3.1.2 Estímulo: Extracto de humo de tabaco (EHT).

El extracto de humo de tabaco (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 investigación fue utilizado como estímulo en los experimentos, tal y como se ha descrito previamente [219, 220].

3.1.3 Reactivos utilizados.

Reactivo	Casa comercial	Referencia
Ácido acético glacial	Panreac	Ref. 361008
Ácido cítrico anhidro	Panreac	Ref. 141808
Ácido clorhídrico (HCl)	Panreac	Ref. 131020
Ácido fosfomolibdico	VWR Prolabo	Ref. 20616184
Ácido tricloroacético (cloroformo)	Panreac	Ref. 151067
Acrilamida	Sigma-Aldrich	Ref. A3574
Agua dietilpirocarbonato (DEPC)	Applied Biosystems	Ref. AM9906
Albúmina sérica bovina (BSA)	Sigma-Aldrich	Ref. A7906
Amonio persulfato	Sigma-Aldrich	Ref. A3678
Anfotericina B	Lonza Group LTD	Ref. 17-836E
Azul de anilina	VWR Prolabo	Ref. 21999183
Azul de tripano	Molecular Probes, Invitrogen	Ref. T10282
Carbonato de litio	Sigma-Aldrich	Ref. 100979413
Cloruro de magnesio (MgCl ₂)	Panreac	Ref. 141396
Cloruro de sodio (NaCl)	Panreac	Ref.141659
Cóctel inhibidor de proteasa	Sigma	P8340
Coomassie Plus™ Protein Assay Reagent	Thermo Scientific	Ref. 1856210
Dexametasona	Sigma-Aldrich	Ref. D2915
Dodecilsulfato sódico (SDS)	Sigma-Aldrich	Ref. L3771
DPX	Panreac	Ref. 255254
ECL plus	Amersham GE Healthcare	Ref. RPN2132
EDTA (ácido etilendiaminotetraacético)	Sigma	Ref. ED2SC
EGTA (ácido etilenglicol tetraacético)	Sigma	Ref. E3889
Ensayos de Expresión Génica TaqMan®	Applied Biosystems	Tabla 16 (apartado 3.2.9.3)
Eosina amarillenta	Panreac	Ref. 251299
Etanol absoluto	Panreac	Ref. 361086
Formol 10%	Panreac	Ref. 143091
Glicerol	Sigma-Aldrich	Ref. G5516
Glicógeno	Calbiochem	Ref. 361507
Hematoxilina	Sigma-Aldrich	Ref. GHS332
Hematoxilina de Ehrlich	Sigma-Aldrich	Ref. GHS322
Hematoxilina de Harris	Panreac	Ref. 253949
HEPES (Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazino etanosulfónico)	Sigma-Aldrich	Ref. H4034
Hidróxido sódico (NaOH)	Panreac	Ref. 131687
Isoflorano	Baxter SL.	ARREANE
Isopropranol	Sigma	Ref. I9516
Ketamina	(Imalgene®) Merial	904886
Kit "Amersham cAMP Biotrak Enzymeimmunoassay (EIA) System"	GE Healthcare	Ref.RPN225

3. METODOLOGÍA

Reactivo	Casa comercial	Referencia
Kit “Taq Man para la retrotranscripción inversa”	Applied Biosystems	Ref. N8080234
Kit BCA para cuantificación de proteínas	Pierce	Ref. 23227
Kit BCA Protein Assay	Thermo Scientific	Ref. 23225
Kit de tinción panóptica	Panreac	Ref. 254807.0922
LPS (Lipopolisacárido de Salmonella serotipo enteritidis)	Sigma	Ref: L2012
Marcador de peso molecular Amersham High-Range Rainbow	GE Healthcare	Ref. RPN756E
Medetomidina	(Domtor®) Esteve	135089-1
Medio de montaje rápido para microscopía óptica	FLUOPREP Biomerieux	75521
Metanol	Sharlab	Ref. ME03262500
Methocel	Colorcon	ID 34538P
Nonidet P 40	Sigma	Ref. 74385
Parafina	Sigma-Aldrich	Ref.P3683
Paraformaldehído 4%	Panreac	Ref.252931
Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)	Sigma	Ref. P7626
Polietilenglicol 400	Panreac	Ref. 162436
Ponceau de silidina	Merk	Ref. 1159270025
Tampón de lisis para la purificación de ácidos nucleicos Nucleic Acid Purification Lysis Solution.	Applied Biosystems	Ref. 4305895
Tampón salino fosfato (PBS)	Sigma-Aldrich	Ref.P4417
TaqMan® Gene Expression Master Mix	Applied Biosystems	Ref. 4369016
Tetramethylethylenediamine para electroforesis (TEMED)	Sigma-Aldrich	Ref.T9281
Triton X-100	Panreac	Ref. 142314
Trizol	Roche Diagnostics	Ref.1667157001
Tween20	Sigma-Aldrich	Ref.P1379
Xileno	Merck	Ref. 481769
β-Mercaptoetanol	Sigma-Aldrich	Ref. M6250

3.1.4 Pacientes.

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.

Los pacientes incluidos en este estudio fueron clasificados en tres grupos: controles no fumadores, fumadores no EPOC 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 preoperatorio.
- 2) Pacientes que no recibieron glucocorticoides, adrenérgicos β_2 o anti-muscarínicos durante las tres semanas previas 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.

3.1.5 Animales de experimentación

Todos los procedimientos realizados con animales de experimentación fueron previamente aprobados por el Comité de Ética y Bienestar Animal de la Comisión de Ética de la Universidad de Valencia y por el Comité Ético para la Experimentación Animal (CEEA) de la Fundación de Investigación del Hospital General de Valencia.

Se emplearon ratones hembras C57BL/6 Wild Type (Harlan®) y KO para Muc1 (cedidas por el grupo de la Dra. Sandra J. Gendler et al. (Profesora de bioquímica y Biología Molecular e investigadora en el campo de la Oncología en la Clínica Mayo) de 12 semanas de edad y de un peso aproximado de entre 15-22 g. Los animales permanecieron siete días en cuarentena previamente al inicio del experimento (periodo de aclimatación). Los animales fueron

3. METODOLOGÍA

estabulados a lo largo de todo el estudio con comida (dieta Harlan® Ref. 2014) y agua *ad libitum*. Se repartieron de forma aleatoria en jaulas y éstas a su vez en grupos experimentales distintos. Para realizar un seguimiento individualizado de cada ratón, se identificó al animal mediante crotales insertados en la oreja numerados consecutivamente. Las condiciones estándar del animalario fueron:

- Humedad relativa $55 \pm 10\%$.
- Temperatura $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$.
- Renovación del aire a 15 ciclos por hora.
- Ciclo luz/oscuridad 12/12 horas.

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 [112].

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 CO₂.

Las CEBH crecieron alrededor de los explantes, alcanzando una confluencia adecuada tras un periodo de aproximadamente 7 a 12 días.

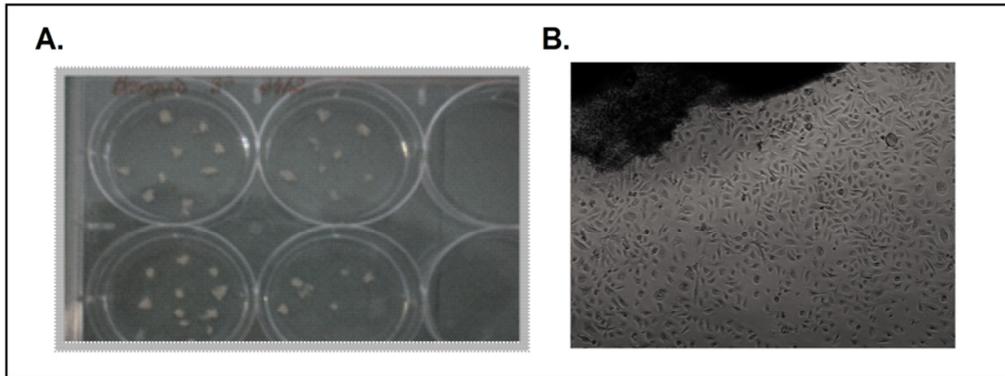


Figura 29. A. Explantes de bronquiolo humano colocados en pocillos de placas de cultivo. B. Células epiteliales creciendo alrededor del explante.

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 y de marcadores inflamatorios. 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.

3.2.1.2 Aislamiento de neutrófilos.

La sangre del paciente es mezclada con Dextrano en la proporción 2:1 (Dextrano 500, al 3%) se deja reposar a temperatura ambiente durante 45 min y aislamos el sobrenadante. Se le añade el mismo volumen de Ficoll que de sobrenadante. Centrifugamos a 150 g a 4º durante 30min. Se desecha el sobrenadante por decantación y nos quedamos con el sedimento que contienen los neutrófilos. Los neutrófilos son lavados con PBS y centrifugados a 150 g a 4º durante 5min. Desechamos de nuevo el sobrenadante por decantación y añadimos una solución de lisis celular (3 mL). Se dejan reposar en hielo durante 15 min y se Centrifugara 1500rpm durante 5min

Para el asilamiento de netrófilos a partir de esputo de paciente se prepara una solución de trabajo (9ml H₂O MiliQ + 1ml DTT o esputolisin). Se procede a la pesada del esputo. y se le añade la solución de trabajo en propoción 4:1 (4 x peso muestra (g) : 1 x ml solución de trabajo).

3. METODOLOGÍA

Se homogeneiza la mezcla con ayuda de una pipeta Pasteur y a continuación es agitada en el mecedor de tubos hasta que se disuelve completamente. Se le añade PBS (la misma cantidad que de solución de trabajo) se vuelve a agitar hasta su completa disolución y se filtra la solución obtenida a través de un filtro de 40 μm de poro. Se realiza un citospin y observamos al microscopio la tinción, en caso de haber el tipo celular que nos interese hacemos recuento celular en cámara Burker.

3.2.2 Estimulaciones *in vitro*.

3.2.2.1 Preparación del extracto de humo de tabaco (EHT).

El EHT, utilizado como estímulo en los experimentos *in vitro*, se obtuvo a partir de cigarrillos de investigación 2R4F, tal y como se ha descrito previamente [183, 184].

El cigarrillo 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 cigarrillo (3 respiraciones/minuto; 1 respiración 35 mL; cada respiración de 2 segundos de duración con 0,5 cm por encima del filtro).

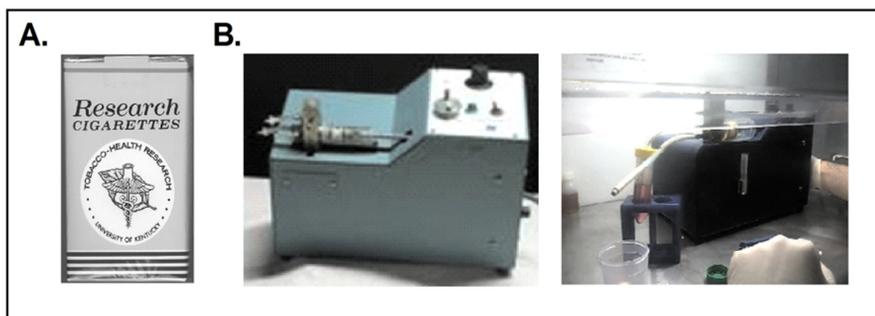


Figura 30. El extracto de humo de tabaco (EHT) generado fue utilizado como estímulo en los experimentos *in vitro*. A. Cigarrillos de investigación 2R4F utilizados en los experimentos. B. Bomba de respiración de animales utilizada para generar el extracto de humo de tabaco (EHT) y burbujearlo en el medio de cultivo.

El humo de tres cigarrillos, generado mediante este procedimiento, se burbujó en un frasco con 25 mL de medio basal de diferenciación para células epiteliales B-ALITM 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. En los experimentos *in vitro* del primer estudio, las epiteliales diferenciadas fueron estimuladas con EHT (0%, 1%, 2,5%, 5% y 10%) durante 24 horas. Una concentración de EHT 10% corresponde aproximadamente a la exposición asociada a fumar dos paquetes de cigarrillos al día [186].

Para el estudio de mecanismos el EHT fue añadido 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. 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.

3.2.2.2 Preparación del LPS utilizado como estímulo in vitro.

Las soluciones madre de lipopolisacárido (LPS) se prepararon según indica ficha técnica y diluciones adicionales se hicieron en medio de cultivo respectivo para cada caso.

Las células aisladas o los neutrófilos aislados se incubaron con dexametasona a diferentes dosis o vehículo durante 30 minutos antes de la incubación con o sin LPS (1 μ g/ml) o CSE 5 % (en caso de esputo neutrófilos) o durante 6 horas en condiciones de cultivo celular estándar (37°C y 5 % CO₂). El sobrenadante se recogió para medir diferentes marcadores inflamatorios

3.2.3 Modelo animal

La inflamación pulmonar en ratón se indujo mediante instilación intranasal única de LPS (Lipopolisacárido de Salmonella Typhimurium) (75 μ G en 25 μ l) [198] para exacerbar la respuesta inflamatoria seguida de exposición continuada al humo de tabaco (EHT). Los ratones fueron expuestos al humo del tabaco durante 5 días consecutivos. El primer y segundo día fueron expuestos al humo de 6 cigarrillos, el tercer día a 8 y el cuarto y quinto día a 10. La exposición a cada cigarrillo dura por lo menos 5 minutos seguida de 8 minutos de exposición al aire ambiental con un flujo de 5l/min [218].

Un sistema semiautomático (TSE Systems®) controla la duración de las caladas (1,9 segundos) y la separación entre las mismas (20 segundos).

Los animales del grupo control recibieron el mismo volumen de Agua Brown intranasal (vehículo) y fueron expuestos al oxígeno ambiental y sometidos a un estrés por inmovilización en habitáculos similares a los de la máquina de fumar.

3. METODOLOGÍA

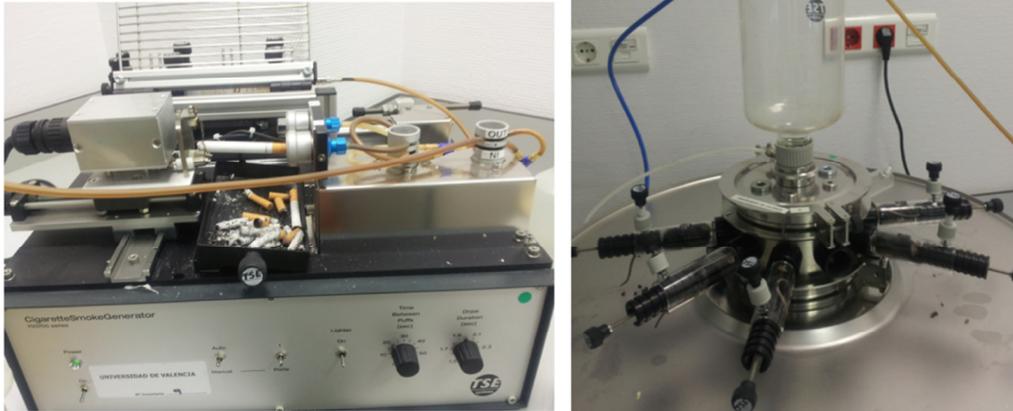


Figura 31: Sistema semiautomático de exposición pasiva al humo del tabaco de TSE systems® (“nose-only system”)

La inducción de inflamación pulmonar en este estudio se realizó siempre el día 1 del experimento, el tratamiento farmacológico es administrado diariamente 1 hora antes de la exposición al humo del tabaco. La dexametasona es administrada por vía oral forzada vehiculizada con Methocel® al 10% (1:1).



Figura 32: Administración oral forzada del fármaco mediante cánula gástrica.

Tablas 13 y 14: Dosificación de la administración vía oral de dexametasona o agua brown.

DEXAMETASONA 10mg/1kg/día (2,5mg/ml)		
PESO g	peso kg	uL adm oral
10	0,01	10
11	0,01	11
12	0,01	12
13	0,01	13
14	0,01	14
15	0,02	15
16	0,02	16
17	0,02	17
18	0,02	18
19	0,02	19
20	0,02	20
21	0,02	21
22	0,02	22
23	0,02	23
24	0,02	24
25	0,03	25
26	0,03	26
27	0,03	27
28	0,03	28
29	0,03	29
30	0,03	30

DEXAMETASONA 3mg/1kg/día (0,625mg/ml)		
PESO g	peso kg	uL adm oral
10	0,01	10
11	0,01	11
12	0,01	12
13	0,01	13
14	0,01	14
15	0,02	15
16	0,02	16
17	0,02	17
18	0,02	18
19	0,02	19
20	0,02	20
21	0,02	21
22	0,02	22
23	0,02	23
24	0,02	24
25	0,03	25
26	0,03	26
27	0,03	27
28	0,03	28
29	0,03	29
30	0,03	30

3.2.3.1 Protocolo experimental

Los estudios en ambas cepas de roedores se realizaron en ratones hembra C57BL/6 de 12 semanas de edad.

El número de animales en cada grupo fue de n=8 para disminuir la variabilidad interindividual intraespecie.

Los animales se pesaron de forma periódica durante todo el experimento. Los grupos control se sometieron al mismo procedimiento experimental, pero se les administró el vehículo en todos los casos. Con el fin de evaluar la instauración y evolución de la enfermedad, se realizaron pruebas de imagen mediante PET (Tomografía por Emisión de Positrones) y CT (Tomografía Computarizada), además de la evaluación de la función pulmonar mediante un pletismógrafo de cuerpo completo (BUXCO®). Las pruebas de PET/CT y Pletismografía se

3. METODOLOGÍA

realizaron a día 0 y 6. A continuación se detallan los grupos experimentales realizados en cada estudio.

A. Efecto farmacológico de la Dexametasona a dosis 3 y 10 mg/Kg/día vía oral, en inflamación pulmonar aguda inducida con humo de tabaco en ratones C57BL6 “Wild Type”.

Para llevar a cabo este estudio se emplearon ratones C57BL6 hembra de 12 semanas de edad. En el modelo wild type, la dexametasona se administra diariamente una hora antes del inicio a la exposición al humo del tabaco.

Se realizaron pruebas de imagen mediante la administración del radiofármaco ^{18}F -FDG (^{18}F – Fluorodesoxiglucosa) vía intraperitoneal. Previamente a la adquisición de las imágenes, se realizaron los estudios de función pulmonar en el pletismógrafo de cuerpo completo. Todos los grupos experimentales se llevaron a día 6 como punto final.

Grupos experimentales modelo Wild Type:

- Salino IN (Intranasal) +Exposición aire ambiental (n=8).
- Salino IN+ Exposición aire ambiental+ Dexametasona 10mg/kg/día (n=8).
- LPS IN + Exposición al humo del tabaco. (n=8).
- LPS IN + Exposición al humo del tabaco+ Dexametasona 10mg/kg/día (n=8).
- LPS IN + Exposición al humo del tabaco+ Dexametasona 3mg/kg/día (n=8).
- LPS IN + Dexametasona 10mg/kg/día (n=8).
- LPS IN + Dexametasona 3mg/kg/día (n=8).

Debido al efecto hiperglucemiante de los corticoides se realiza un subgrupo control con Dexametasona a dosis altas 10mg/kg (solo se realiza en el grupo Wild Type) para demostrar que no existe interacción farmacológica entre la dexametasona y la ^{18}F -FDG evitando así falsos negativos en el diagnóstico por imagen.

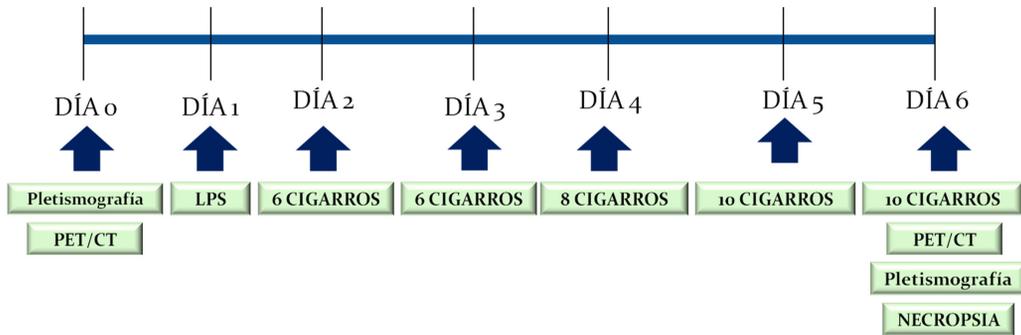


Figura 33: Esquema del procedimiento del modelo Wild Type. Inducción de la enfermedad a día 1, administración diaria de dexametasona o vehículo vía oral y punto final.

B. Efecto farmacológico de la Dexametasona 3 y 10 mg/Kg/día vía oral, en inflamación pulmonar aguda inducida con humo de tabaco en ratones C57BL6 KO PARA Muc1.

Para llevar a cabo este estudio se emplearon ratones C57BL6 Muc1 silenciados (KO Muc1) hembra de 12 semanas de edad. En el modelo KO Muc1, la dexametasona se administra diariamente una hora antes del inicio a la exposición al humo del tabaco.

Se realizaron pruebas de imagen mediante la administración del radiofármaco ^{18}F -FDG (^{18}F -Fluorodesoxiglucosa) vía intraperitoneal. Previamente a la adquisición de las imágenes, se realizaron los estudios de función pulmonar en el pletismógrafo de cuerpo completo. Todos los grupos experimentales se llevaron a día 6 como punto final.

Grupos experimentales modelo KO Muc1:

- Salino IN +Exposición aire ambiental (n=8).
- LPS IN + Exposición al humo del tabaco. (n=8).
- LPS IN + Exposición al humo del tabaco+ Dexametasona 10mg/kg/día (n=8).
- LPS IN + Exposición al humo del tabaco+ Dexametasona 3mg/kg/día (n=8).
- LPS IN + Dexametasona 10mg/kg/día (n=8).
- LPS IN + Dexametasona 3mg/kg/día (n=8).

3. METODOLOGÍA

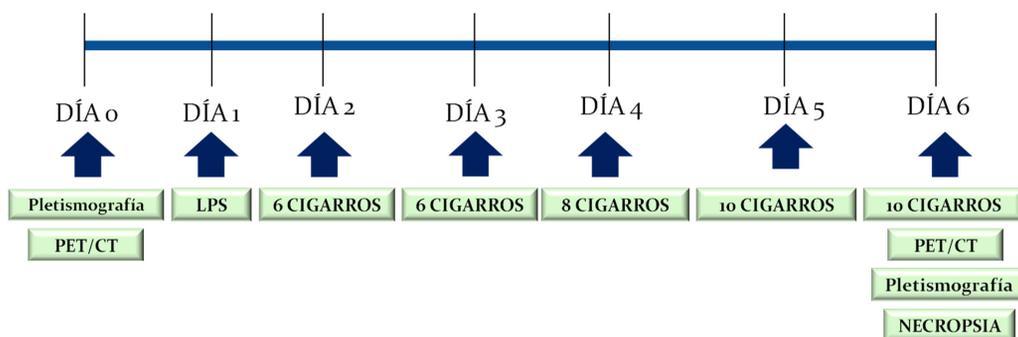


Figura 34: Esquema del procedimiento del modelo KO Muc1. Inducción de la enfermedad a día 1, administración diaria de dexametasona o vehículo vía oral y punto final

3.2.4 Preparación y administración de fármacos y radiofármacos

- **Dexametasona:** se preparó en solución con agua Brown para inyectables y se administró por vía oral forzada vehiculizada con Methocel® al 10%.
- **Methocel®:** La solución se preparó en agua destilada previamente calentada a 90°C según ficha técnica.
- **LPS:** Se preparó en solución con agua Brown para inyectables y se administró por vía intranasal 24 horas antes de la exposición al EHT.

El radiofármaco empleado para la adquisición de imágenes PET fue suministrado por la Unidad de Radiofarmacia Centralizada de I.B.A.Molecular Molypharma.

- **¹⁸F-FDG:** a cada sujeto se le administran aproximadamente 300 µCi vía intraperitoneal de radiofármaco para las pruebas de imagen.

3.2.5 Imagen Molecular

3.2.5.1 Adquisición PET/CT

La adquisición de las imágenes se realizó mediante el sistema multimodal micro-PET/SPECT/CT (Albira II de Oncovisión S.A.) Para los estudios programados se emplearon las modalidades de PET y CT según se detalla a continuación.

