



VNIVERSITAT
D VALÈNCIA

Departamento de Farmacología

Programa de doctorado: Biomedicina y Farmacia

**ESTUDIO FARMACOLÓGICO DE LA ACCIÓN DE
UN ANTIMUSCARÍNICO DE LARGA DURACIÓN (LAMA)
EN LA ACTIVACIÓN DE FIBROBLASTOS
PULMONARES HUMANOS**

TESIS DOCTORAL presentada por:

Adela Serrano Gimeno

Dirigida por:

Dr. Julio Cortijo Gimeno

Dr. Javier Milara Payá

Valencia, 2013



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

Certifica:

Que la Tesis Doctoral presentada por Dña. Adela Serrano Gimeno, con el título **"ESTUDIO FARMACOLÓGICO DE LA ACCIÓN DE UN ANTIMUSCARÍNICO DE LARGA DURACIÓN (LAMA) EN LA ACTIVACIÓN DE FIBROBLASTOS PULMONARES HUMANOS"**, ha sido realizada bajo su dirección, y reúne los requisitos necesarios para su juicio y calificación

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

En Valencia, Enero de 2013.

Dr. Julio Cortijo Gimeno



FUNDACIÓ
INVESTIGACIÓ
HOSPITAL GENERAL
UNIVERSITARI
VALÈNCIA

DR. JAVIER MILARA PAYÁ
Doctor por la Universidad de Valencia
Investigador Miguel Servet

Certifica:

Que la Tesis Doctoral presentada por Dña. Adela Serrano Gimeno, con el título **"ESTUDIO FARMACOLÓGICO DE LA ACCIÓN DE UN ANTIMUSCARÍNICO DE LARGA DURACIÓN (LAMA) EN LA ACTIVACIÓN DE FIBROBLASTOS PULMONARES HUMANOS"**, ha sido realizada bajo su dirección, y reúne los requisitos necesarios para su juicio y calificación

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

En Valencia, Enero de 2013.

Dr. Javier Milara Payá

La realización de la presente Tesis Doctoral ha sido posible gracias a las siguientes ayudas:

- 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 (CB06/06/0027).
- Ministerio español de Economía y Competitividad: SAF 2011-26443; SAF2008-03113.
- Ministerio español de Economía y Competitividad: Subprograma de acciones de dinamización del entorno investigador y tecnológico del sistema nacional de salud, dentro de la acción estratégica en salud. (ADE10/000020).
- Ministerio español de Economía y Competitividad: Programa CENIT.
- Instituto Nacional de Salud Carlos III (FIS), Miguel Servet CP11/00293.
- Generalitat Valenciana, Conselleria de Educació (Prometeo/2008/045).

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 Gimeno, por permitirme formar parte de su gran equipo de trabajo, por su experiencia, sus consejos y su exigencia que me han hecho superarme día a día.

Al Dr. Javier Milara Payá, por todo su tiempo, dedicación y profesionalidad, por ser un ejemplo de trabajo y esfuerzo, y por todo lo que he aprendido junto a él.

Sin olvidar...

Al Dr. Ezequiel Martí Bonmatí, por iniciarme en el mundo de la investigación.

A mis "*Cortij@s*" del alma, mis compañeros del día a día Pilar, Teresa, Patricia, Sonia, Gracia, Lucia, Pablo y Javi. Por haberme ayudado en todo, por vuestro cariño y complicidad, y por todos los buenos ratos que hemos pasado; sin vosotros el camino habría sido mucho más duro. Y a todos los que lo fueron en el pasado: Deivid, Marco, Adri, Titi, Kaya, Silvia y Nerea.

A los investigadores de la Fundación de Investigación del Hospital General de Valencia (FIHGUV) al Dr. Manolo Mata y a Irene; a la Dra. M^a Dolores Miñana y a Amparito; al grupo de Oncología, la Dra. Eloisa Jantus y sus chicas: Sandra, Elena y Marta y a la Dra. Carmen Ivorra y a Sisco. También a mis compañeros de administración y servicios de la FIHGUV. Gracias por el buen ambiente de trabajo y porque siempre que lo he necesitado, me habéis prestado vuestra ayuda.

A mi familia, me gustaría expresar un agradecimiento muy especial a mis padres Cefe y Maru, y a mis hermanos Javi y Pablo, por el apoyo y la confianza depositada en mí. También al resto de mi familia *ti@s*, *prim@s*, *cuñad@s* y *sobrin@s* por el cariño y aliento que me han dado siempre.

A todos mis amigos en general, y a mis amigas del cole y a mis farmas en particular por su respeto y admiración hacia mi trabajo.

Y el agradecimiento más especial a Javi; por su apoyo incondicional. Gracias por ser como eres y por estar siempre a mi lado.

Gracias a todos.

A mis padres

A mi familia

A Javi

Índice:

1. INTRODUCCIÓN:	2
1.1 EPOC: DEFINICIÓN:.....	3
1.1.1 LIMITACIÓN DEL FLUJO RESPIRATORIO EN LA EPOC:.....	3
1.1.2 CLASIFICACIÓN ESPIROMÉTRICA DE LA SEVERIDAD:	5
1.1.3 ESTADIOS DE LA EPOC:.....	7
1.2. EPIDEMIOLOGIA DE LA EPOC:.....	8
1.2.1 PREVALENCIA:	9
1.2.2 MORBILIDAD:.....	10
1.2.3 MORTALIDAD:.....	11
1.3 FACTORES DE RIESGO DE LA EPOC:	12
1.3.1 GENES:	13
1.3.2 EXPOSICIÓN A PARTÍCULAS INHALADAS:	14
1.3.3 ESTRÉS OXIDATIVO:	15
1.3.4 GÉNERO:	15
1.3.5 INFECCIONES RESPIRATORIAS:	15
1.3.6 NIVEL SOCIOECONÓMICO:	16
1.3.7 NUTRICIÓN:	16
1.4 PATOLOGÍA, PATOGÉNESIS Y FISIOPATOLOGIA DE LA EPOC:	16
1.4.1. PATOLOGÍA:	16
1.4.2 PATOGÉNESIS:	18
1.4.3 FISIOPATOLOGÍA:	21
1.5 REMODELADO EN LA EPOC: TRANSICIÓN FIBROBLASTO – MIOFIBROBLASTO:.....	23
1.5.1 EL PROCESO DE REMODELADO EN LA EPOC:.....	23
1.5.2 TRANSICIÓN FIBROBLASTO – MIOFIBROBLASTO:	25
1.6 PAPEL DEL SISTEMA COLINÉRGICO:.....	27
1.6.1 NEUROTRANSMISOR DEL SISTEMA COLINÉRGICO:.....	27
1.6.2. ACCIÓN DEL SISTEMA COLINÉRGICO EN PULMONES:	28
1.6.3. ACCIÓN DEL SISTEMA COLINÉRGICO NO NEURONAL EN PULMONES:.....	29
1.7 PAPEL DEL HUMO DE TABACO:.....	30
1.7.1 HUMO DE TABACO: COMPOSICIÓN QUIMICA:	30
1.7.2 ESPECIES REACTIVAS DE OXIGENO (ERO), EPOC Y ACTIVACIÓN DE FIBROBLASTOS:	32
1.8 TRATAMIENTO DE LA EPOC:.....	33
1.8.1 BRONCODILATADORES:	34
1.8.2 GLUCOCORTICOIDES:.....	38
1.8.3 INHIBIDORES DE FOSFODIESTERASA 4 (IPD4):	39
1.8.4. OTROS TRATAMIENTOS FARMACOLÓGICOS:	39
1.8.5 ASOCIACIONES:.....	41

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS:	43
2.1 HIPÓTESIS:	45
2.2 OBJETIVOS:	49
3. MATERIAL Y MÉTODOS:	51
3.1 AISLAMIENTO Y CULTIVO DE FIBROBLASTOS DE BRONQUIO HUMANO:	53
3.2 DISEÑO EXPERIMENTAL:	54
3.2.1 ESTUDIO 1:	54
3.2.2 ESTUDIO 2:	56
3.3. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE RT-PCR:.....	59
3.3.1 EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL Y CUANTIFICACIÓN:.....	59
3.3.2 RETROTRANSCRIPCIÓN INVERSA (RT):.....	59
3.3.3 RT-PCR A TIEMPO REAL:	60
3.4 ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN PROTEICA MEDIANTE WESTERN BLOTT:	62
3.5 TRANSFECCIÓN CON ARN DE INTERFERENCIA:.....	64
3.6 INMUNOFLUORESCENCIA:.....	65
3.7 ELISA:	65
3.8 MEDIDA DE LA PRODUCCIÓN DE ERO INTRACELULAR:.....	66
3.9. ENSAYO DE PROLIFERACIÓN Y MIGRACIÓN CÉLULAR.....	67
3.10 ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS:	68
4. RESULTADOS:	79
4.1 RESULTADOS ESTUDIO 1:.....	71
4.1.1 ACL INHIBE LA EXPRESIÓN DE COL1A Y α -SMA INDUCIDA POR CCH Y TGF-B1 EN FIBROBLASTOS DE PULMÓN HUMANO:.....	71
4.1.2 CCH INCREMENTA LA EXPRESIÓN DE MARCADORES DE MIOFIBROBLASTOS MEDIANTE MECANISMOS COMPARTIDOS CON TGF- β 1:.....	73
4.1.3 CCH Y TGF-B1 MODIFICAN LA EXPRESIÓN DE RECEPTORES MUSCARINICOS:	77
4.1.4 ACL INHIBE LA PROLIFERACIÓN Y MIGRACIÓN DE FIBROBLASTOS PULMONARES:.....	80
4.2 ESTUDIO 2:	83
4.2.1. ACL ATENÚA LA INDUCCIÓN DE MARCADORES DE MIOFIBROBLASTOS MEDIADA POR EHT EN FIBROBLASTOS DE BRONQUIO HUMANO:.....	83
4.2.2. ACL REDUCE LA ELEVACIÓN DE ERO INTRACELULAR MEDIADA POR EHT EN FIBROBLASTOS DE BRONQUIO HUMANO:	87

4.2.3. EHT ACTIVA EL SISTEMA COLINÉRGICO NO NEURONAL; DICHO EFECTO ES PREVENIDO POR ACL:	92
4.2.4. EHT PROMUEVE LA SOBREENPRESION DE MARCADORES DE MIOFIBROBLASTOS PARCIALMENTE MEDIADO POR M1, M2 AND M3:	96
5. DISCUSIÓN:.....	99
5.1 ESTUDIO 1:	101
5.2. ESTUDIO 2:	104
6. CONCLUSIONES:.....	111
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:.....	115
8. ÍNDICE DE ABREVIATURAS:	129
9. ANEXO:.....	135
9.1 DICTAMENES: COMISION DE INVESTIGACIÓN Y COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLINICA CEIC	137
9.2 PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS DOCTORAL:	139



1. Introducción:

1.1 EPOC: DEFINICIÓN:

EPOC son las iniciales de Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica, es una enfermedad caracterizada por la limitación del flujo respiratorio, normalmente progresiva y asociada a respuestas inflamatorias anormales, así como por cambios patológicos en el pulmón. También por efectos extrapulmonares significativos o comorbilidades que pueden contribuir a la severidad de la enfermedad y han de tenerse en cuenta para una correcta evaluación diagnóstica de la patología.

El humo de tabaco es el principal factor de riesgo para la EPOC, la mayoría de las personas que tienen EPOC son o han sido fumadoras, también se ha identificado como factor de riesgo la inhalación de sustancias irritantes para los pulmones como la contaminación ambiental resultante de combustiones de combustibles fósiles y otros combustibles, vapores químicos, humos, polvos o incluso en fumadores pasivos [1, 2].