Previa a la inyección del radiofármaco se anestesiaron los sujetos con ketamina/medetomidina 75/0,5 mg/kg respectivamente vía intraperitoneal. Se inyectaron con jeringas de tuberculina desprovistas de émbolo de 0,5 ml aproximadamente 300 µCi vía intraperitoneal de ¹⁸F-FDG. La jeringa que contiene el radiofármaco se midió en el activímetro

tras la administración para calcular la dosis exacta de radiofármaco inyectado y se anotó junto con la hora de administración. Tras media hora de incorporación del radiofármaco el sujeto se colocó en decúbito prono en la camilla de ratón estándar del Albira II®, equipo multimodal de adquisición micro-PET/SPECT/CT. Todos los ratones fueron sometidos a las pruebas de PET/CT a día 0 y 6.



Figura 35: microPET/SPECT/CT. Albira II de Oncovisión S.A.

Una vez finalizadas las adquisiciones, los ratones fueron retirados de la camilla y estabulados bajo observación. Los sujetos permanecieron en la instalación radiactiva con ciclos de luz/oscuridad de 12 horas hasta el decaimiento total de la actividad inyectada.

3.2.5.2 Adquisición de imágenes

Las adquisiciones tanto de PET como de CT se realizaron con un offset de 10 mm de longitud para visualizar la región pulmonar. La adquisición mediante CT (Carestream Molecular Imaging, Woodbridge, CT) se realizó con buena calidad de adquisición, dosis alta (400 μ A) y voltaje alto (45Kv) con la modalidad de adquisición Step&Shoot y algoritmo de reconstrucción FBP (Filtered Back Projection). En la modalidad de PET, los estudios se programaron con un campo de visión (Field Of View (FOV)) de 80 mm, un tiempo de adquisición de 90 segundos por proyección durante 15 min. Las imágenes fueron reconstruidas mediante el algoritmo OSEM Cross con un número de iteraciones de 3 utilizando los parámetros de reconstrucción estándar del Albira Suite 5.0 Reconstructor.

3. METODOLOGÍA

El procesado y análisis de las imágenes de alta calidad del CT se emplearon para proporcionar información estructural basada en la correlación con las imágenes PET, así como para ensayos densitométricos del entorno pulmonar.

3.2.5.3 Análisis de imágenes

Las imágenes fueron analizadas y cuantificadas mediante el software de análisis PMOD versión 3.2 (PMOD Technologies LTD, Zurich, Switzerland).

Una vez adquiridas, las imágenes de PET/CT fueron reconstruidas y fusionadas.

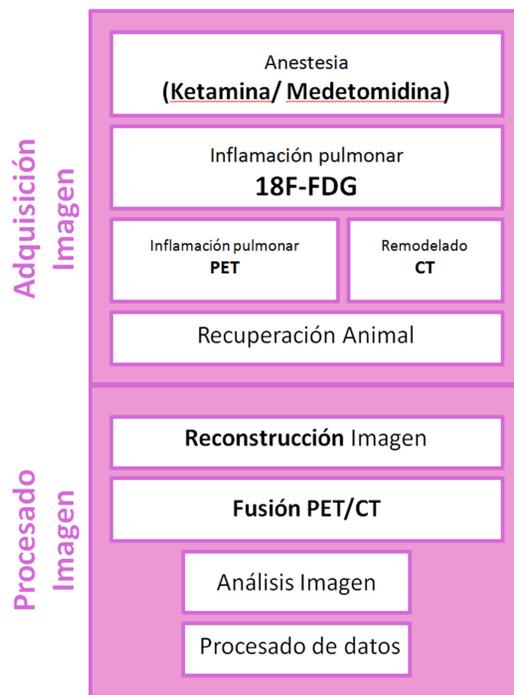


Figura 36: Esquema de adquisición y procesado de imágenes.

Para las imágenes CT se determinaron volúmenes de interés (VOI) de la región pulmonar. El VOI fue analizado para cada sujeto para sus distintos días de adquisición. Se calculó la media de unidades Hounsfield (HU) por unidad de pixel.

Para las imágenes PET se tomó como plantilla el VOI obtenido en la imagen CT de cada sujeto y se extrapolo a la imagen PET y posteriormente se procedió a su cuantificación. La cuantificación de imágenes proporcionó el número de cuentas adquiridas por unidad de pixel. Dicho valor se relativizó por la dosis inyectada y por peso de sujeto dando como resultado el SUV (Standard Uptake Value).

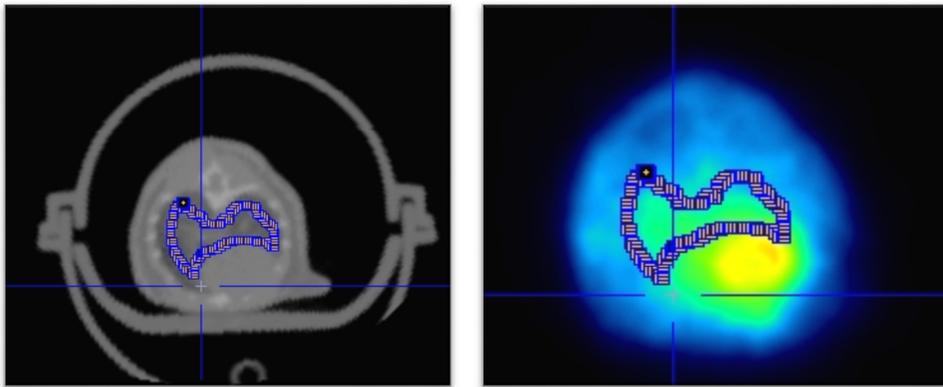


Figura 37: VOI (Volumen de Interés) de la imagen CT y de la imagen PET. Volúmenes de interés utilizados para la cuantificación en el CT (izquierda) extrapolado a la imagen PET (derecha).

3.2.6 Extracción de muestras

Una vez transcurridas 20-24 horas de la última dosis de ^{18}F -FDG, se procedió al sacrificio de los animales mediante una inyección letal intravenosa de pentobarbital sódico (200 mg/kg). Se llevó a cabo una traqueotomía para realizar el lavado broncoalveolar (LBA). Se realizaron 3 lavados de 0,6 mL con Tampón Fosfato Salino (PBS) a través de una cánula de 24G. El LBA recogido se empleó para hacer ensayos de recuento y diferenciación celular. Se centrifugó el volumen total de LBA (13000 rpm, 10 min) y el sedimento y el sobrenadante se alicuotaron por separado, se congelaron con nitrógeno líquido inmediatamente y se almacenaron a -80°C .

Se llevó a cabo una toracotomía para extraer el corazón y los pulmones. Los pulmones y la tráquea se extrajeron en bloque y se pesó el conjunto; a continuación se separó el pulmón derecho para el estudio histológico y se conservó suspendida en solución fijadora de formaldehído 3.7-4%, evitando el contacto con las paredes del envase, para su posterior inclusión en parafina.

El pulmón izquierdo se empleó para expresión génica y proteica. Para ello se diseccionó y almacenó en viales de 2 ml que se congelaron con nitrógeno líquido inmediatamente, y fueron posteriormente almacenadas a -80°C hasta el día del análisis.

3.2.7 Ensayos de inflamación pulmonar

Para determinar la respuesta inflamatoria pulmonar generada en la inducción de la enfermedad y su comparación con el grupo tratado con dexametasona, se procedió al recuento de células totales extravasadas, y a la caracterización de las distintas poblaciones celulares.

3. METODOLOGÍA

3.2.7.1 Recuento de células totales en el lavado broncoalveolar (LBA)

Previa a la extracción de los pulmones, se lavaron ambos pulmones por triplicado con 0,6 ml de PBS. El volumen recogido de LBA se registró y se separó una alícuota para la diferenciación celular y otra para el conteo celular. El volumen restante se centrifugó durante 10 minutos a 13000 rpm para separar las células sanguíneas. El sedimento con las células se conservó en seco para su posterior análisis. El recuento de células totales se realizó en cámara de recuento Bürker.

3.2.7.2 Diferenciación celular

Se tomó una alícuota de LBA bien homogenizado para fijar las células sobre un portaobjetos, utilizando una citocentrífuga (Shandon Cytospin 4, Thermo Electron Corporation) durante 5 minutos a 500 rpm. Se realizó una tinción panóptica (Panreac) de las células fijadas para cuantificar el porcentaje de cada tipo celular mediante microscopía óptica (Eclipse E200, Nikon).

3.2.7.3 Pletismografía de cuerpo entero.

La pletismografía es un método basado en la medición de cambios de presión y volumen que se utiliza para medir parámetros orientados al diagnóstico de enfermedades pulmonares o cardiovasculares.

Pletismografía viene del griego plethusmos, que significa agrandamiento. Determina el volumen de gas compresible dentro del tórax, para lo que se basa en la ley de Boyle, que dice que en un sistema cerrado a temperatura constante el producto de la presión (P) por el volumen (V) del gas es siempre constante (k); o lo que es lo mismo: $P \cdot V = k$; por lo que, si en un sistema cerrado cambiamos P o V, como su producto permanece constante, entonces el producto $P \cdot V$ antes del cambio tiene que ser igual a P.

El sujeto se sitúa dentro de la cabina de pletismógrafo totalmente sellada. Tras una espiración normal lo que se provocará es un aumento de volumen en los pulmones y un correspondiente aumento de presión (por compresión de volumen) en la cabina. Aplicando la ley de Boyle, y conociendo el volumen de la cabina antes de la inhalación, es posible calcular el cambio en el volumen de la cabina. El gas en el pulmón debe haber cambiado en la misma magnitud. De esta forma y conociendo los cambios de presión en el aparato respiratorio (incluyendo boca y pulmones), podemos calcular el volumen de gas en los pulmones tras una espiración normal o capacidad residual funcional (CRF). El volumen desplazado durante el proceso se mide usando un instrumento que recibe el nombre de neumotacógrafo.

En animales de experimentación es una técnica bastante utilizada por ser no invasiva y no necesitar de la colaboración del sujeto para las mediciones. De los valores que aporta el más empleado en la Pausa Aumentada o Penh (enhanced Pause) que es sensible a variaciones en la resistencia de las vías aéreas como puede ser la inflamación pulmonar [221, 222].

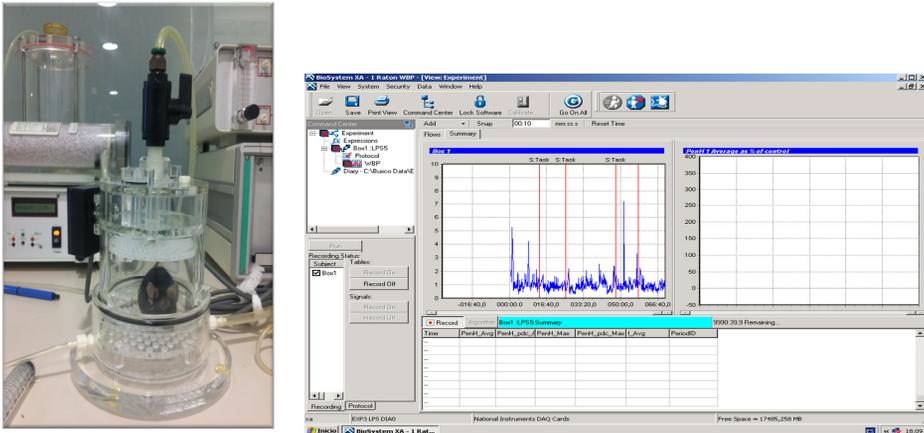


Figura 38: Pletismógrafo de cuerpo entero y registro informático de las mediciones. Sujeto en el interior de la cabina durante la medición en el pletismógrafo de Buxco Research Systems (Wilmington, NC). Los sujetos fueron aclimatados durante 15 minutos hasta que las constantes y la respiración se normalizaron en el habitáculo, después se inicia la grabación de las mediciones durante al menos 30 minutos.

3.2.8. Histología.

A partir de la muestra fijada con formaldehído e incluida en parafina se obtuvieron cortes seriados de 5 μm de grosor con un microtomo tipo Minot (Leica[®] RM 2135). Los cortes obtenidos se emplearon para:

- Inmunohistoquímica
- Tinción hematoxilina-eosina

3.2.8.1 Tinción 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

3. METODOLOGÍA

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 (x200; Leica DM6000B).

3.2.8.2 Inmunohistoquímica.

Para realizar el análisis por inmunohistoquímica de tejido pulmonar de los sujetos pacientes no fumadores, fumadores y EPOC se siguió el procedimiento que se describe a continuación, tal y como se ha descrito previamente [183].

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.

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).

3.2.8.3 Inmunofluorescencia.

Los explantes de bronquiolos de pacientes sanos no fumadores (n=10), fumadores no EPOC (n=10) y EPOC (n=7) 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).

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%.

Con los pulmones extraídos para histología durante las necropsias del modelo animal se realizó el mismo procedimiento de inclusión. 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.

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. Tanto las CEBH como los cortes del modelo murino 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 15. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados en la inmunofluorescencia:

Anticuerpo Primario:	Referencia:	Origen:
DAPI	SIGMA (236276001)	Ratón
GR-α	BD Biosciences (611227)	Ratón
MUC1-CT	Novus Biologicals (NBP1-60046)	Conejo

Anticuerpo Secundario:	Referencia:	Dilución:
Alexa Fluor 555 Donkey AntiRabbit L	Life Technologies (10749004)	1:100
Alexa Fluor 488 Goat AntiMouse	Life Technologies (10256302)	1:100

Definición de abreviaturas: DAPI: 4,6-Diamino-2fenilindol, GR-α: Recetor de Glucocorticoide α, MUC1-CT: MUC1 citoplasmáticos; FITC: Isotiocianato de fluoresceína.

3.2.9 Estudio de la expresión génica: Técnicas de Biología molecular.

3.2.9.1 Extracción de ARN total y cuantificación.

Para aislar el ARN total de CEBH de cultivo primario y de CEBH 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.

Para aislar el RNA total de las muestras obtenidas en la necropsia del modelo murino se utilizó el reactivo *TriPure Isolation Reagent* (Roche Diagnostics), que es una solución monofásica de fenol y tiocianato de guanidina (Trizol), que permite separar ARN, ADN y proteínas. Se tomaron

3. METODOLOGÍA

20 mg de pulmón conservado a -80°C , se añadió 1 ml de reactivo Tripure y se lisó con el sistema TissueLyser II (Qiagen). A continuación, se separaron las fases con cloroformo y se precipitó el ARN total de la muestra con isopropanol. A fin de facilitar dicha precipitación se le añadió a la fase acuosa 1 μl de glicógeno. Tras una centrifugación de 5 minutos a 7500 rpm, se resuspendió el ARN en 20 μl de agua DEPC.

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} .

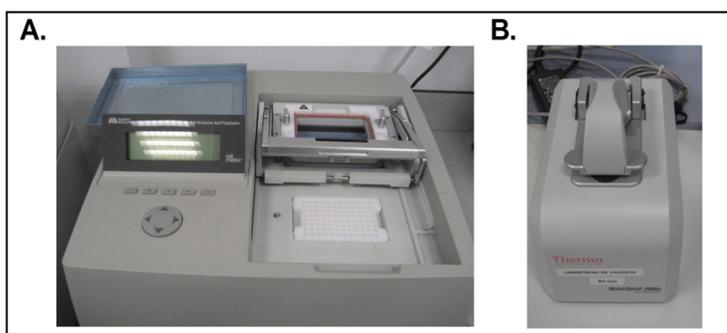


Figura 38. Extracción de ARN total y cuantificación. A. Sistema *ABI Prism TM 6100 Nucleic Acid Prep Station* para la extracción de ácidos nucleicos. B. Espectrofotómetro *NanoDrop 2000C* para la cuantificación de ácidos nucleicos.

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.

3.2.9.2 Retrotranscripción inversa (RT).

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.

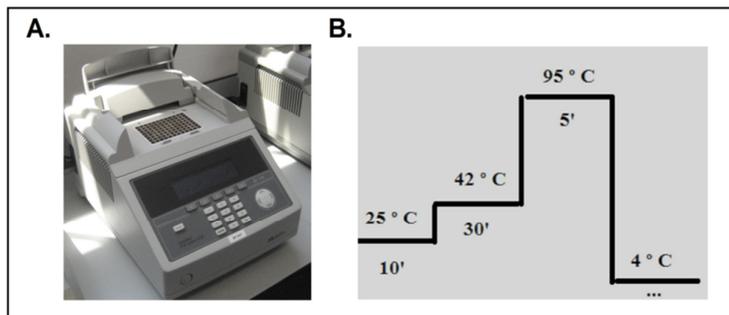


Figura 39. Retrotranscripción inversa. A. Termociclador 9800 Fast Thermal Cycler para realizar la reacción de retrotranscripción inversa. B. Etapas de la reacción. En la figura se muestran temperaturas (°C) y tiempos (minutos) de los distintos pasos de la reacción.

3.2.9.3 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.

3. METODOLOGÍA

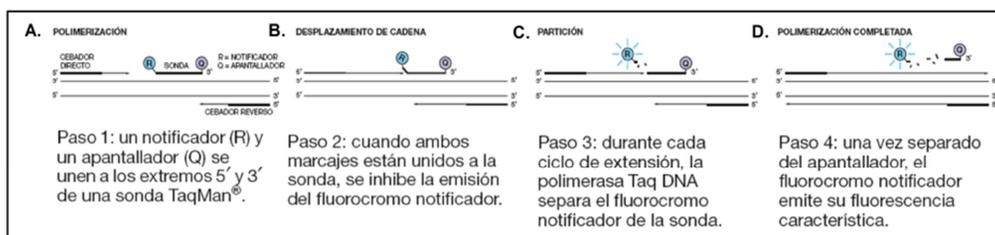


Figura 40. Los reactivos TaqMan utilizan una sonda fluorogénica y la actividad 5' nucleasa de la Taq polimerasa de ADN para detectar un producto específico de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a medida que se acumula durante la reacción (Figura extraída de “Applied Biosystems StepOne™ Real-Time 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 a tiempo real (Applied Biosystems).

Gen	Símbolo del gen	Referencia	Longitud del amplicón (pb)
MUC 1 Humano	MUC1	Hs00159357_m1	84
Muc1 Ratón	MUC1	Mm00449604_m1	71
GR-α Humano	GR-α	Hs00353740_m1	73
GR-α Ratón	GR-α	Mm00433832_m1	68
TLR4 Humano	TLR4	Hs00152939_m1	89
MKP-1 Humano	DUSP1	Hs00610256_g1	63
MKP1 Ratón	DUSP1	Mm00457274_g1	65
CD200 Ratón	CD200	Mm00487740_m1	94
RGS2 Ratón	RGS2	Mm00501385_m1	73
TSC22D3 Ratón	TSC22D3	Mm00726417_m1	61
IL-8 Humano	CXCL15	Hs00174103_m1	101
IL-8 Ratón	CXCL15	Mm04208136_m1	76
IL-13 Ratón	IL-13	Mm99999190_m1	82
CRISPLD Ratón	CRISPLD	Mm01240812_m1	84
GADPH Humano	GAPDH	4310884E	118
GAPDH Ratón	GAPDH	4352339E	107

Definición de abreviaturas: GR-α: Receptor de Glucocorticoide α; TLR4: Tol-like Receptor 4, MKP1: proteína quinasa (MAP) fosfatasa activada por mitógenos 1, RGS2: Regulador de la señalización de la proteína G2, IL-8: Interleuquina 8, IL-13: Interleuquina 13, CRISPLD: Proteína Secretora Rica en Cisteína GADPH: Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenas; (pb): pares de bases.

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.

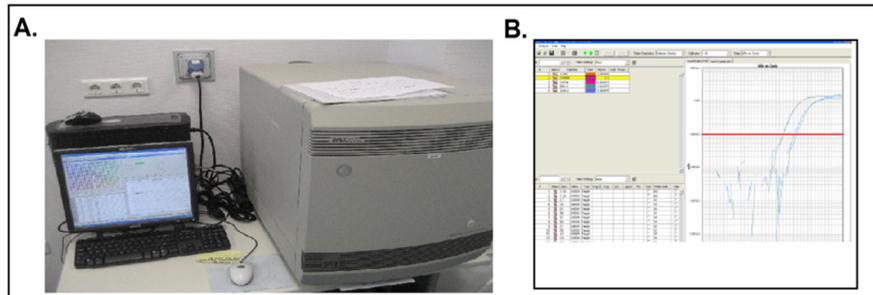


Figura 41. RT-PCR a tiempo real. A. Termociclador *7900HT Fast Real-Time PCR System* para la realización de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real (RT-PCR). B. Software *RQ Manager* utilizado para el análisis de las curvas de amplificación obtenidas y la cuantificación de la expresión 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:

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

$$\Delta Ct_2 = (Ct \text{ gen problema} - Ct \text{ gen referencia}) \text{ de la muestra 2}$$

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

3. METODOLOGÍA

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.

3.2.10 Estudio de la expresión proteica.

3.2.10.1 Western Blot.

La técnica de Western blot fue utilizada para detectar cambios en la expresión proteica de MUC1 (21 kD), tanto nuclear como citoplasmática.

En células células epiteliales bronquiales 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.

Para las muestras de tejido pulmonar tanto humanas como del modelo murino en primer lugar se procedió a un homogenizado del tejido pulmonar. Para ello se adicionó 500 μ L de Buffer C y se lisó todo el tejido pulmonar en el sistema TissueLyser II (Qiagen®) a una frecuencia de 30 s⁻¹ durante 2 minutos. A continuación se centrifugó a 10000 rpm durante 20 min. El sobrenadante se sometió a tres ciclos de congelación-descongelación con N₂ líquido y con agitación a 37°C, respectivamente. A continuación se le adicionó NP40 al 1% y durante 15 minutos se mantuvo en hielo con agitación enérgica cada 5 minutos. Finalmente se centrifugó a 10000 rpm durante 20 min a 4°C y se recogió el sobrenadante para determinar la concentración de proteína total mediante el kit del método de ácido bicinconínico (BCA).

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.

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 μ g) y el marcador de peso molecular *Amersham High-Range Rainbow* se cargaron en los pocillos de un gel de poli(acrilamida), 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 17. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados:

Anticuerpo Primario:	Referencia:	Dilución:
GR- α (origen: ratón)	Santa Cruz Biotechnnology (sc-376425)	1:1000
GR-Ser-226 (origen: conejo)	Novus Biologicals (NB100-92540)	1:1000
MUC1-CT (origen: conejo)	Novus Biologicals (NBP1-60046)	1:1000
TLR4 (origen: ratón)	Novus Biologicals (H00007099-M02)	1:1000
p-ERK (origen: ratón)	Sigma-Aldrich (M9692)	1:1000
t-ERK (origen: ratón)	Sigma-Aldrich (SAB1305560)	1:1000
p-p38 (origen: conejo)	Cell Signaling (4511)	1:1000
MKP1 (origen: conejo)	Assay Biotech (B1099)	1:1000

Anticuerpo Secundario:	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

Definición de abreviaturas: HRP: Peroxidasa de rábano.

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 problema fue normalizada al total de β -actina.

3.2.11 Inmunoprecipitación.

Una cantidad similar (200 μ g) de proteína total, citoplasmática o nuclear fue incubada con anticuerpos anti-GR α o anti-MUC1-CT. Los inmunocomplejos se precipitaron con proteína G en microesferas de *Sepharose 4B fast flow* (Sigma (P-3296)) toda la noche a 4°C. Tras 3 lavados con NET buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, y 0.1% Nonidet P-40), el material unido se aisló de los inmunoprecipitados en buffer de carga SDS-PAGE (10% SDS, 1 M Tris-HCl, pH 6.8, 50% glycerol, 10% 2-mercaptoethanol, 2% bromphenol blue) a 100°C durante 10 minutos. Los complejos proteicos inmunoprecipitados fueron analizados por western blot como se ha descrito previamente y expuestos a los anticuerpos anti-GR α o anti-MUC1-CT según correspondiera.

3. METODOLOGÍA

3.2.12 Silenciamiento de MUC1 por siRNA

El *Small interfering RNA* (siRNA) para el gen MUC1 (nº de identificación 4392420), así como el siRNA control, fueron obtenidos de Ambion (Huntingdon, Cambridge, UK).