La EPOC es una enfermedad prevenible y tratable que frecuentemente se asocia a otras alteraciones extrapulmonares. Debe diferenciarse de otras enfermedades que también cursan con disminución crónica del flujo aéreo, pero que tienen una causa específica como las que se citan en la siguiente tabla (Tabla 1).

DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL
· Obstrucción de la vía aérea superior
· Fibrosis quística
· Bronquiectasias
· Bronquiolitis obliterante
· Asma bronquial

TABLA 1 Diagnóstico diferencial de la EPOC

1.1.1 LIMITACIÓN DEL FLUJO RESPIRATORIO EN LA EPOC:

Los pacientes que padecen EPOC presentan unos síntomas muy característicos. El principal síntoma es la disnea, o sensación de falta de aire, que se inicia de forma insidiosa cuando la enfermedad es leve y se convierte de forma progresiva en una incapacidad primero para hacer ejercicio y después para caminar o hacer las labores

1. Introducción

habituales. Esta disnea, progresa hasta hacer que el enfermo necesite oxígeno como apoyo a su respiración, que acabará resultando insuficiente. Otros síntomas, presentes en unos pacientes más que en otros, son la tos y la expectoración aumentada, estos dos síntomas acompañan a la instauración de la bronquitis crónica que acompaña a muchos de los enfermos con EPOC.

La limitación del flujo respiratorio característica de la EPOC está ocasionada por una mezcla de los siguientes factores: afectación de las vías aéreas bajas (bronquiolitis obstructiva) así como por destrucción del parénquima pulmonar (enfisema). La inflamación crónica causa cambios estructurales, estrechamiento de las vías aéreas de pequeño calibre, destrucción del parénquima pulmonar, que conduce a la pérdida de la estructura alveolar así como a un descenso de la elasticidad pulmonar. Todos estos cambios disminuyen la capacidad de las vías aéreas a permanecer abiertas durante el proceso de espiración. En resumen:

- Los bronquiolos y los alveolos pierden su elasticidad.
- La finas paredes de los alveolos se destruyen y los bronquios se engrosan e inflaman.
- Los pulmones fabrican más moco de lo normal y esto hace que se obstruyan estas vías.

La patogénesis de la EPOC no cursa de igual modo en todos los individuos que la padecen. Generalmente es una enfermedad progresiva, especialmente si los pacientes están expuestos a agentes nocivos de manera continuada. Cesar la exposición a estos agentes, cuando ya se ha producido la limitación respiratoria, puede mejorar la función pulmonar, disminuir la progresión de la enfermedad o incluso detenerla, sin embargo, una vez desarrollada la EPOC y sus morbilidades, no se cura y por consiguiente debe tratarse de por vida. Los tratamientos de la EPOC pueden reducir la sintomatología, mejorar la calidad de vida, reducir el número de exacerbaciones y posiblemente reducir la mortalidad pero no curarla.

La limitación del flujo aéreo se mide mediante espirometría, que es una prueba básica y fácilmente reproducible para el estudio de la función pulmonar.

1.1.2 CLASIFICACIÓN ESPIROMÉTRICA DE LA SEVERIDAD:

Existe una clasificación de la enfermedad que nos permite estadificarla en cuatro niveles en función de su severidad. La espirometría es una técnica esencial para el diagnóstico de la enfermedad y aporta datos muy útiles para evaluar los cambios patológicos producidos [3].

La espirometría consta de una serie de pruebas respiratorias sencillas, bajo circunstancias controladas, que miden la magnitud absoluta de las capacidades pulmonares, los volúmenes pulmonares y la rapidez con que éstos pueden ser movilizados (flujos aéreos). Los resultados se representan en forma numérica fundamentados en cálculos sencillos y en forma de impresión gráfica.

Existen dos tipos fundamentales de espirometría: espirometría simple y espirometría forzada

1) Espirometría Simple con la que se obtienen los siguientes parámetros:

- *Volumen corriente (TV)*: es la cantidad de aire que se utiliza en cada respiración (inspiración y espiración) no forzada, es decir el aire utilizado durante el ciclo respiratorio. Por convenio se mide el volumen espirado ya que normalmente el inspirado y el espirado no son idénticos.
- *Volumen de Reserva Inspiratoria (VRI)*: es la cantidad máxima de volumen de aire que se puede inspirar partiendo del Volumen Corriente.
- *Volumen de Reserva Espiratoria (VRE)*: es la cantidad máxima de volumen de aire que se puede espirar partiendo del Volumen Corriente y bajo éste.
- *Capacidad Vital (VC)*: es el volumen máximo que somos capaces de inspirar y espirar, en condiciones normales y es la suma del volumen corriente y los volúmenes de reserva inspiratorio y espiratorio.

2) Espirometría Forzada con la que se obtienen los siguientes parámetros:

- *Volumen Espiratorio Forzado (VEF1)*: es la cantidad de aire expulsado durante el primer segundo de la espiración máxima, realizada tras una inspiración máxima.
- *Capacidad Vital Forzada (CVF)*: similar a la capacidad vital (VC), pero la maniobra es forzada y con la máxima rapidez que el paciente pueda producir.

1. Introducción

Se emplea esta capacidad debido a que en ciertas patologías, es posible que la capacidad de aire forzado de los pulmones puede ser menor a la capacidad vital durante una exhalación más lenta.

- **VEF1/CVF:** es la relación, en porcentaje, de la capacidad forzada que se espira en el primer segundo, del total exhalado para la capacidad vital forzada. Su valor normal es superior al 80%.

Con los resultados obtenidos en esta prueba funcional se podrá realizar la clasificación espirométrica de la EPOC según se indica en la tabla [4].

CLASIFICACIÓN EPOC (Severidad basada en VEF1 post-broncodilatador)	
Estadio I Leve	VEF1/CVF < 0,70 VEF1 ≥ 80% predicho
Estadio II Moderado	VEF1/CVF < 0,70 50% ≤ VEF1 < 80% predicho
Estadio III Grave	VEF1/CVF < 0,70 30% ≤ VEF1 < 50% predicho
Estadio IV Muy Grave	VEF1/CVF < 0,70 VEF1 < 30% predicho // VEF1 < 50% predicho + fallo crónico respiratorio

TABLA 2 Clasificación espirométrica EPOC VEF1: Volumen espiratorio forzado en un segundo; CVF: Capacidad vital forzada; Fallo respiratorio: Presión parcial arterial de O₂ (PaO₂) menor de 8.0 kPa (60mmHg) con o sin hipercapnia (PaCO₂) mayor de 6.7 kPa (50mmHg) mientras se respira a nivel del mar

Sin embargo, teniendo en cuenta que la edad afecta al volumen pulmonar, por el envejecimiento natural del pulmón, el empleo de estos ratios puede ocasionar un sobrediagnóstico de la enfermedad en ancianos y un infradiagnóstico en adultos jóvenes menores de 45 años [5], especialmente en enfermos leves. Por ello, es importante, conociendo la distribución normal de VEF1/CVF (con intervalo de confianza del 95%) el empleo del límite inferior de estos valores para minimizar sesgos; además de confirmar el carácter inflamatorio de la obstrucción y una clara exposición a un factor riesgo conocido (hábito tabáquico, exposición a contaminación ambiental, etc.). En este sentido, las personas con caracterización espirométrica identificada requerirán una confirmación clínica para atribuirles el diagnóstico de EPOC.

1. Introducción

La espirometría suele realizarse tras la administración de una dosis adecuada de un fármaco broncodilatador vía inhalatoria (400µg de Salbutamol) [6] con el fin de minimizar la variabilidad. El estudio randomizado con el que se concluyeron los valores espirométricos de referencia, demuestra que el test tras broncodilatación es el método más efectivo para identificar a los pacientes EPOC [7].

1.1.3 ESTADIOS DE LA EPOC:

El impacto de la enfermedad de manera individual no solo depende de la limitación del flujo respiratorio, sino también de la severidad de los síntomas, especialmente fatiga e incapacidad de realizar ejercicio. Existe una relación imperfecta entre el grado de limitación al flujo aéreo y la sintomatología. El estadiaje espirométrico nos permite obtener un enfoque pragmático para el abordaje de la enfermedad.

- *EPOC leve*: ($VEF_1/CVF < 0,70$; $VEF_1 \geq 80\%$ predicho) En este estadio, se produce una limitación leve del flujo de aire, en ocasiones presentan tos crónica y producción mucosa, pero no siempre. Los pacientes no son conscientes de que su función pulmonar es anormal.
- *EPOC moderada*: ($VEF_1/CVF < 0,70$ $50\% \leq VEF_1 < 80\%$ predicho) En este estadio, la limitación del flujo de aire causa síntomas como tos, tos con flema y falta de aire durante el ejercicio físico. Los pacientes que llegan a este estadio suelen acudir al médico.
- *EPOC grave*: ($VEF_1/CVF < 0,70$; $30\% \leq VEF_1 < 50\%$ predicho) En este estadio, la limitación del flujo de aire es incluso mayor. Los pacientes se quejan de un empeoramiento: mayor falta de aire, fatiga, limitaciones en las actividades diarias y exacerbaciones repetidas que afectan a la calidad de vida.
- *EPOC muy grave*: ($VEF_1/CVF < 0,70$ $VEF_1 < 30\%$ predicho // $VEF_1 < 50\%$ predicho + fallo crónico respiratorio) Este estadio se caracteriza por una grave reducción del flujo de aire tan grave que la limitación puede producir problemas cardíacos como cor pulmonare. En ocasiones es necesario administrar cantidades diarias de oxígeno suplementario. Las molestias son tan graves que determinados empeoramientos temporales pueden suponer un riesgo para la vida del paciente.

1. Introducción

1.2 EPIDEMIOLOGIA DE LA EPOC:

La EPOC es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad a nivel global que repercute económicamente incrementando considerablemente la carga social. La prevalencia, morbilidad y mortalidad de la EPOC varía en cada país y en los grupos que los integran, pero por lo general, están relacionados directamente con la presencia de tabaco, aunque en determinados países la contaminación del aire como resultado de la quema de madera y otros biocombustibles también han sido identificados como factores de riesgo para la EPOC. Está proyectado que la carga social y la prevalencia de la EPOC incremente en las próximas décadas debido a la continua exposición a los factores desencadenantes de la enfermedad y a los cambios de edad de la población mundial (con una población más longeva, y por tanto que alcanza la edad en la que la EPOC se desarrolla normalmente).

Las imprecisas y variables definiciones de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica que han existido hasta la fecha, han dificultado cuantificar la prevalencia, morbilidad y mortalidad de la misma; el no reconocimiento y en consecuencia el infradiagnóstico de la enfermedad han llevado a un sesgo importante en su cuantificación.

En los diferentes países donde se había medido la prevalencia de EPOC los datos eran inconsistentes por varias razones, entre ellas; existía: falta de consenso en el diagnóstico y tratamiento por las diferencias en la definición de la patología, así como en la sensibilización acerca de la enfermedad por parte de los profesionales sanitarios; diferentes formas de medir la prevalencia (encuestas a pacientes, encuestas a médicos, etc.); y también diferencias en la organización sanitaria existente encargada de afrontar las patologías crónicas, así como en la disponibilidad de medicación para el tratamiento de la EPOC [8].

1.2.1 PREVALENCIA:

Los datos de prevalencia existentes muestran una notable variación debido a los diferentes métodos de encuesta, criterios de diagnóstico y enfoques analíticos [9, 10].