Las células BEAS-2B fueron transfectadas con siRNA (50 nM) en medio libre de suero y antibióticos. Tras un período de 6h, el medio fue aspirado y reemplazado con medio que contenía suero durante 42 h previa estimulación. El agente de transfección fue lipofectamina-2000 (Invitrogen, Paisley, UK) a una concentración final de 2 µg/mL.

3.2.13 Ensayos ELISA para IL-8, IL-13, GM-CSF, MIP-3α y MMP9.

Se analizó la liberación de IL-8, IL-13, GM-CSF, MIP-3α y MMP9 por las células recogidas en el LBA realizado a los sujetos experimentales de todos los grupos con y sin tratamiento con dexametasona.

Las concentraciones se determinaron en sobrenadante según ficha técnica mediante kits ELISA comerciales: GM-CSF Human GM-CSF Immunoassay Quantikine® ELISA (Catalog Number DGM00); IL-8 Human CXCL8/IL-8 (DY208); IL-13 Human IL-13 Immunoassay Quantikine® ELISA (D1300B); MMP9 Human MMP-9 (DY911); MIP-3 ab100599 – MIP3a (CCL20) Human ELISA Kit

Para medir la cantidad de IL-8, IL-13, GM-CSF, MIP-3α y MMP9 se descongeló el sobrenadante del LBA alicuotado a -80°C. Posteriormente, se el KIT de Elisa correspondiente. Esta técnica se basa en un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) que permite determinar cuantitativamente los niveles en el sobrenadante de las células, siguiendo las instrucciones del fabricante. La lectura se realizó a 450 nm.

Los kits empleados utilizan la técnica de ELISA cuantitativo en sándwich en una placa incubada con un anticuerpo específico policlonal correspondiente. Se añadieron 50 µL de diluyente, y posteriormente 50 µL de estándar (31,2-2000 pg/mL para la curva patrón), controles y de muestra activada. Se incubó la placa durante 1,5 horas, durante las cuales cualquier molécula de interés presente se unió al anticuerpo inmovilizado. Se realizaron lavados, para eliminar uniones inespecíficas, y se añadieron 100 µL de un anticuerpo policlonal específico conjugado a una enzima, y se incubó durante 30 minutos más. Se realizaron lavados, se añadieron 100 µL de una solución de sustrato y se incubó 30 minutos en oscuridad. Durante este tiempo se desarrolló una coloración proporcional a la concentración de anticuerpo correspondiente unido 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

3.2.14 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 de dos colas 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 proteica corregida por los estándares internos β -actina según corresponda. El análisis de los niveles de IL-8, IL-13, GM-CSF, MIP-3 α y MMP-9 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 de la expresión y distribución de MUC1 en tejido de pacientes fumadores y con EPOC y su implicación en la aparición de corticorresistencia.

4.1.1. La expresión de MUC1 está disminuida en tejido pulmonar humano, en células epiteliales bronquiales primarias y en neutrófilos aislados de fumadores y pacientes EPOC.

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 18. 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]
VEF ₁ , % predicho	102 [97-108]	91 [90-100]	61 [55-79]
CVF, % predicho	104 [93-108]	96 [92-106]	94 [91-101]
VEF ₁ /CVF	95 [91-101]	85 [77-91]	63 [54-68]
PaO ₂ , mmHg	89 [85-93]	85 [81-90]	80 [78-83]
PaCO ₂ , mmHg	38 [36-41]	37 [35-40]	40 [38-42]

Definición de abreviaturas: EPOC: Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica; VEF₁: Volumen espiratorio forzado en el primer segundo; CVF: Capacidad vital forzada; Paquete-año: 1 año fumando 20 cigarrillos/día; PaO₂: Presión de oxígeno en sangre arterial; PaCO₂: Presión de dióxido de carbono en sangre arterial.

En primer lugar se estudió la expresión de MUC1 en tejido pulmonar humano, CEBH primarias y en neutrófilos aislados del esputo de no fumadores, fumadores y pacientes EPOC. En condiciones basales, las CEBH primarias de fumadores y pacientes EPOC mostraron una expresión significativamente disminuida de MUC1, tanto a nivel molecular de ARNm como proteico en comparación con los sanos.

MUC1 muestra actividad antiinflamatoria inhibiendo TLR4, TLR4 es activado por el humo del tabaco, por ello se analiza la expresión de TLR4.

En este caso el análisis de los marcadores epiteliales mostró un aumento significativo de la expresión de TLR4 tanto a nivel molecular (ARNm) como proteico en pacientes con EPOC y en fumadores en comparación con los sanos (Figura 42). El efecto de MUC1 se pierde y se agrava la inflamación por la activación de TLR4.

4. RESULTADOS

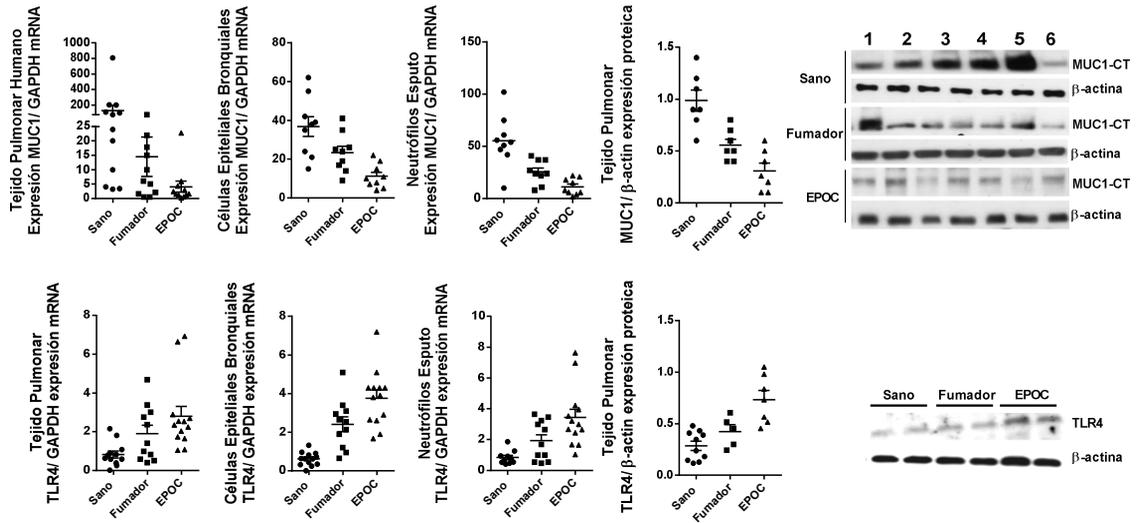


Figura 42. Expresión génica y proteica de MUC1 y TLR4 en tejido pulmonar humano, células epiteliales bronquiales humanas (CEBH) primarias y en neutrófilos aislados del esputo de no fumadores, fumadores y pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). Las CEBH primarias se aislaron de bronquiolos de no fumadores (n=9), fumadores (n=9) y pacientes con EPOC (n=9), los neutrófilos aislados de no fumadores (n=12), fumadores (n=9) y pacientes con EPOC (n=9) y el tejido pulmonar se aisló tal y como se ha descrito en métodos precedente de no fumadores (n=12), fumadores (n=11) y pacientes con EPOC (n=11) 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, 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 usando como marcadores MUC1 y TLR4. Las gráficas representan los valores de expresión de relativa de ARNm de MUC1 y TLR4 normalizada frente al grupo control usando GAPDH como control interno. Se extrajo proteína total y se determinó la expresión mediante western blott de MUC1 y TLR4 relativa a β -actina. Las gráficas representan valores de densitometría de la expresión proteica de MUC1 y TLR4 relativa a β -actina y normalizada frente al grupo control. Las imágenes representativas de los western blotts también se muestran. El análisis estadístico de los datos se ha llevado a cabo mediante un análisis de varianza (ANOVA) con $p < 0.001$. La comparación entre dos grupos se ha realizado mediante el test post hoc Bonferroni-Holm. * $P < 0.05$ respecto al grupo control; # $p < 0.05$ respecto al estímulo.

4.1.2 La estimulación celular con Extracto de Humo de Tabaco (EHT) induce una disminución de la expresión de MUC1, un aumento de marcadores inflamatorios y una peor respuesta a la dexametasona.

Dado que la expresión de MUC1 se vio disminuida en tejido pulmonar humano, células epiteliales bronquiales y neutrófilos de pacientes EPOC y fumadores en comparación con los sanos, el siguiente estudio se diseñó para ver los efectos de la dexametasona en presencia o ausencia de MUC1. Ya que el tabaco disminuye la expresión de MUC1, la dexametasona debería tener un efecto menor según nuestra hipótesis.

La exposición al EHT en células epiteliales de pacientes sanos induce una disminución en la expresión de MUC1 progresivamente conforme aumenta la concentración del EHT y el aumento de los marcadores inflamatorios Interleuquina-8 (IL-8), GM-CSF y MIP3- α . Esto

corroborar una peor respuesta a la dexametasona en las células estimuladas con EHT, en las que la expresión de MUC1 se encuentra disminuida.

Además también fueron estimuladas células epiteliales de pacientes EPOC y fumadores con LPS y EHT al 5% y se vio como el estímulo produce una mayor inflamación (elevación de IL-8) en los EPOC y en los fumadores en comparación con los sanos, y esto es progresivo conforme avanza el grado de la enfermedad. Estos resultados concuerdan con la figura anterior, donde LPS aumenta IL-8 pero también TLR4.

Se aprecia por lo tanto una clara relación entre la expresión de MUC1 en células epiteliales y la aparición de corticorresistencia.

También se realizó una curva dosis-respuesta de dexametasona a diferentes concentraciones (0,1mM, 1mM, 10mM, 100mM, 1µM). En células epiteliales de pacientes sanos estimuladas con LPS o con LPS+EHT cuando se estimula solamente con LPS la dexametasona inhibe antes.

De hecho el LogEC50 (concentración eficaz 50) es de -8,50 para las células estimuladas solo con LPS y de -6,18 para las que también son estimuladas con tabaco. La misma curva se realizó en células de pacientes EPOC y fumadores comparativamente con los sanos. Se vio claramente como a medida que avanza la enfermedad la corticorresistencia es mayor. En este caso los LogEC50 fueron -8,74 para los sanos, -8,62 para los fumadores y -7,89 para los EPOC.

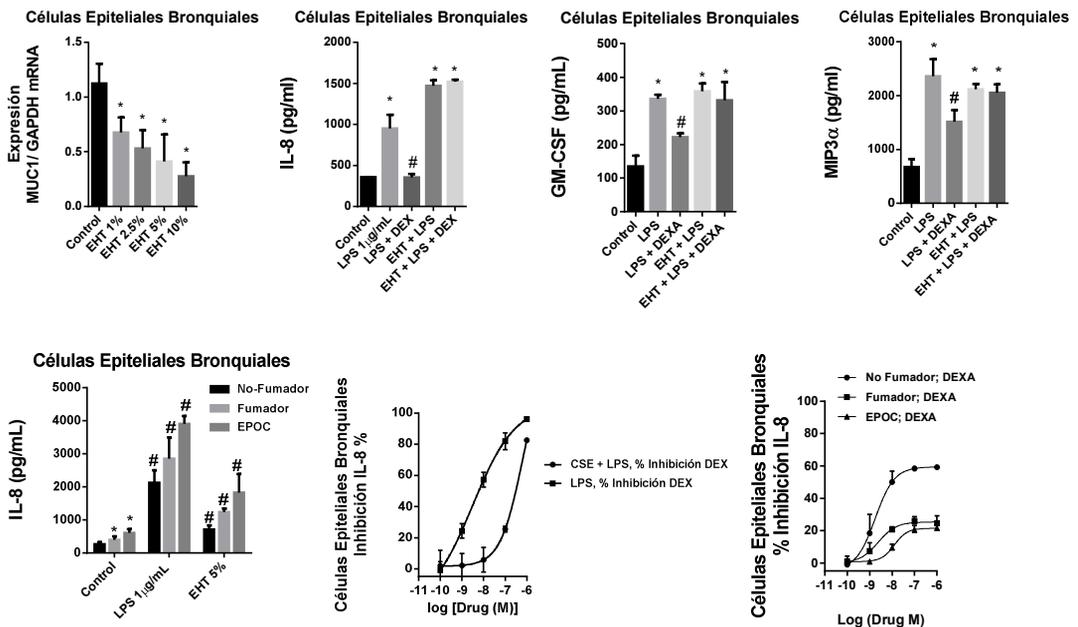


Figura 43. Expresión génica de MUC1 en distintas condiciones. Cuantificación mediante ELISA de IL-8, GM-CSF y MIP3α en diferentes condiciones. El estímulo celular del extracto de humo de tabaco (EHT) al 1%, 2,5%, 5% y 10% induce la infraexpresión de MUC1 progresivamente y el aumento de marcadores inflamatorios en pacientes sanos. Cuantificación de IL-8 mediante ELISA En pacientes EPOC y fumadores estimulados con LPS y EHT. Curva dosis-respuesta de dexametasona en células de pacientes sanos estimulados con LPS o LPS+EHT y curva dosis-respuesta de la dexametasona en pacientes sanos, fumadores y EPOC.

4. RESULTADOS

Los células epiteliales de pulmón humano (n=3) fueron expuestas durante 24 horas a concentraciones crecientes (1%, 2,5%, 5% y 10%) de Extracto de Humo de Tabaco (EHT) Tras la estimulación se extrajo ARN total para cuantificar la expresión a nivel molecular de MUC1 empleando los primers o los anticuerpos apropiados.

También fueron estimuladas con LPS (1µg/mL) y tratados con dexametasona 1µM (añadida 2h antes del estímulo) para valorar la respuesta inflamatoria se determinaron mediante ELISA IL-8, GM-CSF Y MP3α

Células epiteliales de donantes sanos (n=5), fumadores (n=5) y EPOC (n=5) fueron estimuladas en las mismas condiciones anteriores y se cuantificó IL-8, estando aumentada en fumadores y EPOC el estímulo inflamatorio es mayor en comparación con los sanos

También se muestra la curva dosis-respuesta de dexametasona a diferentes concentraciones (0,1mM, 1mM, 10mM, 100mM, 1µM) tanto de células de pacientes sanos frente a estímulos (LPS y EHT) como la comparativa de células de pacientes sanos frente a fumadores y EPOC.

El análisis estadístico de los datos se ha llevado a cabo mediante un análisis de varianza (ANOVA) con $p < 0.001$ (A-B). La comparación entre dos grupos se ha realizado mediante el test post hoc Bonferroni-Holm. * $P < 0.05$ respecto al grupo control; # $p < 0.05$ respecto al estímulo.

A raíz de los resultados anteriores en células epiteliales se decidió estudiar lo mismo en neutrófilos cuantificando la expresión de marcadores de inflamación. El estudio se realizó en neutrófilos obtenidos del esputo de pacientes sanos, fumadores y EPOC y los resultados fueron muy similares a los anteriores. Concretamente se cuantificaron IL-8 y MMP-9 citocinas típicas de neutrófilos (Figura 44).

La exposición al EHT en neutrófilos de pacientes sanos induce una disminución de la expresión de MUC1 progresivamente conforme aumenta la concentración del EHT y el aumento de los marcadores inflamatorios Interleuquina-8 (IL-8), GM-CSF y MIP3-α. Esto corrobora una peor respuesta a la dexametasona en neutrófilos estimulados con EHT, en los que la expresión de MUC1 se encuentra disminuida.

Además también fueron estimulados neutrófilos de pacientes EPOC y fumadores con LPS y EHT al 5% y se vio como el estímulo produce una mayor inflamación (elevación de IL-8 y MMP-9) en los EPOC y en los fumadores en comparación con los sanos.

Se observa una clara relación entre la expresión de MUC1 en neutrófilos y la aparición de corticorresistencia.

Al igual que con las células epiteliales en neutrófilos también se realizó una curva dosis-respuesta de dexametasona a diferentes concentraciones (0,1Mm, 1Mm, 10mM, 100Mm, 1µm). En neutrófilos de pacientes sanos, fumadores y EPOC estimuladas con LPS o con EHT Cuando se estimula con LPS la dexametasona inhibe antes la inflamación. La inflamación fue medida cuantificando IL-8 y MMP-9 a diferentes dosis de dexametasona.

En la curva donde se representa IL-8 el LogEC50 (concentración eficaz 50) es de -7,81 para los pacientes EPOC, -8,87 para los fumadores y -7,76 para los pacientes sanos todos ellos estimulados solo con LPS, en cambio los valores de LogEC50 para los estimulados con EHT 5% fueron -7,37 para los pacientes EPOC, -7,46 para los fumadores y -7,23 para los pacientes sanos.

En la misma línea en la curva donde se representa MMP-9 el LogEC50 (concentración eficaz 50) es de -8,66 para los pacientes EPOC, -8,76 para los neutrófilos de fumadores y -8,86 para los pacientes sanos todos ellos estimulados solo con LPS, en cambio los valores de LogEC50 para los estimulados con EHT 5% fueron -7,31 para los pacientes EPOC, -7,78 para los fumadores y -8,22 para los pacientes sanos.

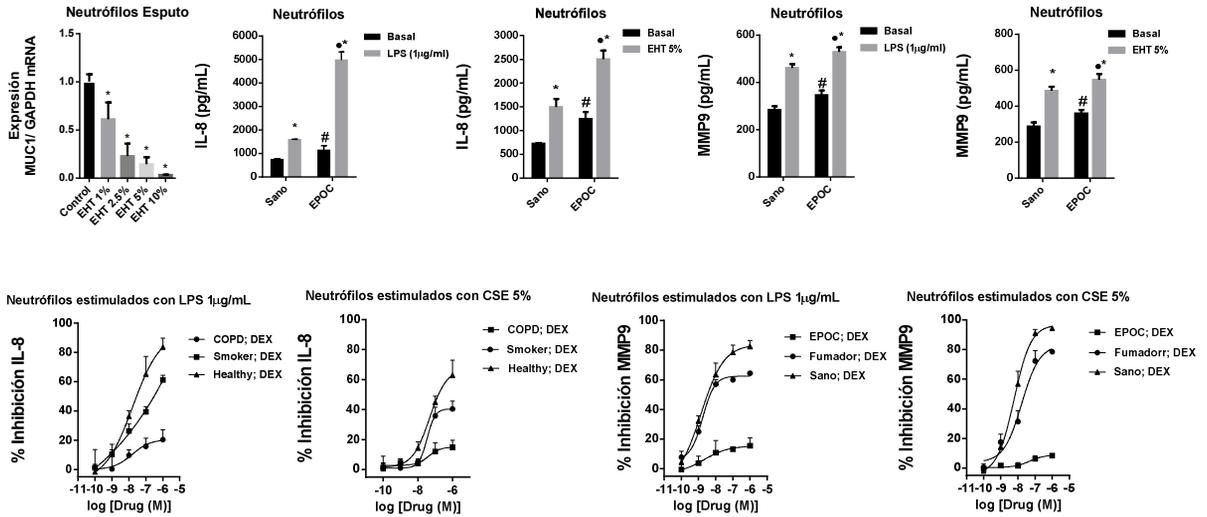


Figura 44. Neutrófilos aislados de muestras de esputo estimulados con: extracto de humo de tabaco (EHT) al 1%, 2,5%, 5% y 10% y LPS 1µg/ml. El EHT induce la infraexpresión de MUC1 y el aumento de los marcadores inflamatorios: Interleuquina-8 (IL-8) y MMP9. Curva dosis-respuesta de la dexametasona en pacientes sanos, fumadores y EPOC.

Los neutrófilos aislados de esputo de donantes sanos (n=3) fueron expuestas durante 24 horas a concentraciones crecientes (1%, 2,5%, 5% y 10%) de Extracto de Humo de Tabaco (EHT). Tras la estimulación se extrajo ARN total para cuantificar la expresión a nivel molecular de MUC1 empleando los primers o los anticuerpos apropiados. Neutrófilos de donantes sanos y pacientes EPOC fueron estimulados con EHT al 5% y con LPS 1µg/ml y se valoró la respuesta inflamatoria midiendo mediante ELISA IL-8, MMP9

También se muestra la curva dosis-respuesta de dexametasona a diferentes concentraciones (0,1mM, 1mM, 10mM, 100mM, 1µM) tanto de neutrófilos aislados de pacientes sanos frente a estímulos (LPS y EHT) como la comparativa de neutrófilos de pacientes sanos frente a fumadores y EPOC.

El análisis estadístico de los datos se ha llevado a cabo mediante un análisis de varianza (ANOVA) con $p < 0.001$ (A-B). La comparación entre dos grupos se ha realizado mediante el test post hoc Bonferroni-Holm. * $P < 0.05$ respecto al grupo control; # $p < 0.05$ respecto al estímulo.

4. RESULTADOS

4.1.3 MUC1 participa en el correcto funcionamiento del GR α nuclear. La baja expresión de MUC1 en pacientes EPOC participa en la aparición de resistencia a la dexametasona.

El silenciamiento de MUC1 conlleva la inhibición del efecto de la dexametasona en la fosforilación de ERK1/2 y en la inducción de MKP1

Una vez establecida la relación entre la no expresión de MUC1 y la aparición de corticorresistencia hemos querido dar un paso más allá y estudiar qué pasa con la expresión de MUC1 en presencia de dexametasona ya que ha sido descrito previamente que la dexametasona aumenta la expresión de MUC1.

Para ello células epiteliales Beas2b fueron silenciadas con RNA de interferencia para MUC1 (siRNA-MUC1) y posteriormente fueron utilizadas para analizar el rol de MUC1 en los efectos antiinflamatorios de la dexametasona.

En la figura 45 A se corrobora que el experimento del silenciamiento está inducido correctamente ya que al añadir dexametasona la expresión de MUC1 no se ve incrementada (ver bandas).

En la figura 45 B estudiamos la expresión proteica de p-ERK1/2 (un gen inflamatorio) y MKP1 (gen antiinflamatorio). En células no silenciadas (siRNA-MUC1(-)) el tabaco aumenta p-ERK1/2 y la dexametasona inhibe la fosforilación de ERK ½. En cambio en células silenciadas (siRNA-MUC1) el tabaco aumenta ERK ½ pero la dexametasona no inhibe su fosforilación.

Con MKP-1 en células no silenciadas el tabaco no hace ningún efecto, mientras que la dexametasona incrementa mucho su expresión tal y como debe ocurrir en condiciones normales. En células silenciadas la dexametasona no aumenta la expresión de MKP-1.

En la figura 45D se observa exactamente lo mismo pero en esta caso lo que se estudió fue la expresión génica.

En la figura 45 E se pueden ver por un lado que el silenciamiento se ha producido hasta un 25% de expresión de MUC1 y por otro lado que en presencia de tabaco la expresión de MUC1 no varía. En las células silenciadas no aumenta MUC1 en presencia de la dexametasona mientras que en las células normales sí.

La figura 45F revela que en células normales la dexametasona aumenta mucho la activación de GRE (Elemento de Respuesta a Glucocorticoides). Sin embargo cuando MUC1 es silenciado la activación de GRE es mucho menor. La presencia de MUC1 influye en el efecto de la Dexametasona para que esta produzca una correcta activación del GRE.

En resumen en siRNA-MUC1 Beas2b, la dexametasona muestra menor efecto antiinflamatorio, disminuyendo la inhibición de fosfo-ERK1/2, disminuyendo la expresión de MKP1 y disminuyendo la activación al elemento de respuesta a glucocorticoides (GRE). Los experimentos de inmunoprecipitación e inmunofluorescencia (expuestos a continuación) revelaron que MUC1 forma un complejo con GR α en el núcleo de las células epiteliales que promueve la transactivación de genes anti-inflamatorios como MKP1.