De hecho; estudios a nivel nacional muestran que menos del 6% de la población es conocedora de que padece EPOC [9]. Esto refleja la falta de identificación por parte del paciente o el infradiagnóstico de la enfermedad por los profesionales sanitarios [11]. En contra; estudios realizados sobre la prevalencia de la enfermedad, en determinados países, que emplean métodos de diagnóstico estandarizados como la espirometría, estiman que aproximadamente un cuarto de los adultos mayores de 40 años tienen limitación del flujo aéreo y son clasificados como Fase I: EPOC leve o niveles superiores.

Aun empleando métodos diagnósticos, los distintos criterios proporcionan un amplio abanico de estimaciones, que dificultan el consenso para el diagnóstico de EPOC y por tanto para estimar su prevalencia. Se sabe que la definición de limitación de flujo de forma irreversible definido como el ratio postbroncodilatador FEV1/FVC menor de 0.70 conlleva a una clasificación potencialmente errónea, con falsos negativos en adultos jóvenes, y falsos positivos en mayores de 50 años [12-14]. Para evitar este sesgo en el diagnóstico, se aconseja el empleo del límite inferior normal (LIN), en lugar del valor fijo del ratio FEV1/FVC, para definir la limitación del flujo [6, 15].

Existen muchas fuentes de sesgo; entre ellas se encuentran; métodos de muestreo, control de calidad de la técnica espirométrica, si la espirometría se realiza con o sin broncodilatador... Cabe destacar, que un vaciado inadecuado de los pulmones durante la espirometría es común, y conduce a un elevado ratio artificial FEV1/FVC, y por tanto desestima casos que incrementarían la prevalencia de EPOC. También, un uso erróneo del valor de postbroncodilatador en lugar del prebroncodilatador, conlleva a una sobre-estimación de la limitación del flujo.

Independientemente de los problemas asociados, los datos emergentes nos permiten extraer conclusiones acerca de la prevalencia de la EPOC. Una revisión sistemática y el metaanálisis proporcionan evidencias de que la prevalencia de

1. Introducción

EPOC (Estadio I: EPOC leve y moderada) se aprecia de forma más elevada en pacientes fumadores y exfumadores, que en no fumadores, siendo mayor en individuos varones mayores de 40 años.

El estudio PLATINO (Latino America) concluyó que la prevalencia de un flujo gaseoso postbroncodilatador limitado (Estadio I: EPOC leve y moderada) está en personas mayores de 40 años. Dicha prevalencia de aumentó vertiginosamente con la edad y en todas las ciudades/países la prevalencia fue superior en hombres que en mujeres, los motivos de esta diferencia continúan en estudio.

1.2.2 MORBILIDAD:

Las medidas de morbilidad tradicionalmente incluyen las visitas médicas, visitas a urgencias y hospitalizaciones. Aunque las bases de datos existentes sobre la EPOC son poco accesibles y normalmente poco fiables en comparación a otras bases de datos, los datos disponibles indican que la morbilidad debida a EPOC está incrementa con la edad y es mayor en hombres que en mujeres [16, 17]. Sin embargo, en estas bases de datos, los estadios tempranos de EPOC (Estadio I: EPOC leve y Estadio II: EPOC moderada) no suelen ser reconocidos, diagnosticados ni tratados, y por tanto su diagnóstico no se incluye en la historia clínica del paciente.

La morbilidad asociada a la EPOC puede verse afectada por otras condiciones de comorbilidad crónica[18] (ej. Enfermedades músculo-esqueléticas, diabetes mellitus), que no están relacionadas directamente con la patología de la EPOC pero aun así, pueden tener impacto sobre el estado de salud del paciente, o afectar negativamente al tratamiento de la EPOC. En pacientes que presentan EPOC en estadios avanzados (Estadio III: EPOC severa y Estadio IV: EPOC muy severa), la morbilidad puede ser falsamente atribuida a condiciones de comorbilidad.

Los datos referentes a la morbilidad se ven afectados por la disponibilidad de los recursos (ej. las tasas de hospitalización dependen de la disponibilidad de camas en los hospitales) y por tanto deben ser interpretados con cautela y con una comprensión clara de las posibles tendencias imparciales inherentes a las bases de datos. En la mayoría de los países europeos, las consultas por EPOC superan en

1. Introducción

número a las de asma, neumonía, cáncer de tráquea y/o pulmón y tuberculosis. En el año 2000 en EEUU, se registraron 8 millones de visitas al médico de cabecera y hospitales por EPOC, 1,5 millones de visitas a urgencias y 673.000 hospitalizaciones.

1.2.3 MORTALIDAD:

La EPOC representa hoy en día la única causa de mortalidad que ha aumentado en los últimos años, con una subida de hasta el 150% respecto a otras enfermedades de alto riesgo como el cáncer o las enfermedades cardiovasculares. En la actualidad, la EPOC es responsable de 49 fallecimientos diarios y también es la primera causa de muerte evitable en nuestro país.

Se ha comprobado que los enfermos que han sufrido más de 3 exacerbaciones/año presentan mayor mortalidad que aquellos con menos episodios de exacerbaciones. Así mismo, hay estudios que muestran que la gravedad, es directamente proporcional a las probabilidades de fallecer durante el ingreso, y de presentar una agudización en los meses siguientes. Y también cabe destacar que por cada ingreso adicional en el año previo el riesgo de mortalidad se incrementa en un 70%

A nivel mundial es una de las causas de muerte más importantes. Se pronostica que siendo la quinta causa de muerte en 1990, y la cuarta desde el año 2000, se convertirá en la tercera causa de mortalidad mundial en 2020 [19-21]. Este aumento en la mortalidad deriva de expansión epidémica del hábito de fumar, y el cambio demográfico hacia una población envejecida.