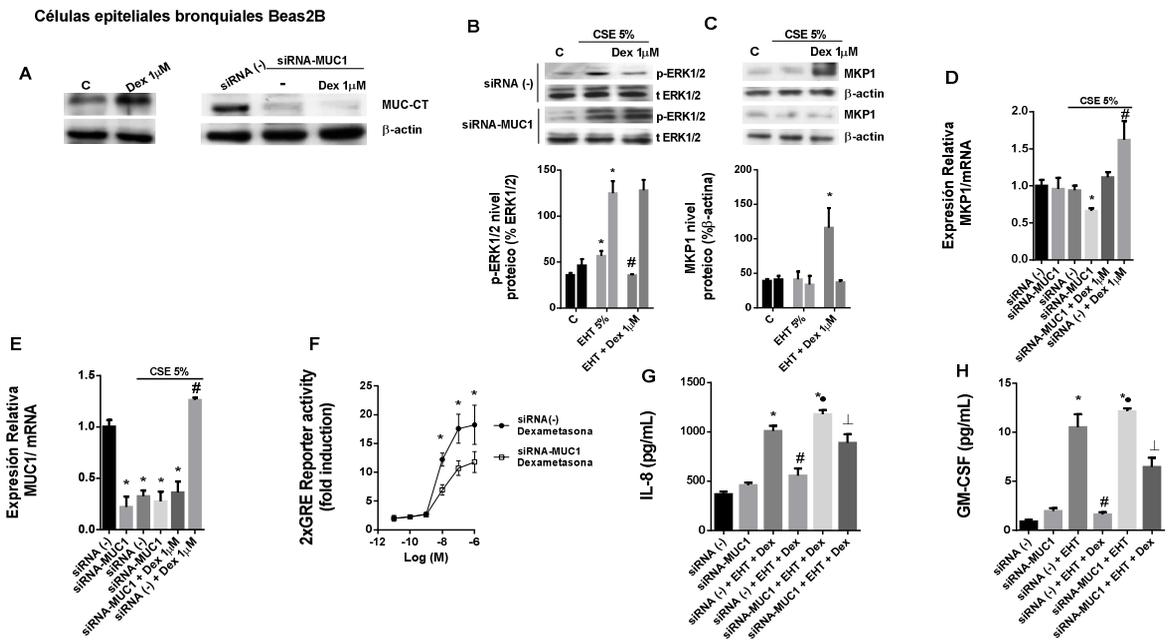


Figura 45. La expresión de MUC1 aumenta los efectos antiinflamatorios de la dexametasona en células epiteliales. MUC1 silenciado por RNA de interferencia (siRNA-MUC1) o control negativo (siRNA (-)) fueron estudiados en células Beas2b seguido de estimulación con Extracto de Humo de Tabaco (EHT) al 5% y/o dexametasona 1 μ M (añadida 2h antes del estímulo). Después de 24 horas de estimulación en presencia o ausencia de dexametasona, IL-8 y GM-CSF fueron cuantificados por ELISA.

Tras la incubación, se extrajo la proteína total, las gráficas (A, B y C) representan valores de densitometría de la expresión proteica de MUC1, p-ERK (forma fosforilada), t-ERK (total) y MKP1 y relativa a β -actina y normalizada frente al grupo control. Las imágenes representativas de los western blotts (A, B) también se muestran.

En la figura (D) la gráfica representan la expresión relativa de ARNm de MKP1 tras su silenciamiento con siARN-MUC1, las últimas gráficas muestran cómo afecta a la expresión proteica de MUC1 el tratamiento con dexametasona a las células transfectadas con siARN-MUC1, se representan valores de densitometría de la expresión proteica de MKP1, p-ERK1/2 relativa a β -actina y normalizada frente al grupo control. Las imágenes representativas de los western blotts también se muestran.

Cada gráfica representa la media de 3 experimentos independientes por condición (A–C) El análisis estadístico de los datos se ha llevado a cabo mediante un análisis de varianza (ANOVA) con $p < 0.001$ (A–C). La comparación entre dos grupos se ha realizado mediante el test post hoc Bonferroni-Holm. * $P < 0.05$ respecto al grupo control (grupo siRNA (-) estimulado); # $p < 0.05$ respecto al estímulo (grupo siRNA (-) tratado con dexametasona).

A nivel inflamatorio está descrito que el tabaco aumenta IL-8 en células normales. La dexametasona en células no silenciadas inhibe la respuesta inflamatoria y por lo tanto inhibe IL-8 pero en células silenciadas esta inhibición es mucho menor (45 G).

4. RESULTADOS

En los experimentos de inmunoprecipitación lo que vemos en condiciones basales es solamente GR α mientras que con presencia de Dexametasona vemos GR α +MUC1.

Al hacer extracción de proteína nuclear, añadir dexametasona y realizar un Western Blott para MUC1 aumenta la expresión nuclear de MUC1 y disminuye en el citoplasma (porque todo se va al núcleo) y el total. Al realizar Western Blott para GR α observamos exactamente lo mismo. Es lógico porque está saturado para GR α , esto verifica que en ambos western Blott se ha añadido la misma cantidad de proteína.

Si inmunoprecipitamos para MUC1 y posteriormente realizamos Western Blott para GR- α se observa un aumento de GR α a nivel nuclear y una disminución en el citoplasma.

El último Western Blott de la figura 46 es para verificar que la muestra que ha sido utilizada como marcador exclusivamente nuclear o citoplasmático efectivamente lo era, es decir, que miosina solo se expresa en el citoplasma e Histona solo en el núcleo.

En la figura 46 (A) a la derecha se muestran los valores de la densitometría de la Inmunoprecipitación (IP).

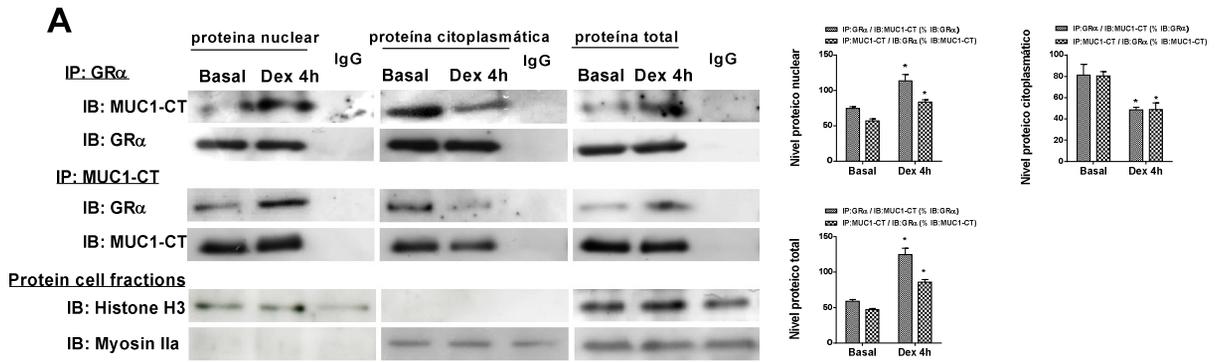
Para el estudio de la co-expresión de MUC1-CT y GR α en células Beas-2B estas células fueron tratadas con dexametasona 1mM durante 4 horas para promover la translocación nuclear de GR α .

En los experimentos de inmunoprecipitación, se observó una co-expresión de MUC1-CT y GR α tanto a nivel nuclear como citoplasmático de células Beas-2B (Figura 46, A). La proteína total, nuclear o citoplasmática fue posteriormente extraída de células estimuladas con o sin dexametasona 1 mM durante 4 horas e inmunoprecipitadas con MUC1-CT o GR α . En células estimuladas con dexametasona, la co-expresión de MUC1-CT-GR α fue incrementada en los inmunoprecipitados tanto de proteína total como nuclear (medida por Western blotting), indicando una translocación nuclear del complejo MUC1-CT-GR α después de la exposición a la dexametasona (figura 46, A). En contraste, se vio una disminución en la expresión del complejo MUC1-CT-GR α a nivel citoplasmático después de la exposición a la dexametasona. Para validar estas observaciones en tejido, la proteína total fue extraída del tejido de pacientes no respondedores a los corticoides e inmunoprecipitada con MUC1-CT o GR α seguido de inmunoblotting con anticuerpos opuestos. Se observó que la expresión del complejo MUC1-CT-GR α fue significativamente menor en los pacientes corticorresistentes.

La co-inmunofluorescencia para GR α y MUC1-CT muestra una distribución citoplasmática caracterizada por una superposición en células basales y una co-expresión nuclear en células estimuladas con dexametasona (figura 46 B).

En condiciones basales se observa MUC1 en el citoplasma, al añadir dexametasona MUC1 migra al núcleo al igual que GR α . Tras 24 horas MUC1 sigue en el citoplasma y GR- α se observa homogéneamente en el núcleo y en el citoplasma.

Beas2b células epiteliales



Células epiteliales bronquiales primarias

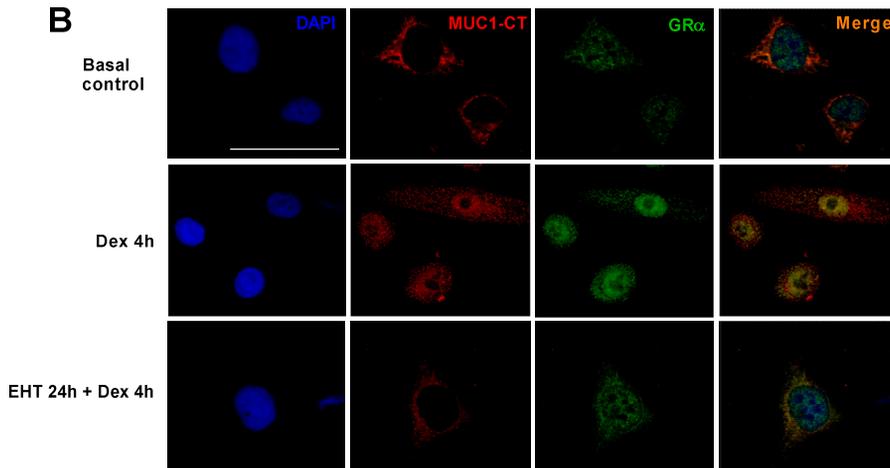


Figura 46. MUC1-CT es coexpresado con GR α para formar un complejo que transloca al núcleo seguido de la estimulación con dexametasona. El silenciamiento de MUC1 disminuye la translocación de GR α nuclear seguido de estimulación con dexametasona. Los inmunoprecipitados (IP) de proteína total, nuclear o citoplasmática de GR α o MUC1-CT fueron tomados de células Beas-2B incubadas en presencia o ausencia (basal) de dexametasona (Dex; 1 mM) durante 4 horas (A). IP fue immunoblotted (IB) con los anticuerpos opuestos MUC1-CT o GR α o con los mismos anticuerpos usados para inmuprecipitación como controles. El isotipo de IgG fue usado como control negativo. Los anticuerpos histona H3 y miosina IIa fueron usados en Western blots de varios extractos subcelulares y de proteína total para determinar la especificidad de la extracción proteica subcelular.

Células epiteliales bronquiales fueron lisadas e inmunoprecipitadas con anticuerpos GR α o MUC1-CT. Anticuerpos opuestos fueron probados con IB para analizar la expresión del complejo MUC1-CT-GR α . Los mismos anticuerpos fueron utilizados para valorar las variaciones y como controles. El isotipo de IgG fue usado como control negativo para la inmunoprecipitación. Se muestran Western blots representativos en la figura. Las gráficas representan la densitometría de los ratios de los niveles proteína de GR α o MUC1-CT. Para la inmunofluorescencia (B) se empleó un anticuerpo para GR α seguido de un anticuerpo secundario marcado con fluoresceína. Los núcleos se marcaron con DAPI.

Los resultados son expresados como media (SEM) de 3 experimentos independientes. One-way ANOVA corregido por post-hoc Bonferroni test. *P < .05

4. RESULTADOS

4.2 Efecto de la inhibición de Muc1 en un modelo murino de inflamación pulmonar aguda en ratones C57BL6/J Wild Type y KO para Muc1 expuestos al humo del tabaco. Aproximación clínica.

Una vez conocido el que complejo GR α y MUC-1 ayuda a los efectos de la dexametasona. Que en presencia de tabaco ese complejo no se forma y que además hemos descrito que está disminuido en pacientes EPOC, nos preguntamos qué pasaría in vivo con este complejo. Para ello hemos creado un modelo murino de inflamación pulmonar aguda por Exposición al Humo del Tabaco (EHT).

4.2.1 Validación del modelo murino de Inflamación pulmonar inducida por Exposición al Humo del Tabaco (EHT).

El modelo experimental de inducción de inflamación pulmonar por EHT, es un modelo ampliamente estandarizado que ha sido descrito en varios trabajos científicos publicados, en modelo animal tanto en rata como en ratón [198, 200, 201, 202] lo que avala la metodología empleada en este trabajo de investigación. No obstante, para cada ensayo se comprobó que se alcanzaba el estado de inflamación pulmonar en los expuestos a EHT y que existían diferencias significativas respecto al grupo control, tomando como referencia los siguientes indicadores: pérdida de peso corporal o por lo menos no aumento, evolución de las imágenes PET/CT, pletismografía de cuerpo entero, aumento de células extravasadas en lavado broncoalveolar, aumento de zonas y células inflamatorias en pulmón.

Este modelo murino fue diseñado para analizar los efectos de la inhibición de la expresión in vivo de Muc1. Esto fue posible gracias al desarrollo de modelos animales KO para Muc1, nos permite ir un paso más allá de los resultados que hemos obtenido in vitro a partir de muestras de pacientes y seguir la evolución de la inflamación por Exposición al Humo del Tabaco (EHT) pulmonar con y sin tratamiento con dexametasona. Lo hemos realizado comparativamente en dos modelos animales simultáneos: uno con la cepa KO para Muc1 y otro Wild Type.

4.2.2 Efecto farmacológico de la Dexametasona 3 y 10 mg/Kg/día vía oral, en inflamación pulmonar aguda inducida con humo de tabaco en ratones C57BL6/J.

Entre los resultados que nos aportan mayor información del proceso inflamatorio se encuentran: la evolución animal mediante la cuantificación de imágenes PET/CT, la pletismografía y las células inflamatorias en lavado broncoalveolar que se observan aumentadas ante la inflamación que genera la exposición al humo del tabaco y/o al LPS.

4.2.2.1 Incremento del recuento total de células en LBA y de la pausa aumentada (Penh) en los grupos KO Muc1 tanto con o sin tratamiento. La dexametasona reduce los niveles de células inflamatorias y la pausa aumentada (Penh) en los grupos Wild Type

A día 0 y día 6 se les realizó a todos los sujetos una pletismografía de cuerpo entero tal y como se ha descrito en el apartado de métodos. Posteriormente se procedió al punto final del protocolo experimental. Se realizó el LBA y una alícuota se empleó para el conteo de células inflamatorias extravasadas y la distribución de células inflamatorias obtenidas de cada sujeto experimental. El conteo de células se realizó in situ mediante la cámara Burker al igual que el citospín, con su posterior tinción panóptica para la identificación del patrón de distribución de células inflamatorias.

La pausa aumentada (Penh) medida por pletismografía de cuerpo entero muestra como los Wild Type tienen una respuesta terapéutica dosis-dependiente, en cambio los KO-Muc1 responden peor a la dexametasona sobretodo a dosis bajas. En el recuento celular del lavado broncoalveolar los KO-Muc1 tienen mucha más elevación de células inflamatorias que los Wild Type, esto sugiere el carácter antiinflamatorio del Muc1. La tendencia dosis respuesta a la dexametasona se ve claramente en la disminución de las células totales en los Wild Type, sin embargo en los KO-Muc1 no se aprecia disminución de células totales en los grupos tratados. Lo mismo si valoramos la evolución del recuento celular en lavado broncoalveolar por tipo celular. Hay una mayor elevación de neutrófilos en los grupos KO-Muc1 siendo expuestos a las mismas condiciones que los Wild Type. Los KO-Muc1 mantienen un recuento celular elevado tanto de macrófagos como de neutrófilos aumentado en todas las condiciones con respecto al grupo control.

Otro dato que corroboraría in vivo el efecto antiinflamatorio de Muc1 es como en los KO para Muc1 la elevación de las células inflamatorias tanto totales como por tipo celular es muchísimo mayor (observar escala en las gráficas) que en los Wild Type expuestos exactamente a las mismas condiciones.

4. RESULTADOS

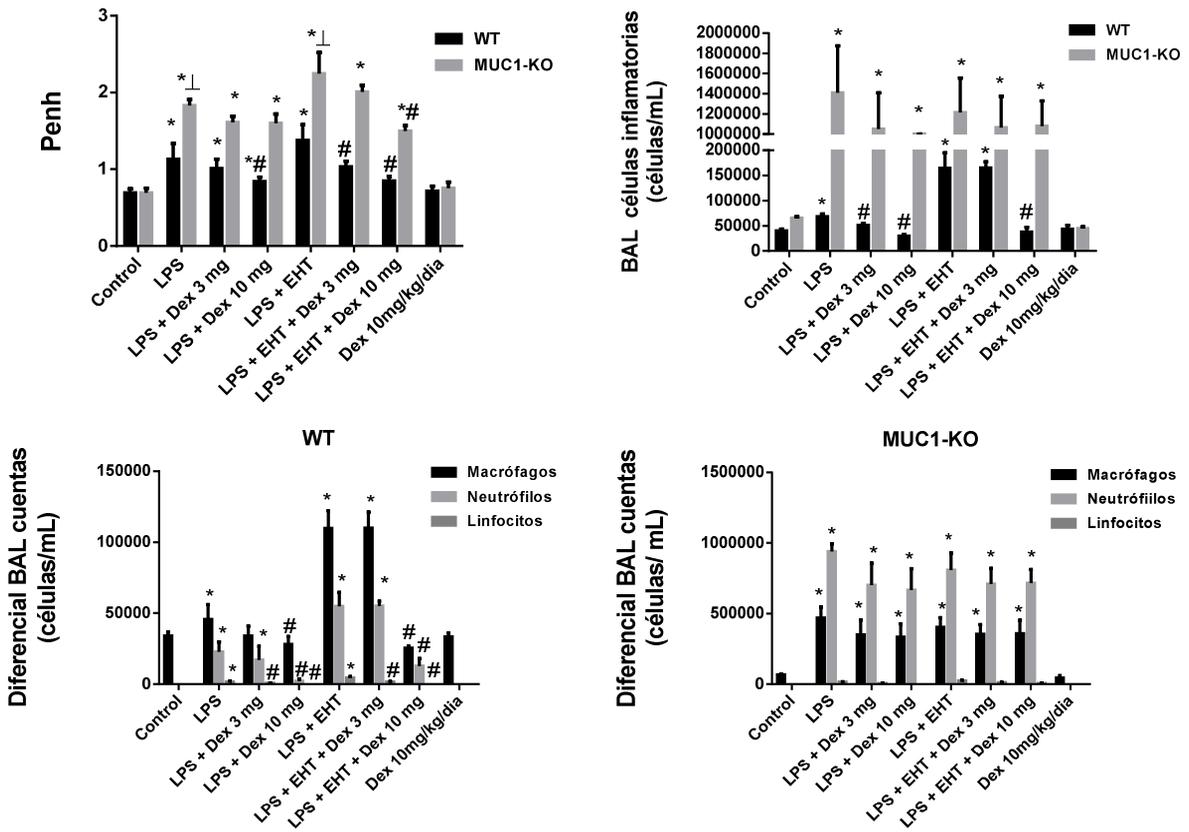


Figura 47. Pausa aumentada (Penh) medida por pletismografía de cuerpo entero, recuento de lavado broncoalveolar de células inflamatorias totales y diferenciadas por tipo celular para ambos grupos Wild Type y KO-Muc1. La pausa aumentada muestra como los Wild Type (n=8) tienen una respuesta terapéutica dosis-dependiente, en cambio los KO-Muc1 (n=8) responden peor a la dexametasona sobretodo en dosis bajas. En el recuento celular del lavado broncoalveolar los KO-Muc1 tienen mucha más elevación de células inflamatorias que los Wild Type, esto sugiere el carácter antiinflamatorio del Muc1. La tendencia dosis respuesta a la dexametasona se ve claramente en la disminución de las células totales en los Wild Type, sin embargo en los KO-Muc1 no se aprecia disminución de células totales en los grupos tratados. Lo mismo si valoramos la evolución del recuento celular en lavado broncoalveolar por tipo celular. Hay una mayor elevación de neutrófilos en los grupos KO-Muc1 siendo expuestos a las mismas condiciones que los Wild Type. Los KO-Muc1 mantienen un recuento celular elevado tanto de macrófagos como de neutrófilos aumentado en todas las condiciones con respecto al grupo control. Los resultados fueron analizados por ANOVA de dos vías seguido del test post hoc de Bonferroni. *p<0,05 comparado al control; #p<0,05 comparado al EHT.

En la misma línea, la cuantificación por ELISA de los marcadores inflamatorios obtenidos del Lavado Broncoalveolar (n=8 de cada grupo) muestra una respuesta dosis-respuesta a la dexametasona en los grupos Wild Type mientras que en los KO Muc1 la corticorresistencia es evidente incluso a altas dosis. Además una vez más se confirma el papel antiinflamatorio de Muc1 ya que en las mismas condiciones de estimulación la elevación de marcadores inflamatorios como IL-8 e IL-13 es mucho mayor en los KO.

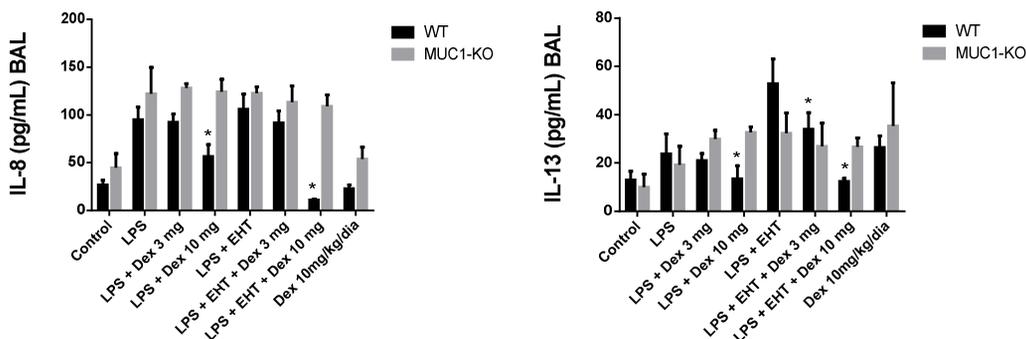


Figura 48. Determinación mediante ELISA de IL-8 e IL-13 en BAL en los dos grupos KO-Muc1 y WT expuestos a diferentes condiciones. IL-8 e IL-13 son marcadores inflamatorios muy utilizados, mientras que en los grupos Wild Type tratados con dexametasona a diferentes dosis hay una disminución dosis dependiente de estas interleuquinas tanto de IL-8 como de IL-13; en los sujetos KO-Muc1 no se aprecia disminución de ninguna de estas interleuquinas en los grupos tratados con respecto al grupo inducido con LPS o LPS+EHT.

4.2.2.2 La expresión de Muc1 se activa en la respuesta antiinflamatoria de los corticoides además está relacionada con la activación de GR- α . La exposición a estrés oxidativo (EHT) reduce la expresión de Muc1.

Los resultados muestran como la expresión de Muc1 se ve aumentada en los grupos Wild Type tratados con dexametasona, además se ve una respuesta dosis dependiente, de alguna manera Muc1 se activa en la respuesta antiinflamatoria a las corticoides. En cambio en los KO, como cabe esperar, la no expresión es constante en todos los grupos. En la misma línea la expresión de GR- α elemento clave en la respuesta de los corticoides, a pesar de que en los grupos control de Wild Type y KO-Muc1 la expresión es similar, cuando son sometidos a estímulos inflamatorios y/o a tratamientos con dexametasona la expresión se ve aumentada significativamente en los grupos Wild Type con respecto a los KO-Muc1. Es decir, existe una relación entre la expresión de Muc-1 y la activación de GR- α .

Los resultados de los experimentos de este estudio también muestran como la expresión de Muc-1 y de GR- α dentro de los Wild Type es ligeramente menor en los grupos expuestos al estímulo del EHT, debido a niveles intracelulares de especies reactivas de oxígeno inducidos por EHT.

Los receptores tipo Toll (TLR) median la respuesta inmune innata, forman parte de una clase de receptores de reconocimiento de patrones y juegan un papel fundamental en la defensa contra patógenos microbianos. Sin embargo, el exceso de respuestas mediadas por TLR puede desencadenar en sepsis, la autoinmunidad y la inflamación crónica. Para evitar la activación excesiva de múltiples mecanismos de TLR, las células han evolucionado y han ido desarrollando mecanismos que inhiben las reacciones inmunes innatas.

4. RESULTADOS

La estimulación de TLRs induce la expresión del gen que codifica la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK) fosfatasa-1 (MKP-1), una fosfatasa de especificidad dual localizada a nivel nuclear que desfosforila preferentemente MAPK p38 y la quinasa c-Jun N-terminal (JNK), lo que resulta en la atenuación de la producción provocada-TLR de citocinas proinflamatorias. MKP-1 está después de la traducción modificada por múltiples mecanismos, incluyendo la fosforilación. Un estudio demuestra que MKP-1 también es acetilada en un residuo de lisina clave después de la estimulación de TLRs. La acetilación de MKP-1 promueve la interacción de MKP-1 con su MAPK p38 sustrato, lo que resulta en la desfosforilación de la MAPK p38 y la inhibición de la inmunidad innata. Por lo tanto MKP-1 es un efector de retroalimentación negativa que reprime vías de señalización pro-inflamatorias mediadas por MAPK y la secreción de citocinas en células de músculo liso de las vías respiratorias humanas.

CD200 y su receptor CD200R, tienen un papel en el control de procesos inflamatorios perjudiciales. En la actualidad, la única función identificada para CD200 es como un ligando para CD200R. Estas proteínas interactúan en la activación de la señalización anti-inflamatoria por las células que expresan CD200R. Cuando esta interacción se vuelve deficiente con el envejecimiento o la enfermedad se produce inflamación crónica.

La expresión de MPK-1 Y CD200 es mucho mayor en los Wild Type, además existe relación dosis-respuesta con la dexametasona. Mientras que en los KO-Muc1 la expresión de estos dos genes es mucho menor, lo que demuestra la implicación de Muc-1 en la activación de esta ruta de señalización.

La expresión de RGS2 inducida por el agonista β 2 es un mecanismo genómico de broncoprotección que se ve reforzada por los glucocorticoides. Funcionalmente, RGS2 reduce el flujo de calcio intracelular libre provocado por la histamina, metacolina, leucotrienos y otros espasmógenos. Por otra parte, la protección contra el aumento calcio libre intracelular espasmógeno, después de un tratamiento durante 6 h con LABA más corticosteroide depende de RGS2.

El factor de transcripción GILZ (cremallera de leucina inducida por glucocorticoides) codificada por Tcs22d3, protege líneas de células T frente a la apoptosis inducida por la retirada de citocinas o la estimulación con TCR y Ddit4 inhibió la muerte inducida por dexametasona de los timocitos. Este gen codifica la proteína glucocorticoide antiinflamatorio (GC) inducida por la cremallera de leucina. La expresión de este gen estimulado por los glucocorticoides y la interleucina 10, que parece desempeñar un papel clave en los efectos antiinflamatorios e inmunosupresores de este esteroide. Esta proteína también se ha demostrado que inhibe moléculas pro-inflamatorias.

En la misma línea la expresión de RGS2 y Tcs22d3 es dosis dependiente en los Wild Type mientras que la expresión en los KO-Muc1 es mucho menor.

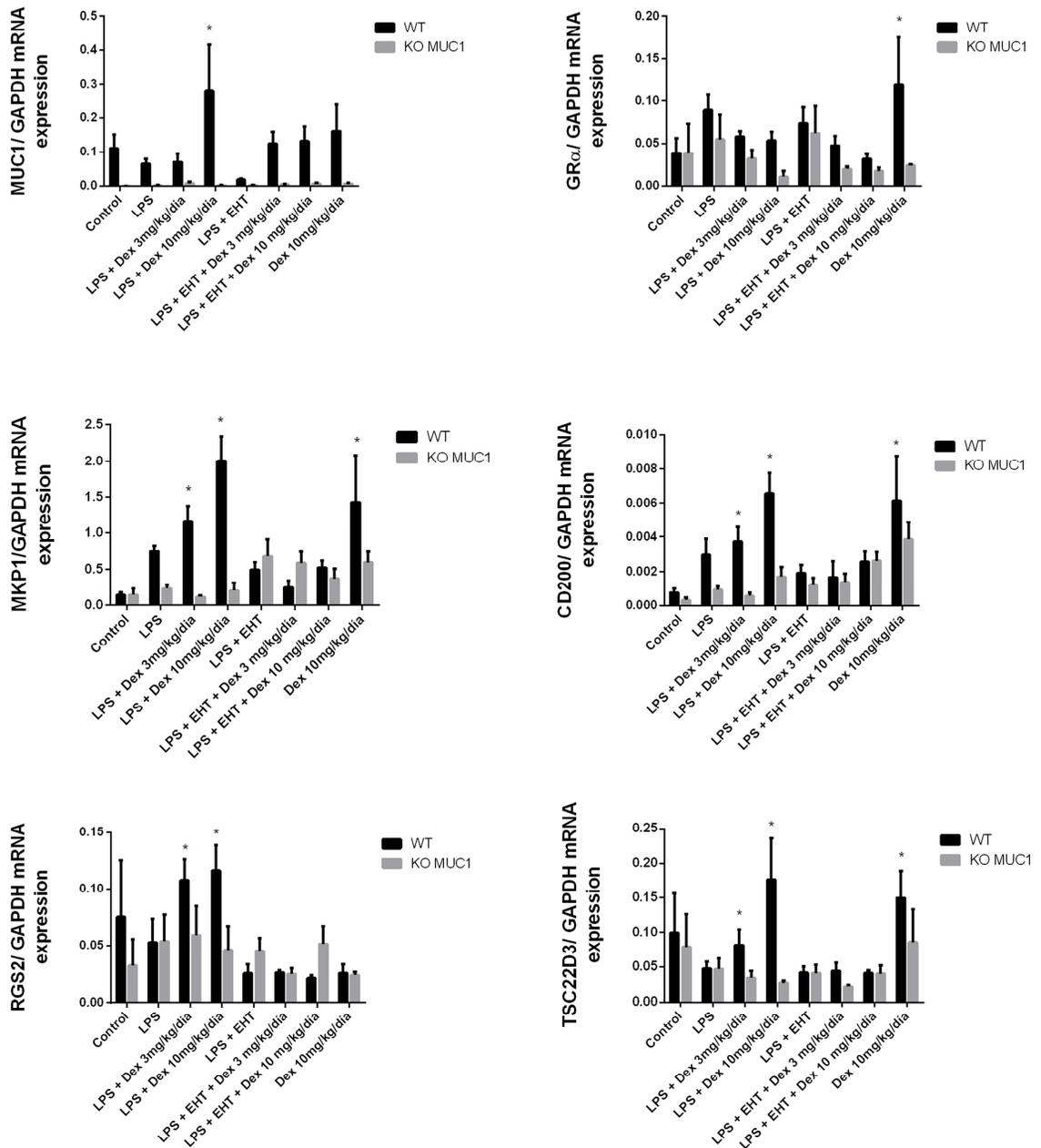


Figura 49. Expresión génica de MUC1, GR-α, MKP-1, CD200, RGS2 y TSC22D3 en BAL aislado del modelo murino de ambos grupos sometidos a las condiciones descritas previamente. El lavado broncoalveolar se aisló durante la necropsia de todos los grupos del modelo murino (n=8) y se obtuvo ARN total, tal y como se describe en la sección de Métodos. Se determinó la expresión de ARNm mediante PCR a tiempo real con las sondas apropiadas. En la figura se muestra la expresión basal de los transcritos de ARNm usando como marcadores de MUC1, GR-α, MKP-1, CD200, RGS2 y TSC22D3. La no expresión de Muc 1 y el humo del tabaco parecen disminuir la expresión de MKP-1, CD200 Y RGS2 inhibiendo cascadas de de señalización que juegan un papel clave en la respuesta antiinflamatoria de los corticoides. El análisis estadístico de los datos se ha llevado a cabo mediante un análisis de varianza (ANOVA) con p<0.001 (A–D). La comparación entre los grupos se ha realizado mediante el test post hoc Bonferroni-Holm. * P<0.05 respecto al grupo control; #p<0.05 respecto al estímulo.

4. RESULTADOS

4.2.2.3 La expresión de Muc1 mejora la histología pulmonar producida por LPS y/o EHT y revierte la inflamación en los grupos tratados con dexametasona.

Se realizaron tinciones de hematoxilina-eosina para estudiar la histología del tejido pulmonar. Se realizaron cortes de pulmón incluido en parafina de 5µm de espesor y se observó el parénquima pulmonar, los vasos sanguíneos y las vías aéreas.

La tinción de hematoxilina-eosina del grupo control nos permite identificar un parénquima pulmonar sano, vías respiratorias sin deteriorar y vasos sanguíneos de lumen y espesor habitual; en definitiva, una distribución y una arquitectura pulmonar propia de un sujeto sano en ausencia de enfermedad. En los grupos expuestos a LPS, EHT y LPS+EHT el se observa una marcada inflamación del parénquima, con infiltración de células inflamatorias en el espacio aéreo alveolar, siendo mucho más marcada esta inflamación en los sujetos KO-Muc1

Dicho inflamación se ve revertida en el grupo Wild Type tratado con dexametasona tal y como se ve reflejado en la figura 50.

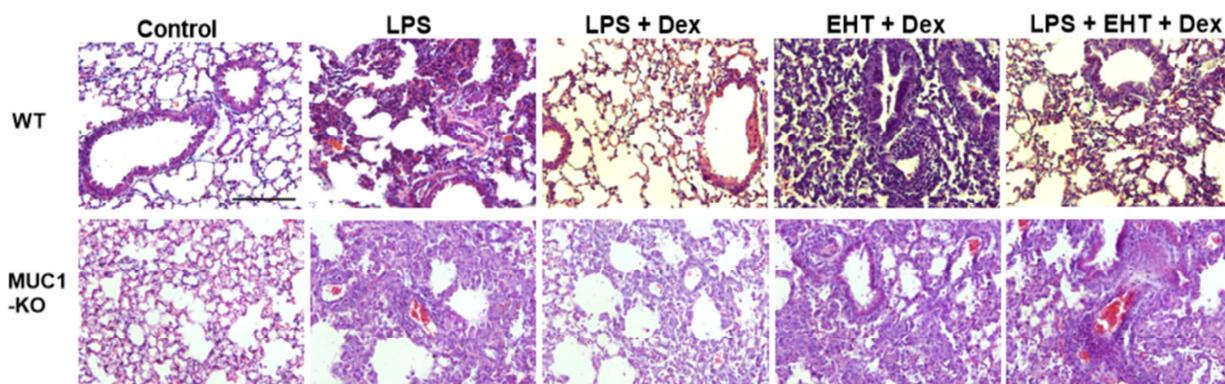


Figura 50. La dexametasona en el grupo Wild Type mejora la histología de tejido pulmonar revirtiendo la inflamación. El modelo consta de cinco grupos experimentales para Wild Type y para KO-Muc1: Control (n=8), LPS (n=8), LPS+Dex (n=8), EHT+Dex (n=8) y LPS+EHT+Dex (n=8). La Inflamación fue inducida a día 0 mediante la administración intranasal de LPS o salino en el grupo control seguida de exposición al humo del tabaco en los grupos expuestos. Se administró Dexametasona 10mg/kg/día vía oral forzada en los ratones de los grupos LPS+Dex, EHT+Dex y LPS+EHT+Dex y la misma cantidad de vehículo en el grupo Control y LPS. Tinción hematoxilina-eosina: representación del parénquima pulmonar, bronquios y arterias acinares. En los grupos expuestos a LPS, EHT y LPS+EHT se observa una marcada inflamación del parénquima, con infiltración de células inflamatorias en el espacio aéreo alveolar, siendo mucho más marcada esta inflamación en los sujetos KO-Muc1

4.2.2.4 *Muc1* participa en el correcto funcionamiento del GR α nuclear. La no expresión in vivo de *Muc1* participa en la aparición de resistencia a la dexametasona.

Al igual que en el ensayo en humanos también se estudió en el modelo murino la expresión de posibles mediadores inflamatorios como IL-8 y IL-13, así como la relación de su elevación con la expresión de *Muc1* in vivo o la activación de GR- α

Tras la estimulación se extrajo ARN total para cuantificar la expresión a nivel molecular de *Muc1*, GR- α , IL-8 y IL-13 empleando los primers apropiados.

En los Wild Type la exposición al EHT induce la infraexpresión de *Muc1* progresivamente y el aumento de los marcadores inflamatorios Interleuquina-8 (IL-8) e Interleuquina-8 (IL-13). Esto corrobora una peor respuesta a la dexametasona en los sujetos estimulados con EHT, en las que la expresión de *Muc1* se encuentra disminuida.

En los KO-*Muc1* el papel antiinflamatorio de esta mucina queda claramente demostrado, ya que en los grupos estimulados la elevación de estos dos marcadores inflamatorios es mucho mayor y la respuesta a la dexametasona así como la activación de GR- α es prácticamente nula en comparación con los Wild Type.

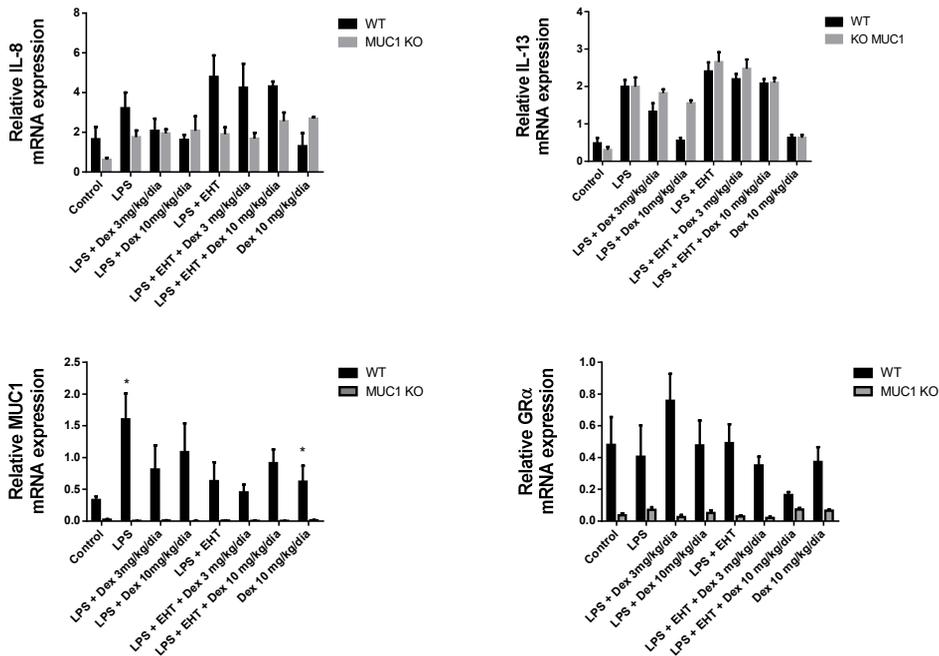


Figura 51. Expresión a génica en parénquima pulmonar de *Muc1*, GR- α , IL-8 y IL-13. El estímulo del extracto de humo de tabaco induce la infraexpresión de MUC1 progresivamente y el aumento de los marcadores inflamatorios Interleuquina-8 (IL-8) e Interleuquina-13 (IL-13) en los Wild Type (n=8). En los KO-*Muc1* (n=8) la elevación de estos dos marcadores inflamatorios es mucho mayor y la respuesta a la dexametasona así como la activación de GR- α es prácticamente nula en comparación con los Wild Type. El análisis estadístico de los datos se ha llevado a cabo mediante un análisis de varianza (ANOVA) con $p < 0.001$ (A–B). La comparación entre los grupos se ha realizado mediante el test post hoc Bonferroni-Holm. * $P < 0.05$ respecto al grupo control; # $p < 0.05$ respecto al estímulo

4. RESULTADOS

4.2.2.5 *Muc1* participa en la expresión de *CRISPLD2*, gen que puede modificar la capacidad de respuesta a glucocorticoides.

Tal como hemos estudiado previamente la expresión de *MPK-1*, *CD200*, *RSG2* y *TCS22D3* en BAL es mucho mayor en los Wild Type, además existe relación dosis-respuesta con la dexametasona. Lo mismo sucede en muestras aisladas de parénquima pulmonar. Mientras que en los *KO-Muc1* la expresión de estos genes es mucho menor, lo que demuestra la implicación de *Muc-1* en la activación de esta ruta de señalización. Hemos querido dar un paso más en esta cascada de señalización y estudiar la expresión de *CRISPLD2* en parénquima pulmonar.

La expresión de este gen así como sus niveles de proteína se incrementan en el músculo liso de las vías respiratorias en respuesta a tratamiento con glucocorticoide. *CRISPLD2* está descrito como un gen que puede modificar la capacidad de respuesta a glucocorticoides en el asma, puesto que la EPOC también es una enfermedad inflamatoria pulmonar hemos querido ver su expresión en nuestro modelo. Y una vez más un gen con un papel claramente demostrado en la respuesta a corticoides, muestra expresión nula en los *KO-Muc1*. En los Wild Type, tal y como cabía de esperar, su expresión es dosis dependiente.

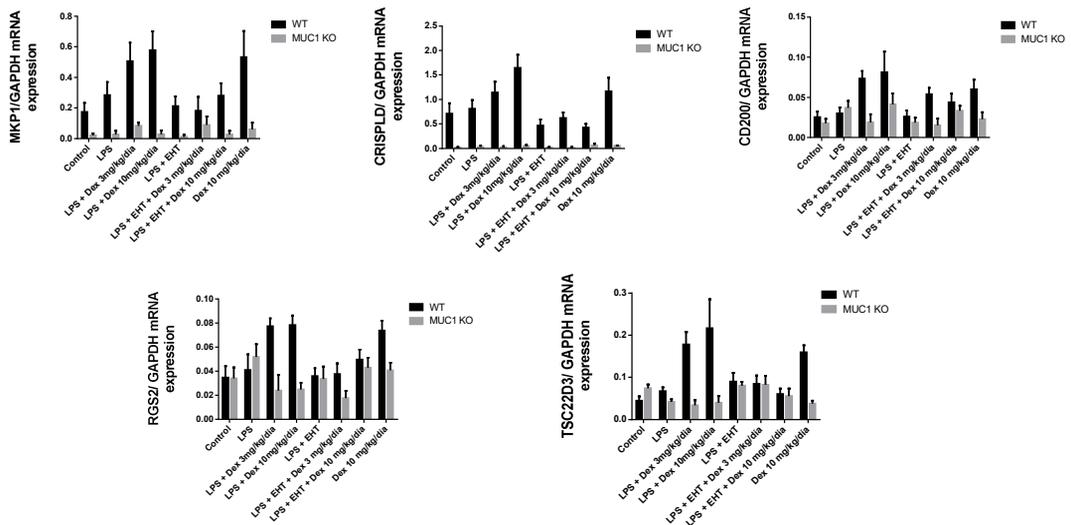


Figura 52. Expresión de génica en parénquima pulmonar de *MUC1*, *GR-α*, *MPK-1*, *CD200*, *RGS2* y *TSC22D3* en tejido pulmonar aislado del modelo murino de ambas cepas sometidas a las condiciones descritas previamente. El tejido pulmonar se aisló durante la necropsia de todos los grupos del modelo murino (n=8) y se obtuvo ARN total, tal y como se describe en la sección de Métodos. Se determinó la expresión de ARNm mediante PCR a tiempo real, respectivamente, con las sondas apropiadas. En la figura se muestra la expresión basal de los transcritos de ARNm usando como marcadores de *MPK-1*, *CRISPLD*, *CD200*, *RGS2* y *TSC22D3*. La no expresión de *Muc 1* y el humo del tabaco parecen disminuir la expresión de *MPK-1*, *CD200*, *RGS2* inhibiendo cascadas de de señalización que juegan un papel clave en la respuesta antiinflamatoria de los corticoides.

El análisis estadístico de los datos se ha llevado a cabo mediante un análisis de varianza (ANOVA) con $p < 0.001$. La comparación entre los grupos se ha realizado mediante el test post hoc Bonferroni-Holm. * $P < 0.05$ respecto al grupo control; # $p < 0.05$ respecto al estímulo.

4.2.2.6 Progresión de la Inflamación Pulmonar: Cuantificación de tejido inflamatorio pulmonar con la técnica de imagen diagnóstica PET/CT. La Dexametasona reduce el área inflamatoria disminuyendo la captación pulmonar de 18F-FDG en los grupos Wild Type con respecto a los KO Muc1.

La combinación de la tecnología multimodal PET/CT nos permite evaluar la progresión de la enfermedad así como certificar la correcta inducción de la misma. Las imágenes de PET y CT se obtuvieron consecutivamente a día 0 (antes de la inducción de la enfermedad) y a día 6 (antes de llevar a cabo el punto final). Las imágenes obtenidas fueron fusionadas, analizadas y posteriormente cuantificadas.

En la figura 53 observamos una representación cuantitativa y cualitativa de la técnica de imagen PET. Se analizaron tres planos en cada imagen obtenida, el plano axial, coronal y sagital. Los valores de SUV (Standard Uptake Value) corresponden con la captación de glucosa marcada en el tejido. El tejido inflamatorio al igual que el oncológico tiene el metabolismo glicólico aumentado, en roedores sanos de pequeño tamaño el valor de captación obtenida en una región de interés (ROI) pulmonar rondaría un SUV de 0,5-0,6 tal como podemos observar en los controles de Muc1 y Wild Type ambos con una n=8. Además al ser los glucocorticoides altamente hiperglucemiantes realizamos un grupo control tratado con dexametasona a dosis altas (10 mg/kg) para comprobar que la 18F-FDG no estaba siendo desplazada por la glucosa endógena y corroborar que nuestra técnica de imagen no nos estaba dando falsos negativos. La cuantificación de los subgrupos Wild Type (n=8 en cada uno de ellos) muestra como los valores del SUV se mantienen elevados en los subgrupos no tratados, lo que corrobora la correcta inducción de la enfermedad mientras que en los tratados con dexametasona la disminución del SUV y por lo tanto de la inflamación es dosis-dependiente. En los Muc1 la inflamación se corrobora también por la elevación del SUV mucho más marcada, lo que de nuevo muestra el papel antiinflamatorio de esta mucina y además la respuesta a la dexametasona es prácticamente nula. Lo que corrobora una vez más una relación entre la expresión de Muc1 y la aparición de corticorresistencia.

También se llevó a cabo una cuantificación del CT en las mismas regiones de interés (ROIs) del PET, en este caso la cuantificación medida en Unidades Hounsfields se mantiene constante a lo largo del procedimiento en cada uno de los grupos de ambas cepas. Esto es debido a que al ser un modelo de inflamación aguda, no da tiempo a que se produzca remodelado alterando la morfología pulmonar. En cambio el SUV si que se modifica porque los cambios metabólicos preceden a los morfológicos.

La figura 53 muestra una imagen representativa de las imágenes PET de los grupos experimentales a día 6, el grupo de Wild Type sin tratamiento presenta un evidente descenso

4. RESULTADOS

de la captación de FDG a nivel pulmonar debido al efecto de la dexametasona. Esta disminución de la captación de glucosa marcada observada es menos evidente en el grupo KO-Muc1.