En España, y según los datos del Instituto Nacional de Estadística, la EPOC fue la quinta causa de muerte entre los varones en el año 2002, con una tasa anual de 60 muertes por 100 mil habitantes y la séptima para las mujeres, con una tasa de 17 muertes por 100 mil habitantes y año. Estos datos permiten estimar que cada año fallecen en España más de 18.000 personas debido a la EPOC. Como ocurre con otras enfermedades crónicas relacionadas con el tabaco, la distribución de la EPOC depende fundamentalmente del historial de exposición tabáquica y del envejecimiento paulatino de la población. Por este motivo, resulta lógico proyectar

1. Introducción

que en España vamos a asistir a una verdadera epidemia de EPOC durante los próximos años, con un número de casos en el espacio y en el tiempo superior a lo esperado. Estas previsiones se sustentan en que, desgraciadamente, estamos a la cabeza de Europa en tabaquismo en adolescentes y entre los primeros del mundo en mujeres. Además, las previsiones son que la población española llegue a su crecimiento máximo en 2050 con 53 millones de habitantes y a un envejecimiento máximo alrededor de 2060.

1.3 FACTORES DE RIESGO DE LA EPOC:

La identificación de los factores de riesgo es el paso más importante para el desarrollo de estrategias para prevenir y tratar la enfermedad. El principal factor de riesgo para la EPOC es el tabaquismo; de hecho el cese en el hábito tabáquico es una de las herramientas principales en los programas de prevención de la patología. Aunque el tabaco es el factor de riesgo principal, y el más estudiado en el desarrollo de la EPOC, no es el único, puesto que personas no fumadoras también padecen la enfermedad; existen diversos factores de riesgo, pero la esencia del riesgo de padecer EPOC resulta de la predisposición genética y la interacción con el entorno.[22, 23]

FACTORES DE RIESGO
Genes
Exposición a partículas inhaladas: <ul style="list-style-type: none">• Humo de tabaco• Exposición laboral• Polución en ambientes cerrados• Polución ambiental
Estrés oxidativo
Genero
Edad
Infecciones respiratorias
Antecedente de tuberculosis
Nivel socioeconómico
Nutrición
Comorbilidades

TABLA 3 Factores de riesgo de la EPOC

1.3.1 GENES:

La EPOC es una enfermedad poligénica. El factor de riesgo genético mejor documentado en esta patología, es el déficit hereditario de α 1-antitripsina (AAT) [24], es una enzima circulante inhibidora de las serin proteasas, muy importante en la protección de las estructuras pulmonares. Los individuos con déficit de AAT desarrollan enfisema precozmente, y si además son fumadores el riesgo se incrementa de manera significativa. Aunque este déficit afecta a una parte muy pequeña de la población mundial ilustra, como la dotación genética y la interacción con el entorno, influye sobre el desarrollo de la enfermedad.

En este sentido cabe destacar la importancia de un factor genético o susceptibilidad en la contribución al establecimiento de la enfermedad; de hecho existen datos sobre la mayor probabilidad de padecer EPOC en hermanos fumadores de pacientes con EPOC severo. La identificación de los genes implicados en las enfermedades respiratorias tiene importancia por las siguientes razones; primero, ayuda a entender totalmente la fisiopatología de la enfermedad y el funcionamiento normal de las vías respiratorias. En segundo lugar, puede facilitar el desarrollo de estrategias para el diseño de nuevos tratamientos. Y en tercer lugar permite identificar mejor el camino de prevención de la enfermedad, mejorando la evaluación de riesgo, o hacer un diagnóstico más temprano, más exacto. Estudios genéticos han identificado varias regiones del genoma que contienen genes de susceptibilidad a la EPOC. Un estudio que se publica en el Nature Genetics ha identificado 16 nuevas secciones del código genético (Tabla 4) que se relacionan con la salud pulmonar, abriendo la posibilidad de una mejor prevención y tratamiento de enfermedades como la EPOC [25]

Gen	Designación	Gen	Designación
ARMC2	<i>Armadillo repeat-containing protein 2</i>	LRP1	<i>Low density lipoprotein receptor-related protein 1</i>
C10orf11	<i>Chromosome 10 open reading frame 11</i>	MFAP2	<i>Microfibrillar-associated protein 2</i>
CCDC38	<i>Coiled-coil domain containing 38</i>	MMP15	<i>Matrix metalloproteinase 15</i>
CDC123	<i>Cell division cycle 123 homolog</i>	NCR3	<i>Natural cytotoxicity triggering receptor 3</i>
CFDP1	<i>Craniofacial development protein 1</i>	RARB	<i>Retinoic acid receptor, beta</i>

1. Introducción

EVI1	<i>Ecotropic viral integration site 1</i>	SPATA9	<i>Spermatogenesis associated 9</i>
HDAC4	<i>Histone deacetylase 4</i>	TGFB2	<i>Transforming growth factor, beta 2</i>
KCNE2	<i>Potassium voltage-gated channel, Isk-related family, member 2</i>	ZKSCAN3	<i>Zinc finger with KRAB and SCAN domains 3</i>

Tabla 4. Secciones del código genético que se relacionan con la salud pulmonar

1.3.2 EXPOSICIÓN A PARTÍCULAS INHALADAS:

A lo largo de la vida los individuos estamos expuestos a diferentes tipos de partículas inhaladas que contribuyen al desarrollo de la patología

- Humo de tabaco: El tabaquismo es el factor de riesgo más relevante en el desarrollo de la EPOC. Los fumadores tienen una alta prevalencia de síntomas respiratorios y anomalías en la función respiratoria en comparación a pacientes no fumadores. Fumar, en cualquiera de sus modalidades: pipa, cigarro y/o puro eleva el ratio de morbilidad y mortalidad de pacientes EPOC [26]. Los datos relativos a la edad de comienzo, paquetes fumados al año, actualmente fumador o no, etc. Permiten predecir la morbi-mortalidad de un paciente EPOC, aunque cabe destacar que los factores genéticos pueden modificar el riesgo individual [25]. La exposición pasiva al humo de tabaco de igual manera contribuye a la sintomatología respiratoria de la EPOC [27]. Fumar durante el embarazo supone un riesgo para el feto, afectando al crecimiento y desarrollo pulmonar así como deprimiendo el sistema inmune [28].
- Exposición laboral: La exposición a gases, vapores o polvos orgánicos o inorgánicos derivados de procesos industriales, constituyen un factor de riesgo para la exacerbación de la EPOC [29-31].
- Polución en ambientes cerrados: La combustión de maderas, residuos, estiércoles animales, restos de cultivos y biocombustibles en general empleados en actividades cotidianas e industriales dejan altos niveles de polución en recintos poco ventilados suponiendo un factor de riesgo para la EPOC [32-34].
- Polución ambiental: Los elevados niveles de contaminación ambiental son altamente nocivos para las personas con problemas respiratorios o cardiacos.