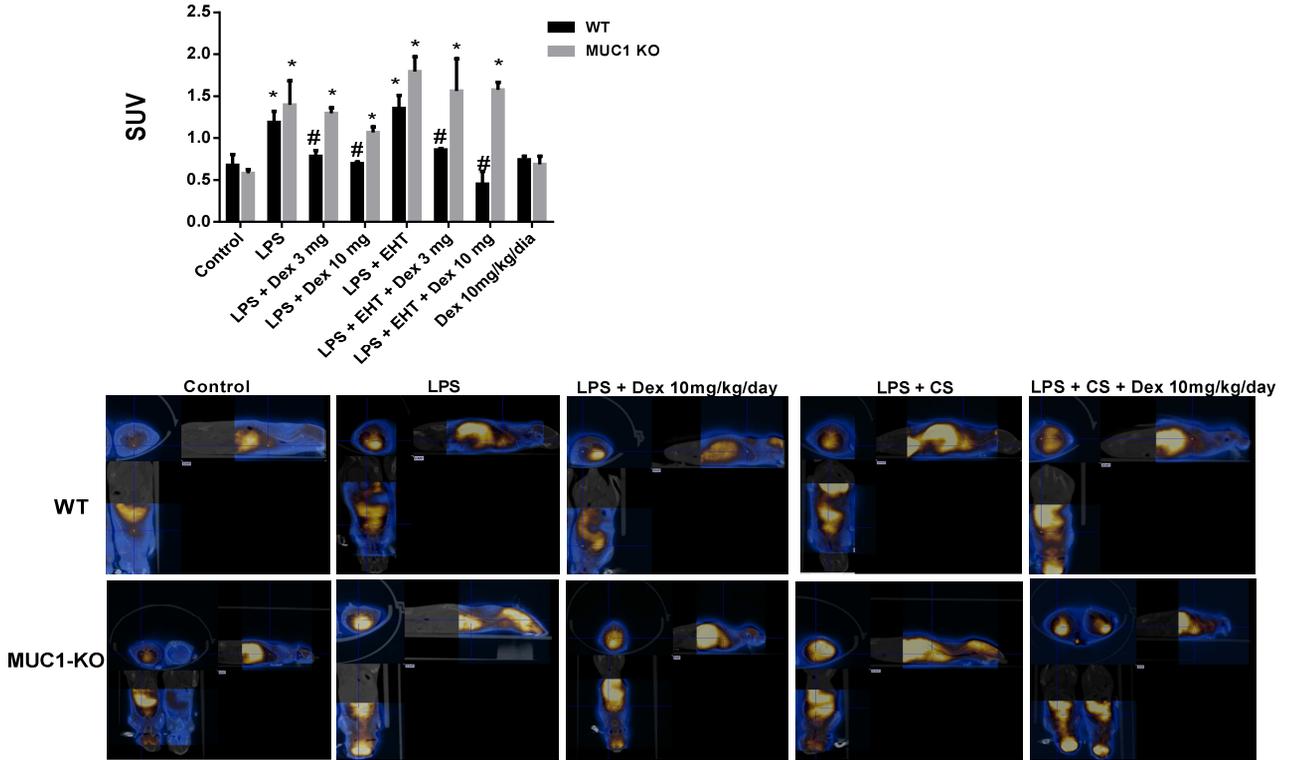


Figura 55 PET. Disminución de la captación pulmonar de 18F-FDG en el grupo Wild Type tratado farmacológicamente frente al KO-Muc1. Análisis cualitativo y cuantitativo de la captación pulmonar de 18F-FDG en ratones Control (n=8), LPS (n=8) LPS+ Dex 3mg (n=8), LPS+Dex 10 mg (n=8), LPS+EHT (n=8), LPS+EHT+ Dex 3mg (n=8), LPS+EHT+ Dex 10mg (n=8), y Dex 10 mg (n=8) a día 6 tanto para el grupo Wild type como para Muc 1. En el modelo expuesto a EHT se indujo la inflamación mediante instilación intranasal 75µg de LPS seguido de la exposición diaria a EHT. La administración de dexametasona a dosis 3mg/kg/día y 10mg/kg/día vía oral forzada se realizó desde el día 0. Al resto de grupos se administró vehículo. PET: media de cuentas por voxel (cpv) corregida por peso y dosis inyectada obteniendo el SUV (Standard Uptake Value). La cuantificación se realizó mediante un ROI que engloba la región de captación de 18F-FDG por el pulmón. La media de cuentas por voxel cuantificada se corrigió mediante el cálculo de dosis inyectada corregida por el tiempo de decaimiento del radiofármaco. PET/CT: Se obtuvieron imágenes de todos los sujetos. La figura muestra la fusión de imágenes PET/CT para un mismo sujeto de todos los los grupos a día 6. La combinación de las imágenes PET/CT permite localizar la captación de 18F-FDG por cada sujeto, situando anatómicamente las regiones hipercaptantes del pulmón. Las imágenes nos permiten visualizar los resultados obtenidos en la cuantificación. Los resultados se expresaron como la media +/- SEM de n=8 por grupo experimental. Los resultados fueron analizados por ANOVA de una vía seguido del test post hoc de Bonferroni * (*p<0,05 frente a control el mismo día; #p<0,05 frente al grupo de wild type del mismo día. Los valores p exactos se obtuvieron con el test de U de Mann-Whitney).

4.2.2.7 La expresión proteica de GR- α es mayor en los Wild Type y además su elevación es dosis dependiente. En cambio la expresión proteica de su forma fosforilada en la Ser-226, KO-Muc1, p-38 y p-ERK ½ es mayor en los KO-Muc1 siendo proporcional al estímulo.

El receptor para glucocorticoides (GC) tiene un modo dual de acción, actúa como un factor de transcripción que se une a elementos de respuesta a glucocorticoides (GRE) tanto para el ADN nuclear como para el mitocondrial, pero también como modulador de otros factores de transcripción. Afecta a las respuestas inflamatorias, proliferación y diferenciación celular en los tejidos diana. El anticuerpo Fosfo-GR (Ser226) detecta los niveles endógenos de GR solamente cuando está fosforilada en la serina 226.

Las proteínas Kinasas mitógeno-activada p38 son una clase de proteínas que se activan en respuesta a estímulos de estrés como citocinas, radiación ultravioleta, choque térmico, choque osmótico,... y están implicadas en la diferenciación celular, apoptosis y autofagia.

La MAP Kinasa p38 (MAPK), también llamada RK o CSBP (Cytokinin Specific Binding Protein) participa en una cascada de señalización que controla las respuestas celulares a las citocinas y el estrés. p-38 y p-ERK ½ presentan una expresión proteica proporcional al estímulo (tanto inflamatorio como por la dexametasona) en ambos grupos, pero es mayor la expresión en los KO-Muc1.

La expresión proteica de GR- α concuerda con los resultados observados hasta ahora de la expresión génica de la misma, es mayor en los Wild Type y además su elevación es dosis dependiente. En cambio la expresión proteica de su forma fosforilada en la Ser-226 es mayor en los KO-Muc1. El presente trabajo ofrece la primera evidencia de interacción entre Muc1-CT y GR α , así como el posible papel protector que ejerce este complejo ejerce contra la fosforilación de Ser226-GR.

La expresión proteica de Muc1 como cabe esperar es nula en lo KO-Muc1 mientras que en los Wild Type responde a estímulos inflamatorios lo que una vez más corrobora el papel antiinflamatorio de esta mucina.

4. RESULTADOS

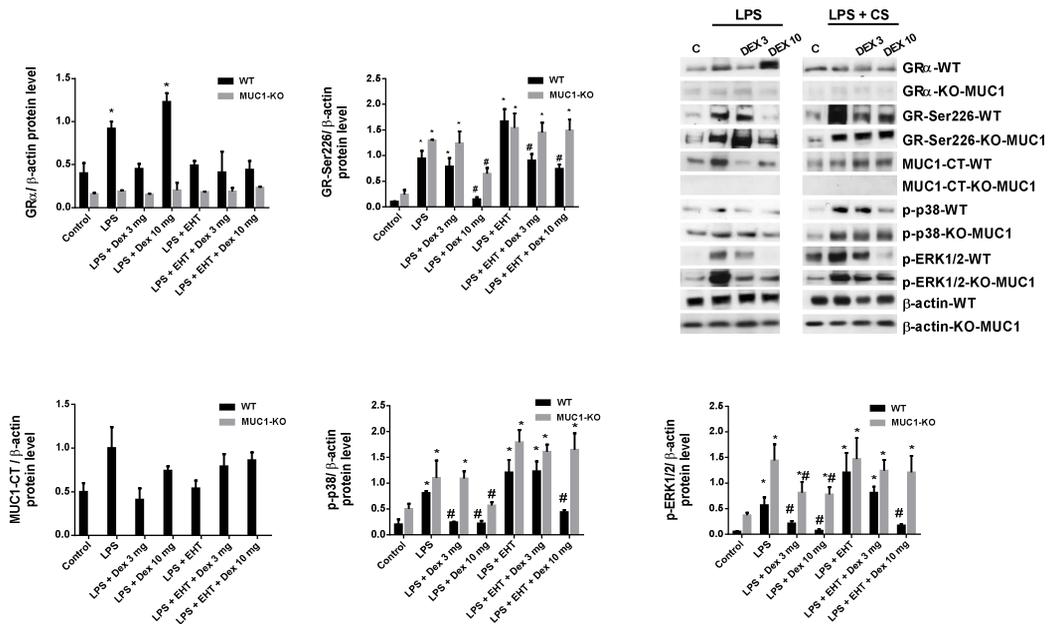


Figura 54. Expresión proteica de GR- α , GR-Ser 226, MUC1, p-38 y p-ERK 1/2 en tejido pulmonar del modelo murino de todos los grupos (n=8) de ambas cepas (Wild Type y KO-Muc1). El tejido pulmonar se obtuvo durante la necropsia y se aislaron las proteínas, tal y como se describe en la sección de Métodos (n=8). Se determinó la expresión proteica mediante western Blott. La densitometría de las bandas fue realizada empleando el software Image J 1.42 (disponible en <http://rsb.info.nih.gov/ij> USA). Cada gráfica va acompañada de su β -actina. Los datos se expresan como el ratio de proteína en su forma no fosforilada, normalizados al grupo control. Los resultados se expresan como la media (error estándar) de n=8 sujetos por condición. Se muestran las imágenes representativas del western blott. Los valores de p son significativos cuando $p < 0,05$. Los valores p exactos se obtuvieron con el test de U de Mann-Whitney).

4.2.2.8 Muc1-CT colocaliza con GR- α y transloca al núcleo después de ser estimulado con dexametasona en los Wild Type. En los KO-Muc1 esta translocación está inhibida.

A partir de la muestra fijada con formaldehído e incluida en parafina se obtuvieron cortes seriados de 5 μ m de grosor con un microtomo tipo Minot (Leica[®] RM 2135).

Estos cortes en presencia o ausencia (basal) de dexametasona (Dex 10mg/kg/día) durante los 6 días que dura el modelo animal fueron fijados y permeabilizados para ver Muc1-CT (rojo) y GR- α (verde). En los Wild Type en condiciones basales Muc1-CT colocaliza con GR- α en el citoplasma. Después de la estimulación con Dexametasona, Muc1-CT colocaliza con GR- α a nivel citoplasmático pero también a nivel nuclear.

Sin embargo, en los KO-Muc1 esta colocalización no se observa, esta inhibida por la no expresión de Muc1, queda demostrado una vez más que Muc-1 es necesario para el correcto funcionamiento de GR- α .

Esta colocalización fue observada usando un microscopio espectral confocal (Leica TCS SP2) que genera un citofluorograma bidimensional que selecciona los puntos localizados comunes a ambos anticuerpos (color blanco).

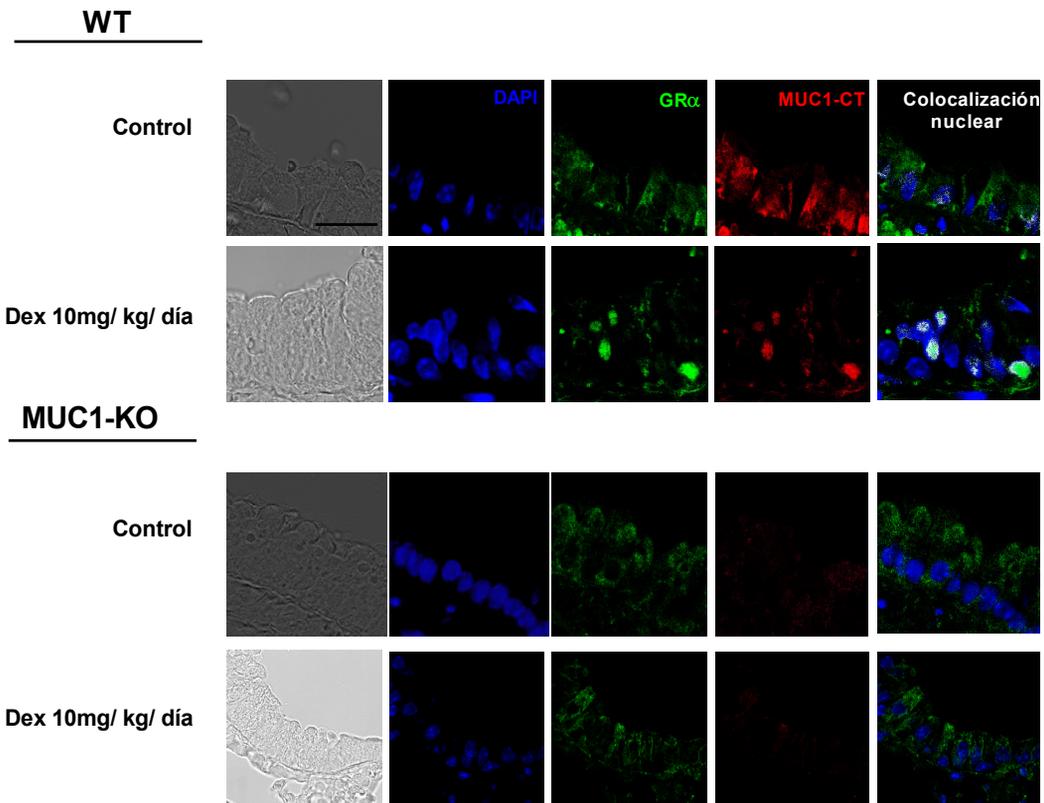


Figura 55. MUC1-CT es coexpresado con GR α para formar un complejo que transloca al núcleo seguido de la estimulación con dexametasona. Los experimentos de la figura muestran los resultados de la translocación nuclear de GR α por microscopía de inmunofluorescencia (400; Nikon Eclipse TE200 inverted microscope; Tokyo, Japan). En el compartimento subcelular que se corresponde con la tinción DAPI (núcleos) usando el software Metafluor v5. En la figura se observa la colocalización de MUC1-CT y GR α que fue realizada utilizando un microscopio confocal espectral Leica TCS SP2 con magnificación 1000 y zoom 3. Fueron utilizados láseres Rojo (HeNe 543 nm), verde (HeNe 488 nm), y azul (Ar 351 nm, 364 nm). Los estudios de colocalización fueron realizados utilizando el software Leica confocal v2.61. Un citofluorograma bidimensional fue creado entre puntos de intensidades diferentes entre verde y rojo de las imágenes de las células. Las imágenes celulares fueron colocalizadas en puntos de dos canales láseres que fueron transformados en color blanco en la imagen celular.

5. DISCUSIÓN

La mayoría de pacientes con Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC) son resistentes incluso a altas dosis de corticosteroides inhalados u orales.

La aparición de resistencia a los esteroides no se limita solo a patologías respiratorias sino que es una característica de varias enfermedades inmunes e inflamatorias, incluyendo artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria intestinal, y lupus sistémico [230].

Son múltiples los estudios que ponen en evidencia la pérdida de respuesta con el tiempo a los corticoides en varias enfermedades inflamatorias, entre ellas la EPOC [154,157]. Ni los corticosteroides inhalados ni orales suprimen la inflamación en los pulmones, y los macrófagos alveolares parecen ser resistentes a los GCs. Además, se ha sugerido que la inflamación neutrofílica que caracteriza la EPOC, a diferencia de la inflamación que caracteriza el asma eosinofílica, es insensible a los GCs. La pobreza de estos resultados parece indicar una cierta resistencia activa de los corticoides en la EPOC, al menos a nivel pulmonar. De hecho, dosis altas de estas sustancias fallan en reducir citocinas y quimosinas [158].

Por otro lado como ya ha sido comentado en la introducción, la combinación de un esteroide y de acción prolongada β 2-agonista se administra mediante inhalación son más eficaces que cualquier fármaco solo, y podría haber algo de sinergia molecular entre estos agentes.

Estudios recientes han propuesto la existencia de un perfil específico de mediadores inflamatorios moleculares que son resistentes al efecto de los corticosteroides. Entre el perfil molecular diferente, neutrófilos y monocitos humanos de pacientes sanos y EPOC pueden mostrar resistencia corticoide para la secreción y la expresión de IL1 β , IL-8, IL-18, TNF, GM-CSF, CCL-5, MMP-2 y MMP -9 entre otros [232, 233].

Una reducción en la capacidad de respuesta a los efectos antiinflamatorios de los corticosteroides es una barrera importante para la gestión eficaz de pacientes con asma grave y en la mayoría de los pacientes con Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC). Los mecanismos moleculares que conducen a la resistencia a los corticosteroides se comprenden mejor ahora, y esto ha identificado nuevos objetivos para la terapia. Está claro que hay varias vías moleculares que llevan a cabo la aparición de corticorresistencia, lo que implica que puede haber varios enfoques terapéuticos para la superación de la resistencia a los esteroides y para tratar más eficazmente a te grupo de pacientes.

5. DISCUSIÓN

Se han desarrollado estrategias para la gestión de resistencia a los esteroides entre las que se incluyen fármacos anti-inflamatorios alternativos, sin embargo ninguno de ellos ha conseguido suplir los grandes niveles de corticorresistencia en EPOC bien porque la dosis está limitada por los efectos secundarios después de la administración oral o porque ha sido descrita una pérdida de eficacia (tolerancia) después de la administración prolongada [230].

El estrés oxidativo es uno de los principales mecanismos que conducen a la aparición de resistencia a esteroides en pacientes con EPOC. En los fumadores se produce a través de la reducción en la expresión de HDAC2, lo que podría sugerir que los antioxidantes también deberían revertir la resistencia a corticosteroides. Actualmente los antioxidantes disponibles son poco eficaces porque se inactivan por el estrés oxidativo [230].

Es necesario comprender los mecanismos moleculares mediante el cual los corticosteroides suprimen la inflamación para comprender los diversos mecanismos de resistencia a los esteroides en pacientes asmáticos y pacientes con EPOC. Otra de las estrategias posibles para combatirla, ya comentada previamente, sería mediante la regulación de ciertos genes que son inducibles por los glucocorticoides [230].

Por todo esto, el grupo de pacientes corticorresistentes suponen un nuevo reto. Es por tanto relevante identificar grupos de pacientes que por los datos clínicos y analíticos puedan ser dirigidos hacia un determinado tratamiento, así como encontrar nuevos fármacos y dianas terapéuticas que mejoren la evolución de la enfermedad y la calidad de vida de estos enfermos.

Dada la importancia de la inflamación durante el estadio inicial en La EPOC y el efecto "universal" antiinflamatorio de MUC1, junto con la importancia de la expresión en pulmón de MUC1 se ha generado un alto interés en los últimos tiempos.

Además evidencias recientes mostraron que los glucocorticoides incrementan la expresión de MUC1 *in vitro* [236] así como a nivel epitelial tras el tratamiento con corticosteroides orales durante dos semanas [237]. Sin embargo, la asociación entre la eficacia de corticosteroides orales y la expresión de MUC1 así como la posible interacción entre glucocorticoides, el receptor de glucocorticoides (GR) y MUC1 son todavía desconocidas. Esta cuestión crítica nos llevó a investigar la regulación de MUC1 expresión en las vías respiratorias, concretamente en EPOC.

La presente tesis doctoral tuvo como objetivo llamar la atención sobre la posible participación de mucinas en los mecanismos de corticosteroides en EPOC, centrándose especialmente en las mucinas ancladas a membrana, especialmente MUC1. Postulamos que la expresión de mucina

no es una consecuencia de las acciones de los corticosteroides, pero si puede contribuir a los mecanismos de corticosteroides, por lo tanto, debe considerarse como mediador potencial en la respuesta a los corticosteroides, en particular en EPOC.

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

- En primer lugar observamos que la expresión de MUC1 en tejido pulmonar, células epiteliales, neutrófilos y esputo de fumadores y pacientes con EPOC estaba disminuida en comparación con pacientes sanos. Esta falta de expresión de MUC1 se correlaciona con una disminución del efecto antiinflamatorio de la dexametasona en células epiteliales donde el gen MUC1 ha sido silenciado. Es decir, la disminución de expresión de MUC1-CT media la resistencia a corticosteroides tanto en células epiteliales como en neutrófilos humanos.
- Las células epiteliales de BEAS-2B siRNA-MUC1 mostraron una menor respuesta a la dexametasona en presencia de ligandos de TLR, por lo que MUC1 parece necesario para un correcto efecto de los corticoides.
- Además hemos visto que MUC1 favorece la activación de GRE (Elemento de Respuesta a Glucocorticoides) por parte de la dexametasona así como el aumento de genes antiinflamatorios, por lo que MUC1 media las propiedades antiinflamatorias de los corticosteroides y la falta de su expresión en la EPOC aumenta la resistencia.
- MUC1 forma un complejo con los receptores de Glucocorticoide facilitando su traslocación al núcleo y permite por tanto los efectos antiinflamatorios de la dexametasona. Una hiper-fosforilación de GR α inhibe su translocación al núcleo, por lo tanto la activación de ERK1/2 podría explicar la falta de efecto de los corticoides.

Se conocen propiedades de MUC1 en inflamación de las vías aéreas por estar relacionada con su capacidad para inhibir varios TLR [202], en particular a través MyD88 [204]. Esta inhibición evita diversas cascadas de señalización, que daría lugar a la transcripción de diferentes genes pro-inflamatorios. Además, como se describió anteriormente, MUC1 también se conoce por su capacidad para mediar en la translocación de varios factores de transcripción en el núcleo, donde éstos ejercen su función [208-210]. Sin embargo, hasta ahora, la posibilidad de una potencial interacción entre MUC1-CT y corticosteroides y sus receptores es desconocido.

En nuestra opinión, la relevancia de estudiar una potencial interacción entre mucinas, particularmente MUC1 y corticosteroides se debe a la posibilidad de proporcionar una

5. DISCUSIÓN

explicación mecanicista que contribuiría a entender por qué estos medicamentos no son capaces de reprimir la inflamación en este subgrupo particular de pacientes, que son los pacientes EPOC resistentes a corticoides caracterizados por exhibir una expresión reducida de MUC1.

Las exacerbaciones en la EPOC pueden ser consecuencia de una respuesta inflamatoria anormal a microorganismos o sus productos. La familia TLR juega un rol clave en el reconocimiento de patógenos y en la inducción y regulación de la respuesta inmune innata y adaptativa. De hecho estudios recientes sugieren que el proceso inflamatorio encontrado en EPOC se caracteriza por una activación excesiva de las vías de señalización de los TLR. TLR2 reconoce bacterias Gram positivas como *Staphylococcus aureus*, y TLR5 reconoce la Flagelina de bacterias flageladas como *Pseudomonas aeruginosa* (utilizada como estímulo en la presente tesis doctoral), ambas bacterias comunes en EPOC [240]. En este punto es interesante destacar que los efectos anti-inflamatorios de MUC1 se basan en la inhibición de múltiples TLR, principalmente mediante la interacción en el citoplasma entre MUC1-CT y moléculas de señalización de TLR.

En estudios previos en nuestro laboratorio observamos que pacientes con poliposis (al igual que los pacientes EPOC estudiados en esta tesis) que no respondieron a corticosteroides orales mostraron una menor expresión de MUC1-CT comparada con el tejido de pacientes sanos y fumadores. Una mayor expresión de TLR2 y TLR5 acompañada de una menor expresión de MUC1-CT podría conferir una mayor activación de la señalización de TLR y la consecuente respuesta inflamatoria excesiva. En este sentido, IL-8, un producto de la activación de la señalización de TLR y particularmente insensible a los efectos anti-inflamatorios de los corticosteroides [238] estaba significativamente aumentada en tejido pulmonar de pacientes EPOC respecto a los otros grupos. Una de las señales downstream activada por los TLR es la fosforilación de ERK1/2 [239]. De hecho, evidencias recientes sugieren que la resistencia a corticosteroides inducida por super-antígenos implica la hiperfosforilación de ERK1/2, que lleva a la fosforilación de GR α y la consecuente inhibición de la translocación al núcleo inducida por Dexametasona [240]. En este trabajo, el tejido pulmonar de pacientes no respondedores mostró un incremento significativo de la fosforilación de ERK1/2 comparado con los otros grupos. Del mismo modo, tenían un incremento significativo de la fosforilación en Ser226 del receptor de Glucocorticoides α comparado con los respondedores. Evidencias recientes muestran que la fosforilación de GR-Ser226 por p38 o JNK1 puede mediar la insensibilidad a corticosteroides en asmáticos a través de la inhibición de la translocación al núcleo de GR α [242]. Teniendo en cuenta estos resultados, la hiper-fosforilación de GRSer226 en pacientes

EPOC corticorresistente podría inhibir los efectos anti-inflamatorios de GR α a nivel transcripcional y post-transcripcional en la terapia con corticosteroides.