1.3.3 ESTRÉS OXIDATIVO:

Los pulmones están expuestos continuamente a agentes oxidantes generados de manera endógena por diversos tipos celulares como los fagocitos o de manera exógena por la polución del aire, el humo de tabaco etc. Las células pulmonares están protegidas frente a estos fenómenos de estrés oxidativo mediante diversos mecanismos celulares enzimáticos o no enzimáticos que les permiten tener un equilibrio de las especies oxidantes y antioxidantes, cuando se rompe este equilibrio existe estrés oxidativo en la célula; que no solo produce daño directo en la células, también activa diversas vías de señalización que inician el proceso de inflamación pulmonar. El desequilibrio entre especies oxidantes y antioxidantes se considera que juega un importante rol en la patogénesis de la EPOC [35].

1.3.4 GÉNERO:

El papel del género a la hora de determinar el riesgo de EPOC no está demasiado claro [36]. En las últimas décadas, la mayoría de los estudios, mostraban que la prevalencia y mortalidad de la EPOC afectaba mayoritariamente a hombres. Pero estudios posteriores [37] han demostrado que la prevalencia es equitativa en hombres y en mujeres, lo cual refleja los cambios en el hábito tabáquico, ampliamente extendido hoy día al sector femenino. Algunos estudios [36, 38, 39] también sugieren que las mujeres son más susceptibles a los efectos del tabaco que los hombres.

1.3.5 INFECCIONES RESPIRATORIAS:

Las infecciones respiratorias tanto víricas como bacterianas pueden contribuir a la patogénesis y progresión de la EPOC [40] así como a la inflamación de las vías respiratorias asociada [41], lo cual juega un importante papel en las exacerbaciones [42]. Por ejemplo; pacientes con antecedente de tuberculosis muestran una prevalencia de EPOC de 30.7% en comparación a 13% entre aquellos sin historia previa.

1. Introducción

Cabe destacar también que las infecciones del tracto respiratorio durante la infancia, se asocian con la presencia de síntomas respiratorios en la edad adulta y con un aumento de la probabilidad de desarrollo de EPOC [43-45]. Los eventos respiratorios que ocurren en etapas tempranas de la vida limitan el desarrollo del aparato respiratorio y la función pulmonar, en este sentido, la historia natural de la enfermedad podría empezar mucho antes de que el sujeto comenzara a fumar.

1.3.6 NIVEL SOCIOECONÓMICO:

Existe una relación inversa entre el nivel socioeconómico y la prevalencia de EPOC [46]. Se discute si esta prevalencia está asociada a la exposición a contaminantes por exposición laboral a una mala nutrición o a otros factores relacionados con la baja condición social.

1.3.7 NUTRICIÓN:

La malnutrición o un adelgazamiento excesivo pueden reducir la fuerza y resistencia de los músculos respiratorios, por una reducción de la masa muscular y pérdida de fuerza de las fibras musculares existentes. Se han realizado estudios in vivo con grupos en inanición y sobrealimentación en los que se ha evaluado el desarrollo de enfisema. Tomografías computerizadas, realizadas a mujeres malnutridas a causa de anorexia nerviosa muestran cambios enfitematosos en sus pulmones [47].

1.4 PATOLOGÍA, PATOGÉNESIS Y FISIOPATOLOGIA DE LA EPOC:

1.4.1. PATOLOGÍA:

Los cambios patológicos característicos de la EPOC afectan a las vías aéreas tanto proximales como periféricas, al parénquima y a los vasos sanguíneos pulmonares [48] (Tabla 5). Dichos cambios incluyen; inflamación crónica con

1. Introducción

infiltrado inflamatorio constituido principalmente por: macrófagos, neutrófilos y linfocitos T citotóxicos (CD8+) que se acompaña de cambios estructurales que producen estrechamiento de la luz en las vías aéreas y las arterias, además de enfisema en el parénquima pulmonar. Todos los cambios inflamatorios pueden persistir tras el abandono del tabaco, por lo que otros factores, posiblemente de susceptibilidad genética o inmunológica, pueden contribuir a su patogenia.

CAMBIOS PATOLÓGICOS
<p>Vías aéreas proximales (tráquea, bronquio > 2mm diámetro interno)</p> <ul style="list-style-type: none">• <i>Células inflamatorias:</i> ↑Macrófagos, ↑ Linfocitos T-CD8⁺ (citotóxicos), pocos Neutrófilos y Eosinófilos.• <i>Cambios estructurales:</i> ↑ células caliciformes, agrandamiento glándulas submucosas y metaplasia de epitelio escamoso [49].
<p>Vías aéreas periféricas (bronquiolos < 2mm diámetro interno)</p> <ul style="list-style-type: none">• <i>Células inflamatorias:</i> ↑Macrófagos, ↑ Linfocitos T(CD8⁺ > CD4⁺), ↑ Linfocitos B, ↑ folículos linfoides, ↑ fibroblastos, pocos neutrófilos y eosinófilos.• <i>Cambios estructurales:</i> engrosamiento paredes de vías aéreas y estrechamiento de la luz, fibrosis peribronquiolar, incremento de exudados inflamatorios correlacionado con la severidad de la enfermedad [50].
<p>Parénquima pulmonar</p> <ul style="list-style-type: none">• <i>Células inflamatorias:</i> ↑Macrófagos y ↑ Linfocitos T-CD8⁺ (citotóxicos).• <i>Cambios estructurales:</i> Destrucción alveolar, apoptosis de células epiteliales y endoteliales [51].
<p>Vasos sanguíneos:</p> <ul style="list-style-type: none">• <i>Células inflamatorias:</i> ↑ Macrófagos y ↑ Linfocitos T.• <i>Cambios estructurales:</i> Engrosamiento de la íntima, disfunción endotelial e incremento de musculo liso → hipertensión pulmonar [52].