Además, MKP1, un inhibidor endógeno de la fosforilación de ERK1/2 inducida por corticosteroides que forma parte de la actividad anti-inflamatoria, estaba disminuido en pacientes EPOC no respondedores comparado con los otros grupos, lo que explicaría el incremento de la fosforilación de ERK1/2 y GR-Ser226 y la consecuente resistencia a corticosteroides. Otros marcadores se han relacionado con una baja respuesta a corticosteroides, como niveles elevados de IL-1 β , ICAM-1, factor nuclear (NF)- κ β y GR β , tras el tratamiento.

En el presente estudio se aportan nuevas evidencias sobre la implicación de MUC1 en la respuesta a corticosteroides en pacientes de EPOC. Los pacientes resistentes al efecto de los corticosteroides mostraron significativamente una menor expresión de MUC1, acompañada de una menor expresión de MKP1 y GR α así como el incremento en la fosforilación de ERK1/2. Experimentos mecanísticos revelaron una interacción entre MUC1-CT y GR α que podría proteger de la hiper-fosforilación de GR-Ser226 inducida por los agonistas de TLR, ayudando a GR α a translocarse al núcleo y de ese modo realizar sus efectos anti-inflamatorios. Estos resultados son relevantes para entender la pérdida de eficacia de los corticosteroides en pacientes EPOC.

Por otro lado, la expresión de MUC1 fue mayor y directamente correlacionada con la expresión de GR α en todos los grupos de pacientes estudiados, sugiriendo una posible interacción entre ambos. En este contexto, se conoce que los corticosteroides pueden incrementar la expresión de MUC1 in vitro y en tejido obtenido de pólipos de pacientes. Sin embargo, no había evidencia hasta la fecha de la importancia de esta observación en pacientes EPOC. Para resolver esta relación llevamos a cabo experimentos con silenciamiento de MUC1 por RNA de interferencia. Así pues, en células siRNA-MUC1, la Dexametasona mostró un menor efecto anti-inflamatorio al aumentar la secreción de IL-8 y GM-CSF tras la estimulación con agonistas de TLR2, TLR4 y TLR5 respecto al control siRNA(-).

En la misma línea y a diferencia de las células control, las células siRNA-MUC1 mostraron un aumento en la fosforilación de ERK1/2 en respuesta a TLR2, TLR4 y TLR5 que no fue inhibido por Dexametasona. Se obtuvieron resultados similares para la expresión de MKP1, de manera que en células silenciadas para MUC1 no se incrementó MKP1 tras la exposición a Dexametasona. Además las células siRNA-MUC1 tenían hiper-fosforilada GR-Ser226, reduciendo la translocación nuclear de GR α , lo que indicaría un rol protector de MUC1 en la fosforilación de GR α y apoyaría los resultados en tejidos pulmonar procedente de pacientes EPOC.

5. DISCUSIÓN

La interacción de MUC1-CT con transductores de señales y su translocación al núcleo y subsecuente respuesta biológica se cree debe estar regulada por interacciones proteína-proteína específicas, pero el mecanismo preciso que subyace no se conoce. De hecho, se ha demostrado que MUC1-CT puede interactuar con el receptor de estrógeno (ER) α , tras lo que se transloca al núcleo como un complejo de transcripción en respuesta a 17 β -estradiol [234]. Resultados similares se observaron para un complejo de transcripción β -catenina-MUC1-CT como modulador de la morfogénesis. Estas evidencias indican que MUC1-CT, al formar complejos de transcripción, podría tener un papel protector. En este contexto, el complejo MUC1-CT-ER α protege y estabiliza ER α atenuando su ubiquitinación y degradación [235]. Fenómenos similares se propusieron para el complejo de transcripción β -catenina-MUC1-CT y un rol protector ante la degradación de β -Catenina 47.

La exposición al humo de tabaco está asociada a enfermedades pulmonares como la EPOC. Uno de los mecanismos de corticorresistencia descritos anteriormente era desencadenado por el estrés oxidativo producido por el humo del tabaco por ello hemos querido estudiar in vivo la corticorresistencia en un modelo de Exposición al Humo del tabaco tanto in vitro como in vivo.

La aparición de modelos animales con el gen que codifica para Muc1 silenciado o “Knockout” (KO) ha permitido el estudio in vivo de la implicación de Muc1/MUC1 en procesos inflamatorios/infecciosos de las vías aéreas. Uno de los mecanismos estudiados para entender el papel potencial de MUC1 en las vías respiratorias fue induciendo infección con *Pseudomonas Aeruginosa* (Pa). Se utilizaron ratones Knockout para Muc1 y Wild Type. Ambos grupos fueron infectados con Pa y el grado de inflamación de los pulmones a las 4 horas era más alto en los KO Muc1 en comparación con sus controles Wild Type. Se midieron niveles de IL-8 y TNF- α así como el aumento del número de neutrófilos. Lo que indica que la ausencia de MUC1 facilita la inflamación de las vías aéreas [238]. Por lo tanto, estos resultados sugieren que MUC1 juega un papel antiinflamatorio de las vías respiratorias durante la infección todo lo contrario a lo que los estudios iniciales indicaban.

El modelo experimental de inducción de inflamación pulmonar aguda con LPS+EHT, es un modelo ampliamente estandarizado, avalado por numerosos trabajos científicos como el modelo óptimo de traslación de la enfermedad de afectación humana a un modelo animal [219,222]. El modelo murino pone de manifiesto las múltiples vías moleculares implicadas en los cambios fisiopatológicos pulmonares de manera consistente a lo que sucede en pacientes con EPOC. Estudios comparativos del modelo murino frente a pacientes que sufren la

enfermedad han permitido establecer la correlación de los procesos moleculares implicados en ambos grupos, y del mismo modo identificar las debilidades del mismo.

Hemos querido dar un paso más allá y corroborar in vivo los resultado in vitro obtenidos en un modelo murino experimental de inflamación pulmonar aguda inducida por LPS y EHT (Exposición al Humo del Tabaco), donde los animales KO para Muc1 no tienen efecto antiinflamatorio alguno con dexametasona.

En este trabajo proporcionamos una primera evidencia de la unión constitutiva de MUC-CT y GR α así como un rol protector para la fosforilación de GR-Ser226 y la translocación al núcleo de GR α . Además, la exposición a Dexametasona promueve la translocación nuclear del complejo de transcripción MUC1-CT-GR α para inducir sus efectos anti-inflamatorios. Estos resultados se observaron in vitro y en el modelo murino, sugiriendo que aquellos pacientes resistentes a corticosteroides orales expresan menos complejos MUC1-CT-GR α y por ello menos protección ante la desregulación/degradación y la fosforilación de GR-Ser226. Sin embargo, aunque los resultados de este estudio proporcionan una explicación a la menor eficacia de corticosteroides en pacientes EPOC corticorresistentes, hay todavía algunas cuestiones por resolver. Así, por ejemplo, no hemos estudiado por qué los residuos de serina, treonina o tirosina del fragmento CT de MUC1 están implicados en la unión de GR α y qué molécula es responsable de esa fosforilación, de modo que se necesitan más estudios.

En resumen, hemos demostrado un nuevo rol para MUC1-CT como modulador de los efectos anti-inflamatorios de los corticosteroides en pacientes EPOC. Cabe destacar que han sido estudiadas varias mucinas (MUCAC y MUC5B) en las vías aéreas principales de pacientes con EPOC pero el potencial papel de MUC1 en la patología como en la aparición de corticorresistencia estaba aún por demostrar. El presente trabajo ofrece la primera evidencia de interacción entre MUC1-CT y GR α , así como el posible papel protector que ejerce este complejo contra la fosforilación de Ser226-GR.

Nuestros resultados sugieren que una posible explicación de por qué los corticosteroides no pueden reducir la inflamación y se debe, en parte, a una deficiencia en la formación del complejo MUC1-CT-GR α .

Son necesarias futuras investigaciones para abordar mejor el papel de mucinas en los mecanismos de resistencia de corticosteroides en esta enfermedad con el fin de aumentar el conocimiento con respecto a la pérdida de eficacia de corticosteroides en pacientes EPOC. Comprender los mecanismos de resistencia a corticosteroides es fundamental para contribuir a aliviar y mejorar la situación de este subgrupo especialmente difícil y desafiante de los pacientes EPOC resistentes a la terapia antiinflamatoria.

5. DISCUSIÓN

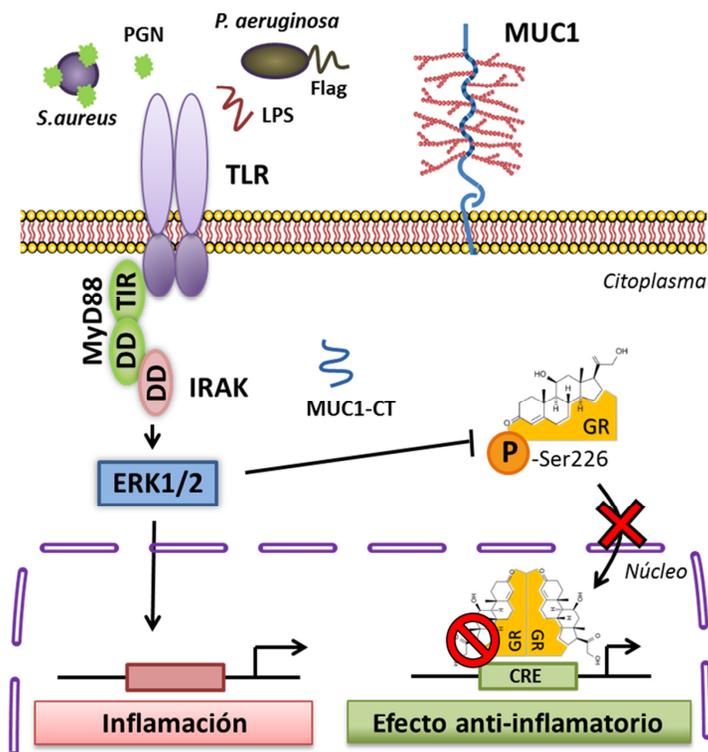


Figura 56 Esquema de los mecanismos propuestos. Unión constitutiva de MUC-CT y GR α así como un rol protector para la fosforilación de GR-Ser226 y la translocación al núcleo de GR α . Nuestros resultados sugieren que una posible explicación de por qué los corticosteroides no pueden reducir la inflamación y la consecuente corticorresistencia, se debe, en parte, a una deficiencia en la formación del complejo MUC1-CT-GR α .

Una vez demostrada la participación de MUC1 en la aparición de corticorresistencia y los mecanismos celulares que participan en la EPOC, así como en los aspectos clínicos y funcionales característicos como base preclínica y trasnacional de futuros tratamientos. Estimar la importancia de MUC1 en dicha eficacia podría ayudar a estratificar los pacientes respondedores y no respondedores a los corticosteroides orales permitiendo un mejor diagnóstico y tratamiento. Por todo esto consideramos que MUC1 puede servir como biomarcador de respuesta a los corticosteorides en pacientes EPOC

6. CONCLUSIONES

- (1) La expresión de MUC1 en tejido pulmonar, células epiteliales, neutrófilos y esputo de fumadores y pacientes con EPOC está disminuida.
- (2) La falta de expresión de MUC1 se correlaciona con una falta de efecto antiinflamatorio de la dexametasona en células epiteliales donde el gen MUC1 ha sido silenciado.
- (3) MUC1 favorece la activación de GRE (Elemento de Respuesta a Glucocorticoides) por parte de la dexametasona así como el aumento de genes antiinflamatorios.
- (4) MUC1 forma un complejo con los receptores de Glucocorticoide facilitando su traslocación al núcleo y permite por tanto los efectos antiinflamatorios de la dexametasona.
- (5) Estas observaciones fueron corroboradas in vivo en un modelo murino experimental de inflamación pulmonar aguda inducida por LPS y EHT (Exposición al Humo del Tabaco), donde los animales KO para Muc1 no tienen efecto antiinflamatorio alguno con dexametasona.
- (6) MUC1 puede servir como biomarcador de respuesta a los corticosteroides en pacientes EPOC.

7. BIBLIOGRAFÍA

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 2016.* [http://www.goldcopd.org/uploads/users/files/WatermarkedGlobal%20Strategy%20016\(1\).pdf](http://www.goldcopd.org/uploads/users/files/WatermarkedGlobal%20Strategy%20016(1).pdf) (Fecha de acceso: 20 de abril de 2016).
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.
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.

7. BIBLIOGRAFÍA

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.
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.

7. BIBLIOGRAFÍA

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. *BTS guidelines for the management of chronic obstructive pulmonary disease. The COPD Guidelines Group of the Standards of Care Committee of the BTS*. *Thorax*, 1997. **52 Suppl 5**: p. S1-28.
87. 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.
88. 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.
89. Rahman, I., *Oxidative stress in pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease: cellular and molecular mechanisms*. *Cell Biochem Biophys*, 2005. **43**(1): p. 167-88.
90. Barnes, P.J., *Chronic obstructive pulmonary disease*. *N Engl J Med*, 2000. **343**(4): p. 269-80.
91. 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.
92. 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.

93. Hogg, J.C., *Pathophysiology of airflow limitation in chronic obstructive pulmonary disease*. Lancet, 2004. **364**(9435): p. 709-21.
94. Rennard, S.I., *Chronic obstructive pulmonary disease: linking outcomes and pathobiology of disease modification*. Proc Am Thorac Soc, 2006. **3**(3): p. 276-80.
95. Barnes, P.J., *New therapies for chronic obstructive pulmonary disease*. Med Princ Pract, 2010. **19**(5): p. 330-8.
96. 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.
97. 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.
98. Disse, B., et al., *Tiotropium (Spiriva): mechanistical considerations and clinical profile in obstructive lung disease*. Life Sci, 1999. **64**(6-7): p. 457-64.
99. 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.
100. Spencer, S., et al., *Impact of preventing exacerbations on deterioration of health status in COPD*. Eur Respir J, 2004. **23**(5): p. 698-702.
101. *Daliresp. Full prescribing information, revised September 2011*. Forest Pharmaceuticals, St. Louis., 2011.
102. 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.
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. Tenor, H., ed. *Phosphodiesterase-4 inhibitors in the treatment of COPD*. Chronic Obstructive Pulmonary Disease, ed. R.S. Stockley RA, Rabe K, Celli B. Vol. 708. 2007, Blackwell Publishing: Oxford, England.
110. Field, S.K., *Roflumilast: an oral, once-daily selective PDE-4 inhibitor for the management of COPD and asthma*. Expert Opin Investig Drugs, 2008. **17**(5): p. 811-8.

7. BIBLIOGRAFÍA

111. Cortijo, J.C., Morcillo, E.J., *Perfil farmacológico del roflumilast*. Archivos de Bronconeumología, 2010. **46**(10): p. 19-24.
112. 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.
113. 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.
114. 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.
115. 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.
116. 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.
117. O'Donnell, D.E., *Hyperinflation, dyspnea, and exercise intolerance in chronic obstructive pulmonary disease*. Proc Am Thorac Soc, 2006. **3**(2): p. 180-4.
118. Racke, K., et al., *Pulmonary fibroblasts, an emerging target for anti-obstructive drugs*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2008. **378**(2): p. 193-201.
119. Burgel, P.R., et al., *Update on the roles of distal airways in COPD*. Eur Respir Rev, 2011. **20**(119): p. 7-22.
120. 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.
121. Voynow, J.A. and B.K. Rubin, *Mucins, mucus, and sputum*. Chest, 2009. **135**(2): p. 505-12.
122. Rogers, D.F., *Mucociliary dysfunction in COPD: effect of current pharmacotherapeutic options*. Pulm Pharmacol Ther, 2005. **18**(1): p. 1-8.
123. Burgel, P.R., *The role of small airways in obstructive airway diseases*. Eur Respir Rev, 2011. **20**(119): p. 23-33.
124. 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.
125. Gosens, R., et al., *Muscarinic receptor signaling in the pathophysiology of asthma and COPD*. Respir Res, 2006. **7**: p. 73.
126. Matsuba, K., et al., *Small airways disease in patients without chronic air-flow limitation*. Am Rev Respir Dis, 1987. **136**(5): p. 1106-11.
127. Burgel, P.R., et al., *Update on the roles of distal airways in asthma*. Eur Respir Rev, 2009. **18**(112): p. 80-95.
128. Scotton, C.J. and R.C. Chambers, *Molecular targets in pulmonary fibrosis: the myofibroblast in focus*. Chest, 2007. **132**(4): p. 1311-21.
129. 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.

130. Phan, S.H., *The myofibroblast in pulmonary fibrosis*. Chest, 2002. **122**(6 Suppl): p. 286S-289S.
131. 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.
132. Salazar, L.M. and A.M. Herrera, *Fibrotic response of tissue remodeling in COPD*. Lung, 2011. **189**(2): p. 101-9.
133. 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.
134. Vestbo J, TORCH Study Group. *The TORCH (TOWards a Revolution in COPD Health) survival study protocol*. Eur Respir J 2004 **24**: p. 206–10).
135. A. serra, M. roganovich, lf. l. rizzo, *Glucocorticoides: paradigma de medicina traslacional de lo molecular al uso clinico*. ISSN 0025-7680 2012 **72** (2) :p. 158-170
136. Buckingham JC. *Glucocorticoids: exemplars of multi-tasking*. Br J Pharmacol 2006; **147**(S1): p. S258-68.
137. Serra HA, Antúnez PB, Devoto FM, Tessler J., Zieher LM, Alvano SA, Iannantuono R, Serra HA, eds. *Colección de farmacología: farmacología del dolor y la inflamación, 2da ed. Buenos Aires*. Editorial Ursino, 1998, p: 61-74
138. Rosen J, Miner JN. *The search for safer glucocorticoid receptor ligands*. Endocr Rev 2005; **26**:p 452-64
139. Pratt WB, Toft DO. *Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones*. Endocr Rev 1997; **18**:p 306-60.
140. McMaster A, Ray DW. *Modelling the glucocorticoid receptor and producing therapeutic agents with anti-inflammatory effects but reduced side effects*. Exp Physiol 2007; **92**: p 299-309
141. Pascual-Le Tallec L, Lombès M. *The mineralocorticoid receptor: a journey exploring its diversity and specificity of action*. Mol Endocrinol 2005; **19**: p 2211-21.
142. Gronemeyer H, Gustafsson JA, Laudet V. *Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily*. Nat Rev Drug Discov 2004 **3**: p 950-64.
143. Wang J-C, Derynck MK, Nonaka DF, et al. *Chromatin immunoprecipitation (ChIP) scanning identifies primary glucocorticoid receptor target genes*. Proc Nat Acad Sci 2004 **101**: p 15603-8
144. Hiragun T, Peng Z, Beaven MA. *Cutting edge: dexamethasone negatively regulates Syk in mast cells by up-regulation Src-like adaptor protein*. J Immunol 2006 **177**: p 2047-50.
145. Lewis-Tuffin LJ, Jewell CM, Bienstock RJ, et al. *Human glucocorticoid receptor b binds RU-486 and is transcriptionally active*. Mol Cell Biol 2007 **27**: p 2266-82.
146. Oishi K, Amagai N, Shirai H, et al. *Genome-wide expression analysis reveals 100 adrenal gland-dependent circadian genes in the mouse liver*. DNA Res 2005 **12**: p 191-202.
147. De Bosscher K, Vanden Berghe W, Beck IME, et al. *A fully dissociated compound of plant origin for inflammatory gene repression*. Proc Nat Acad Sci 2005 **102**: p 15827-32.
148. D'Hulst C, Atack JR, Kooy RF. *The complexity of the GABAA receptor shapes unique pharmacological profiles*. Drug Discov Today 2009 **14**: p 866-75.

7. BIBLIOGRAFÍA

149. Tashkin DP, Celli B, Senn S, et al. *A 4-year trial of tiotropium in chronic obstructive pulmonary disease*. N Engl J Med. 2008 **359**: p 1543-54.
150. Gholamnezhad Z, Boskabady MH, Khazdair MR, Hosseini M, Abbasnejad M. *Effect of fluticasone and salmeterol on tracheal responsiveness to ovalbumin and lung inflammation, administrated during and after sensitization*. ScientificWorldJournal. 2014 **86**(52): p.92
151. Manetsch M, Rahman MM, Patel BS, Ramsay EE, Rumzhum NN, Alkhouri H, Ge Q, Ammit AJ. *Long-acting β_2 -agonists increase fluticasone propionate-induced mitogen-activated protein kinase phosphatase 1 (MKP-1) in airway smooth muscle cells*. PLoS One. 2013 **8**(3).
152. Clearie KL, Williamson PA, Vaidyanathan S, Du Bois J, Nell H, Lipworth BJ. *Systemic bioavailability of hydrofluoroalkane (HFA) formulations of fluticasone/salmeterol in healthy volunteers via pMDI alone and spacer*. Br J Clin Pharmacol. 2010 **69**(6): p. 637-44.
153. Sin DD, Wu L, Anderson JA, Anthonisen NR, Buist AS, Burge PS, et al. *Inhaled corticosteroids and mortality in chronic obstructive pulmonary disease*. Thorax 2005; **60**: p 992-7
154. Vestbo J, Sorensen T, Lange P, Brix A, Torre P, Viskum K. *Longterm effect of inhaled budesonide in mild and moderate chronic obstructive pulmonary disease: a randomised controlled trial*. Lancet 1999 **353**: p. 1819-23.
155. Pauwels RA, Lofdahl CG, Laitinen LA, et al. *Long-term treatment with inhaled budesonide in persons with mild chronic obstructive pulmonary disease who continue smoking*. N Engl J Med 1999 **340**: p. 1948-53.
156. Burge PS, Calverley PMA, Jones PW, Spencer S, Anderson JA, Malsen T. *Randomised, double-blind, placebo-controlled study of fluticasone propionate in patients with moderate to severe chronic obstructive pulmonary disease; the ISOLDE trial*. Br Med J 2000 **320**: p. 1297-303.
157. Lung Health Study Research Group. *Effect of inhaled triamcinolone on the decline in pulmonary function in chronic obstructive pulmonary disease*. N Engl J Med 2000 **343**: p. 1902-9
158. Culpitt SV, Rogers DF, Shah P, et al. *Impaired inhibition by dexamethasone of cytokine release by alveolar macrophages from patients with chronic obstructive pulmonary disease*. Am J Respir Crit Care Med 2003 **167**: p. 24-31.
159. Ito K, Barnes PJ, Adcock IM. *Glucocorticoid receptor recruitment of histone deacetylase 2 inhibits IL-1 β -induced histone H4 acetylation on lysines 8 and 12*. Mol Cell Biol 2000; **20**: p. 6891-903.
160. N. Roche, R. Marthan, P. Berger, A. Chambellan, P. Chanez, B. Aguilaniu, P-Y. Brillet, R. Burgel, A. Chaouat, P. Devillier, R. Escamilla, R. Louis, H. Mal, J-F. Muir, T. Perez, T. Similowski, B. Wallaert and M. *REVIEW: Beyond corticosteroids: future prospects in the management of inflammation in COPD*. Eur Respir Rev 2011; **20**(121): p. 175–182
161. MacNee W. *Pulmonary and systemic oxidant/antioxidant imbalance in chronic obstructive pulmonary disease*. Proc Am Thorac Soc 2005 **2**: p 50–60.
162. Stevenson CS, Koch LG, Britton SL. *Aerobic capacity, oxidant stress, and chronic obstructive pulmonary disease a new take on an old hypothesis*. Pharmacol Ther 2006; **110**: p. 71–82.
163. Ito K, Barnes PJ. *COPD as a disease of accelerated lung aging*. Chest 2009 **135**: p. 173–180.

164. S. H. Korn, F. Thunnissen, G. J. Wesseling, W. Arends and M. Wouters. *Glucocorticoid receptor Mrna levels in bronchial epithelial cells of patients with COPD: Influence of glucocorticoids*. Respiratory Medicine 1998 **92**: p. 1102-1109.
165. Hollenberg SM, Weinberger C, Ong ES et al. *Primary. Structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA*. Nature 1985 **318**: p. 635-641.
166. Bamberger CM, Bamberger AM, de Castro M, Chrousos GP. *Glucocorticoid receptor beta, a potential endogenous inhibitor of glucocorticoid action in humans*. J Clin Invest 1995 **95**: p. 2435-2441.
167. Oakley RH, Sar M, Cidlowski JA. *The human glucocorticoid receptor beta isoform: Expression, biochemical properties, and putative function*. J Biol Chem 1996 **80**: p. 9550-9559.
168. Jeffrey C. Webster, Robert H. Oakley, Christine M. Jewell, and John A. Cidlowski. *Proinflammatory cytokines regulate human glucocorticoid receptor gene expression and lead to the accumulation of the dominant negative b isoform: A mechanism for the generation of glucocorticoid resistance*. Proc Natl Acad Sci .2001 **98**(12): p.6865-70.
169. Marin, F.; Corstjens, P.; De Gaulejac, B.; De Vrind-De Jong, E.; Westbroek, P. *Mucins and molluscan calcification. Molecular characterization of mucoperlin, a novel mucin-like protein from the nacreous shell layer of the fan mussel Pinna nobilis (Bivalvia, pteriomorpha)*.The Journal of Biological Chemistry 2000 **275**(27): p. 20667-0675.
170. Boskey, A. *Biom mineralization: an Overview*. Connective Tissue Research 2003 **44**(1): p. 5-9
171. RJ Midura, VC Hascall. *MUC1 and colorectal cancer pathophysiology considerations*.World J. Gastroenterol. **14**(14): p. 2139-41.
172. Perez-Vilar, J; Hill, RL. *Mucin Family of Glycoproteins*. Encyclopedia of Biological Chemistry (Lennarz & Lane, EDs.)(Oxford: Academic Press/Elsevier) 2004 **2**: p. 758-764.
173. Li, Y; Martin, LD; Spizz, G; Adler, KB. *MARCKS protein is a key molecule regulating mucin secretion by human airway epithelial cells in vitro*. J Biol Chem 2001 **276**(44): p. 40982-90.
174. Rogers, DF. *Physiology of airway mucus secretion and pathophysiology of hypersecretion*. Respir Care. 2007 **52** (9):p. 1134-1146.
175. Perez-Vilar, J. *Mucin granule intraluminal organization*. Am J Respir Cell Mol Biol 2008 **36** (2): p. 183-190.
176. Singh, AP, Moniaux, N, Chauhan, SC, Meza, JL, Batra, SK. *Inhibition of MUC4 expression suppresses pancreatic tumor cell growth and metastasis*. Cancer Research **64** (2): p.622-30.
177. Singh, Ajay P., Chauhan, Subhash C., Bafna, Sangeeta, Johansson, Sonny L., Smith, Lynette M., Moniaux, Nicolas, Lin, Ming-Fong, Batra, Surinder K. *Aberrant expression of transmembrane mucins, MUC1 and MUC4, in human prostate carcinomas*. The Prostate 2006 **66** (4): p. 421-429.
178. Singh, A. P., Chaturvedi, P., Batra, S. *Emerging Roles of MUC4 in Cancer: A Novel Target for Diagnosis and Therapy*. Cancer Research 2007 **67**(2): p. 433-436.
179. Kwang Chul Kim. *Role of epithelial mucins during airway infection*. Pulmonary Pharmacology & Therapeutics 2012 **25**(6): p. 415-419.

7. BIBLIOGRAFÍA

180. Thornton DJ, Rousseau K, McGuckin MA. *Structure and function of the polymeric mucins in airways mucus*. *Annu Rev Physiol* 2008 **70**: p. 459-86.
181. Rose MC, Voynow JA. *Respiratory tract mucin genes and mucin glycoproteins in health and disease*. *Physiol Rev* 2006 **86**: p. 245-78.
182. Itoh Y, Kamata-Sakurai M, Denda-Nagai K, Nagai S, Tsuiji M, Ishii-Schrade K et al. *Identification and expression of human epiglycanin/MUC21: a novel transmembrane mucin*. *Glycobiology* 2008 **18**(74): p. 83.
183. Simon GC, Martin RJ, Smith S, Thaikootathil J, Bowler RP, Barenkamp SJ, et al. *Up-regulation of MUC18 in airway epithelial cells by IL-13: implications in bacterial adherence*. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2011 **44** (606): p.13.
184. Jacquot J, Hayem A, Galabert C. *Functions of proteins and lipids in airway secretions*. *Eur Respir J* 1992 **5** (343): p. 58
185. Takishima T, Shimura S. *Airway secretion: physiological bases for the control of mucus hypersecretion*. *Lung Biology and Health* 1993 **72**(433): p. 49.
186. Ali M, Lillehoj EP, Park Y, Kyo Y, Kim KC. *Analysis of the proteome of human airway epithelial secretions*. *Proteome Sci* 2011 **9**: p.4
187. Evans CM, Kim K, Tuvim MJ, Dickey BF. *Mucus hypersecretion in asthma: causes and effects*. *Curr Opin Pulm Med* 2009 **15**: p. 4-11.
188. Roy MG, Rahmani M, Hernandez JR, Alexander SN, Ehre C, Ho SB, et al. *Mucin production during pre- and post-natal mouse lung development*. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2011.
188. Ordonez CL, Khashayar R, Wong HH, Ferrando R, Wu R, Hyde DM, et al. *Mild and moderate asthma is associated with airway goblet cell hyperplasia and abnormalities in mucin gene expression*. *Am J Respir Crit Care Med* 2001 **163**: p.517-23.
189. Hallstrand TS, Debley JS, Farin FM, Henderson Jr WR. *Role of MUC5AC in the pathogenesis of exercise-induced bronchoconstriction*. *J Allergy Clin Immunol* 2007 **119**: p. 1092-8.
190. Kirkham S, Kolsum U, Rousseau K, Singh D, Vestbo J, Thornton DJ. *MUC5B is the major mucin in the gel phase of sputum in chronic obstructive pulmonary disease*. *Am J Respir Crit Care Med* 2008 **178**: p.1033-9.
191. Gendler SJ, Lancaster CA, Taylor-Papadimitriou J, Duhig T, Peat N, Burchell J, et al. *Molecular cloning and expression of human tumor-associated polymorphic epithelial mucin*. *J Biol Chem* 1990 **265**: p.15286-93.
192. Lan MS, Batra SK, Metzgar RS, Hollingsworth MA. *Cloning and sequencing of a human pancreatic tumor mucin cDNA*. *J Biol Chem* 1990 **265**: p. 15294-9.
193. Lu W, Hisatsune A, Koga T, Kato K, Kuwahara I, Lillehoj EP, et al. *Cutting edge: enhanced pulmonary clearance of *Pseudomonas aeruginosa* by *Muc1* knockout mice*. *J Immunol* 2006 **176**: p. 3890-4
194. Zhang Z, Louboutin JP, Weiner DJ, Goldberg JB, Wilson JM. *Human airway epithelial cells sense *Pseudomonas aeruginosa* infection via recognition of flagellin by Toll-like receptor 5*. *Infect Immun* 2005 **73**: p. 7151-60.

195. Kato K, Lu W, Kai H, Kim KC. *Phosphoinositide 3-kinase is activated by MUC1 but not responsible for MUC1-induced suppression of Toll-like receptor 5 signaling*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2007 **293**: p.686-92.
196. Ueno K, Koga T, Kato K, Golenbock DT, Gendler SJ, Kai H, et al. *MUC1 mucin is a negative regulator of toll-like receptor signaling*. Am J Respir Cell Mol Biol 2008 **38**:263-8.
197. A.I. D'hulst, K. B. Role of tumour necrosis factor- α receptor. Eur Respir J 2006 **28**: p. 102-112
198. Achraf Al Faraj, A. S. *Preferential Macrophage Recruitment and Polarization in and Polarization in LPS-Induced Animal Model for COPD: Noninvasive Tracking Using MRI*. Plos One 2014 **9**(3):p.90829.
199. Franquet, T. (2011). *Diagnóstico por Imagen de la EPOC*. Neumología y Salud S.L.
200. Jurgen Schymeinsky, H. M. *The Absence of Mrp4 Has No Effect on the Recruitment of Neutrophils and Eosinophils into the Lung after LPS, Cigarette Smoke or Allergen Challenge*. Plos One 2013 **8**(4): p.61193.
201. Lei Wang, J. Y. (2011). *Use of a Soluble Epoxide Hydrolase Inhibitor in Smoke-Induced Chronic*. Am J Respir Cell Mol Biol.2012 **46**(5): p.614-22 .
202. Maiké Leberl, A. K.-S. (2013). *Tobacco smoke induced COPD/emphysema in the animal model are we all on the same page?* Frontiers in Physiology 2013 **15**(4): p. 91.
203. Sopena C. Martínez. *Manual PET TAC para residentes*. (2015)
204. Peiró T, M. J. (2014). *Mucin Expression and Corticosteroid Efficacy in Chronic Rhinosinusitis*. Steroids & Hormonal Science 2013 **15** (4): p.91
205. Birru RL, Di YP. *Pathogenic mechanism of second hand smoke induced inflammation and COPD*. Front Physiol 2012 **3**:p. 348.
206. Nichol KL, Margolis KL, Wuorenma J, Von Sternberg T. *The efficacy and cost effectiveness of vaccination against influenza among elderly persons living in the community*. N Engl J Med 1994 **331**(12): p. 778-784.
207. Wongsurakiat P, Lertakyamanee J, Maranetra KN, Jongriratanakul S, Sangkaew S. *Economic evaluation of influenza vaccination in Thai chronic obstructive pulmonary disease patients*. J Med Assoc Thai 2003 **86**(6): p. 497-508.
208. Edwards KM, Dupont WD, Westrich MK, Plummer WD, Jr., Palmer PS, Wright PF. *A randomized controlled trial of cold-adapted and inactivated vaccines for the prevention of influenza A disease*. J Infect Dis 1994 **169**(1): p. 68-76.
209. Alfageme I, Vazquez R, Reyes N, Munoz J, Fernandez A, Hernandez M, Merino M, Perez J, Lima J. *Clinical efficacy of anti-pneumococcal vaccination in patients with COPD*. Thorax 2006 **61**(3): p. 189-195.
210. Schembri S, Morant S, Winter JH, MacDonald TM. *Influenza but not pneumococcal vaccination protects against all-cause mortality in patients with COPD*. Thorax 2009 **64**(7): p. 567-572.
211. Vidal R, Blanco I, Casas F, Jardi R, Miravittles M. *Guidelines for the diagnosis and management of alpha-1 antitrypsin deficiency*. Arch Bronconeumol 2006 **42**(12): p. 645-659.

7. BIBLIOGRAFÍA

212. Johnston RN, McNeill RS, Smith DH, Dempster MB, Nairn JR, Purvis MS, Watson JM, Ward FG. *Five-year winter chemoprophylaxis for chronic bronchitis*. Br Med J 1969 **4**(5678): p. 265-269.
213. Allegra L, Cordaro CI, Grassi C. *Prevention of acute exacerbations of chronic obstructive bronchitis with carbocysteine lysine salt monohydrate: a multicenter, double-blind, placebo-controlled trial*. Respiration 1996; **63**(3): p. 174-180.
214. Guyatt GH, Townsend M, Kazim F, Newhouse MT. *A controlled trial of ambroxol in chronic bronchitis*. Chest 1987; **92**(4): p. 618-620.
215. Siafakas NM, Vermeire P, Pride NB, Paoletti P, Gibson J, Howard P, Yernault JC, Decramer M, Higenbottam T, Postma DS, et al. *Optimal assessment and management of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). The European Respiratory Society Task Force*. Eur Respir J 1995 **8**(8): p. 1398-1420.
216. Hansen NC, Skriver A, Brorsen-Riis L, Balslov S, Evald T, Maltbaek N, Gunnensen G, Garsdal P, Sander P, Pedersen JZ, et al. *Orally administered N-acetylcysteine may improve general well-being in patients with mild chronic bronchitis*. Respir Med 1994 **88**(7): p. 531-535.
217. Irwin RS, Boulet LP, Cloutier MM, Fuller R, Gold PM, Hoffstein V, Ing AJ, McCool FD, O'Byrne P, Poe RH, Prakash UB, Pratter MR, Rubin BK. *Managing cough as a defense mechanism and as a symptom*. A consensus panel report of the American College of Chest Physicians. Chest 1998 **114**(2 Suppl Managing): p. 133S-181S.
218. L. Wollin, M.P. Pieper. *Tiotropium bromide exerts anti-inflammatory activity in a cigarette smoke mouse model of COPD*. Pulmonary Pharmacology & Therapeutics 23 (2010) 345-354.
219. Ortiz, J.L., et al., *Direct effect of cigarette smoke on human pulmonary artery tension*. Pulm Pharmacol Ther, 2010. **23**(3): p. 222-8.
220. Cortijo, J., et al., *Aclidinium inhibits cholinergic and tobacco smoke-induced MUC5AC in human airways*. Eur Respir J, 2011. **37**(2): p. 244-54.
221. Reynolds JS, Johnson VJ, Frazer DG. *Unrestrained acoustic plethysmograph for measuring specific airway resistance in mice*. J Appl Physiol (1985). 2008 Aug; **105**(2):711-7.
222. Vanoirbeek JA, Rinaldi M, De Vooght V, Haenen S, Bobic S, Gayan-Ramirez G, Hoet PH, Verbeken E, Decramer M, Nemery B, Janssens W. *Noninvasive and invasive pulmonary function in mouse models of obstructive and restrictive respiratory diseases*. Am J Respir Cell Mol Biol. 2010 Jan; **42**(1): p.96-104.
223. Einecke D. *Dual bronchodilators becomes the first choice combination*. MMW Fortschr Med. 2016 Jun 9; **158**(11):18.
224. Reza Maleki-Yazdi M, Molimard M, Keininger DL, Gruenberger JB, Carrasco J, Pitotti C, Sauvage E, Chehab S, Price D. *Cost Effectiveness of the Long-Acting β 2-Adrenergic Agonist (LABA)/Long-Acting Muscarinic Antagonist Dual Bronchodilator Indacaterol/Glycopyrronium Versus the LABA/Inhaled Corticosteroid Combination Salmeterol/Fluticasone in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease: Analyses Conducted for Canada, France, Italy, and Portugal*. Appl Health Econ Health Policy. 2016 Oct; **14**(5): p.579-94.
225. Ferguson GT, Ghafouri M, Dai L, Dunn LJ. *COPD patient satisfaction with ipratropium bromide/albuterol delivered via Respimat: a randomized, controlled study*. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis. 2013; **8**: p.139-50.

226. Sofie Vandevyver, Lien Dejager, Claude. *On the Trail of the Glucocorticoid Receptor: Into the Nucleus and Back*. Traffic 2012; **13**: p.364–374
227. Song H, Tao L, Chen C, Pan L, Hao J, Ni Y, Li D, Li B, Shi G. *USP17-mediated deubiquitination and stabilization of HDAC2 in cigarette smoke extract-induced inflammation*. Int J Clin Exp Pathol. 2015 Sep 1; **8**(9): p.10707-15.
228. Randall MJ, Haenen GR, Bouwman FG, van der Vliet A, Bast A. The tobacco smoke component acrolein induces glucocorticoid resistant gene expression via inhibition of histone deacetylase. Toxicol Lett. 2016 Jan 5; **240**(1): p.43-9
229. Milara J, Lluch J, Almudever P, Freire J, Xiaozhong Q, Cortijo J. Roflumilast N-oxide reverses corticosteroid resistance in neutrophils from patients with chronic obstructive pulmonary disease. J Allergy Clin Immunol. 2014 Aug; **134**(2): p.314-22.
230. Peter J. Barnes. Corticosteroid resistance in patients with asthma and chronic obstructive pulmonary disease. J Allergy Clin Immunol 2013;131, p. 636-45.
231. Thunicia Moodley, Sylvia M. Wilson, Taruna Joshi, Christopher F. Rider, Pawan Sharma, Dong Yan, Robert Newton, and Mark A. Giembycz. *Phosphodiesterase 4 Inhibitors Augment the Ability of Formoterol to Enhance Glucocorticoid-Dependent Gene Transcription in Human Airway Epithelial Cells: A Novel Mechanism for the Clinical Efficacy of Roflumilast in Severe Chronic Obstructive Pulmonary Disease*. Mol Pharmacol 2013; **83**: p.894–906.
232. Mortaz, E, Rad, MV, Johnson, M, Raats, D, Nijkamp, FP, Folkerts, G *Salmeterol with fluticasone enhances the suppression of IL-8 release and increases the translocation of glucocorticoid receptor by human neutrophils stimulated with cigarette smoke*. J Mol Med 2008; **86**(9): p.1045-1056.
233. Meja, KK, Rajendrasozhan, S, Adenuga, D, Biswas, SK, Sundar, IK, Spooner, G, Marwick, JA, Chakravarty, P, Fletcher, D, Whittaker, P, Megson, IL, Kirkham, PA, Rahman. *Curcumin restores corticosteroid function in monocytes exposed to oxidants by maintaining HDAC2*. Am J Respir Cell Mol Biol 2008; **39**(3): p. 312-323.
234. Gil JF, Augustine TN, Hosie MJ. *Anastrozole and RU486: Effects on estrogen receptor α and Mucin 1 expression and correlation in the MCF-7 breast cancer cell line*. Acta Histochem. 2013 Oct; **115**(8): p. 851-7.
235. Tréhoux S, Duchêne B, Jonckheere N, Van Seuning I. *The MUC1 oncomucin regulates pancreatic cancer cell biological properties and chemoresistance. Implication of p42-44 MAPK, Akt, Bcl-2 and MMP13 pathways*. Biochem Biophys Res Commun. 2015 Jan 16; **456**(3): p.757-62.
236. Seo KY, Chung SH, Lee JH, Park MY, Kim EK. *Regulation of membrane-associated mucins in the human corneal epithelial cells by dexamethasone*. Cornea 2007; **26**: p.709-14.
237. Martinez-Anton A, de Bolos C, Alobid I, Benitez P, Roca-Ferrer J, Picado C, et al. *Corticosteroid therapy increases membrane-tethered while decreases secreted mucin expression in nasal polyps*. Allergy 2008; **63**: p.1368-76.
238. Budulac SE1, Postma DS, Hiemstra PS, Lapperre TS, Kunz LI, Vonk JM, Marike Boezen H, Timens W; Glucold Study Group. *Multidrug resistance-associated protein 1 and lung function decline with or without long-term corticosteroids treatment in COPD*. Eur J Pharmacol. 2012 Dec 5; **696**(1-3):136-42.

7. BIBLIOGRAFÍA

239. Barnes PJ. *Mechanisms and resistance in glucocorticoid control of inflammation*. J Steroid Biochem Mol Biol 2010; 120: p. 76-85.
240. Anwar MA, Basith S, Choi S. *Negative regulatory approaches to the attenuation of Toll-like receptor signaling*. Exp Mol Med 2013; p. 45:e11.
241. Li LB, Goleva E, Hall CF, Ou LS, Leung DY. *Superantigen-induced corticosteroid resistance of human T cells occurs through activation of the mitogen-activated protein kinase kinase/extracellular signal-regulated kinase (MEK-ERK) pathway*. J Allergy Clin Immunol 2004; 114: p. 1059-69.
242. Mercado N, Hakim A, Kobayashi Y, Meah S, Usmani OS, Chung KF, et al. *Restoration of corticosteroid sensitivity by p38 mitogen activated protein kinase inhibition in peripheral blood mononuclear cells from severe asthma*. PLoS One 2012; p. 7:e41582.

8. ÍNDICE DE ABREVIATURAS

8.ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxiribonucleico.
ADNc	Ácido desoxiribonucleico complementario.
AMPc	Monofosfato de adenosina ciclico.
ARN	Ácido ribonucleico.
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero.
AP-1	activador de la proteina-1
A549	Línea de células epiteliales alveolares tipo II.
BB1	<i>CeLyA Blocking Buffer.</i>
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.
CAB1	<i>CeLyA Assay Buffer.</i>
CD200	Clúster de diferenciación 200.
CEBH	Células epiteliales bronquiales humanas.
CEIC	Comité Ético de Investigaciones Clínicas.
CHGUV	Consortio Hospital General Universitario de Valencia.
CLB1	<i>CeLyA Lysis Buffer.</i>
CO ₂	Dióxido de carbono.
COLI	Colágeno tipo I.
CRISPLD2	Proteína secretora rica en cisteína LCCL (coagulación de Limulus factor de C, Cochlin, Lgl1) que contiene el dominio 2
Ct	Ciclo umbral.
CTGF	Factor de crecimiento de tejido conectivo.
CVF	Capacidad vital forzada.
dbcAMP	Dibutiril adenosín monofosfato ciclico.
DCF	2',7'-diclorofluoresceína.
DMSO	Dimetilsulfóxido.
EFG	Factor de crecimiento epidérmico.
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico.

EHT	Extracto de humo de tabaco/Exposición al Humo del Tabaco.
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas.
EPOC	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica.
ERK1/2	Quinasa regulada por señal extracelular.
FDA	Food and Drug Administration.
FDG	Fluorodesoxiglucosa
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	Global Burden of Disease Study.
GC	Glucocorticoide
GILZ(TSC22D3)	Cremallera de leucina que codifica un gen miembro de la familia de dominio 3
GOLD	Iniciativa Global para la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (<i>Global Obstructive Lung Disease</i>)
GR	Glucocorticoide Receptor
GRE	Elemento de Respuesta de Glucocorticoides
GTPasa	Guanosina trifosfatasa.
HDAC	histona deacetilasa
H ₂ DCF-DA	2',7'-diclorodihidrofluorescein diacetato.
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno.
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazino etanosulfónico.
HRP	Peroxidasa de rábano.
IGF	Factor de crecimiento insulínico.
IL-8	Interleuquina-8.
IL-13	Interleuquina-13.
iPDE4	Inhibidor de fosfodiesterasa 4.
IPF	Fibrosis pulmonar idiopática.
JNK	Quinasa c - Jun N –terminal.

8.ÍNDICE DE ABREVIATURAS

LBD	Dominio de Unión del Ligando
LDH	Lactato dehidrogenasa.
LPS	Lipopolisacárido.
LTB ₄	Leucotrieno B ₄ .
M	Molar (mol/litro).
MAPK	Protein quinasas activadas por mitógenos.
MIF	Factor Inhibidor de la Migración de Macrófagos
MKP1	Mitogen-activated protein kinase phosphatase 1
MMP-9	Metaloproteinasa de matriz 9.
MMP-12	Metaloproteinasa de matriz 12.
MR	Receptor Mineralocorticoide
NAC	N-acetil-L-cisteína.
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato.
NaOH	Hidróxido sódico.
NF- κ β	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas.
NHLBI	<i>National Heart, Lung and Blood Institute</i>
NOX4	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa 4.
NPC	Complejo de Poro Nuclear
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	Tomografía por Emisión de Positrones.
PDE	Fosfodiesterasa.
PI3K	Fosfatidil inositol 3-quinasa.
PLATINO	Proyecto Latinoamericano de Investigación en Obstrucción Pulmonar.
ROI	Region of Interest
RSG2	Gen factor de crecimiento transformante β –estimulado.
RT	Retrotranscripción inversa.

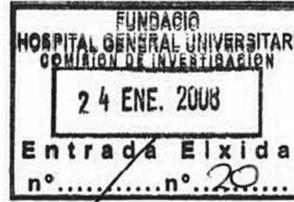
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real.
SDS	Dodecilsulfato sódico.
TC	Tomografía Computarizada.
TGF- β 1	Factor de crecimiento transformante β 1.
TNF- α	Factor α de necrosis tumoral.
TLR	Toll like receptor.
TRITC	Isotiocianato de tetrametil rodamina.
UFR	Unidades de fluorescencia relativa.
UIP	Neumonía intersticial usual.
VEF ₁	Volumen espiratorio forzado en el primer segundo.
VOI	Volume of Interest

9. ANEXO

9.1 DICTÁMENES: COMISIÓN DE INVESTIGACIÓN Y COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA 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



Consorcio Hospital General Universitario de Valencia

Comité Ético de Investigación Clínica

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 HGUUV

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 Iranzo	
	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. Elías Ruiz	
	Dr. Alberto Berenguer	
	Dra. Amparo Perez	X
	Dña. Encarna Domingo	X
Secretario	Dra. Ana Minguez	X

Lo que comunico a efectos oportunos:

Fdo. Dra. Ana Minguez (Secretaria
CEIC)