TABLA 5 Cambios patológicos de la EPOC

1. Introducción

1.4.2 PATOGÉNESIS:

Los mecanismos patogénicos de la EPOC empiezan a comprenderse mejor actualmente, se sabe que están involucrados diferentes factores que interactúan entre sí para generar la reacción inflamatoria y todos los cambios patogénicos que favorecen el desarrollo e instauración de la EPOC.

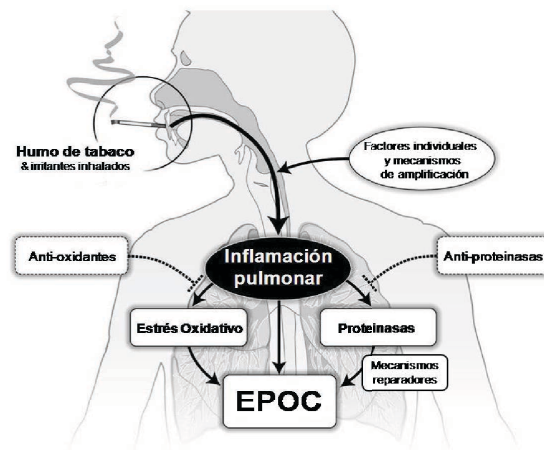


FIGURA1 Patogénesis de la EPOC

1.4.2.1 Células inflamatorias:

La EPOC posee un patrón inflamatorio característico con presencia de neutrófilos, macrófagos y linfocitos. Estas células liberan mediadores inflamatorios e interactúan con células estructurales de las vías aéreas y del parénquima pulmonar. El predominio y distribución de dichas células queda recogido en la tabla contigua (Tabla 6).

CÉLULAS INFLAMATORIAS
Neutrófilos: ↑ en esputo de fumadores; ↑ en EPOC e indicativo de severidad de la enfermedad; ↓ en tejido; Importante rol en la hipersecreción mucosa y en la liberación de proteasas [53].
Macrófagos: ↑↑↑ en luz aérea, en parénquima pulmonar y en lavados

broncoalveolares; derivados de los monocitos sanguíneos y diferenciados en el tejido pulmonar; Incrementan mediadores inflamatorios y proteasas en pacientes EPOC; pueden realizar fagocitosis defectuosas.
Linfocitos T: ↑↑↑ Ambos CD8+ y CD4+ en luz aérea y en parénquima pulmonar; liberan INF-γ y sobreexpresan el receptor de quimiocinas CXCR3; CD8+ pueden ser citotóxicas para células alveolares contribuyendo a su destrucción.
Linfocitos B: ↑ en vías aéreas periféricas y en folículos linfoides, posiblemente como respuesta a una colonización crónica e infección de las vías respiratorias
Eosinófilos: ↑ en esputo y en parénquima pulmonar durante exacerbaciones
Células epiteliales: Pueden ser activadas por el humo de tabaco y producir mediadores inflamatorios.

TABLA 6. Células inflamatorias de la EPOC

1.4.2.2 Mediadores inflamatorios:

La amplia variedad de mediadores inflamatorios que se ven incrementados en los pacientes EPOC [54] atraen a las células inflamatorias existentes en el torrente sanguíneo (factores quimiotácticos), amplificando el proceso inflamatorio (citocinas proinflamatorias) e induciendo cambios estructurales (factores de crecimiento). Algunos ejemplos quedan reflejados en la siguiente tabla (Tabla 7)

MEDIADORES INFLAMATORIOS
<p>Factores quimiotácticos</p> <ul style="list-style-type: none"> • Mediadores lipídicos: Leucotrieno B4 atrae neutrófilos y linfocitos T • Quimiocinas: Interleucina-8 (IL-8) atrae neutrófilos y monocitos.
<p>Citocinas proinflamatorias: Factor de necrosis tumoral-α (TNF-α), interleucina-1β (IL-1β) o interleucina-6 (IL-6), amplifican el proceso inflamatorio y contribuyen a algunos de los efectos sistémicos de la EPOC.</p>

1. Introducción

Factores de crecimiento: Factor de crecimiento transformante β (TGF- β) puede inducir fibrosis en las vías aéreas de pequeño calibre.

TABLA 7 Mediadores inflamatorios implicados en la EPOC

1.4.2.3. Estrés oxidativo:

El estrés oxidativo es uno de los factores amplificadores en la EPOC [55]. Biomarcadores de este estatus oxidativo; por ejemplo: peróxido de hidrógeno, isoprostano-8, peroxinitrito etc. están incrementados en aire exhalado, esputo, y circulación sistémica de pacientes EPOC. De hecho el estrés oxidativo está altamente incrementado en exacerbaciones.

Los oxidantes son generados por el humo de tabaco y otras partículas inhaladas, así como por células inflamatorias activadas como macrófagos o neutrófilos [56]. En paralelo existe una reducción de los antioxidantes endógenos en pacientes EPOC. Este entorno oxidativo tiene consecuencias adversas para los pulmones, incluyendo activación de genes inflamatorios, inactivación de antiproteasas, estimulación de secreción mucosa etc. En concreto, es capaz de disminuir la actividad de la histona deacetilasa (HDAC) lo cual contribuye a un incremento de la expresión de genes inflamatorios y también a una reducción de la acción antiinflamatoria de los corticosteroides [57].

1.4.2.4 Desequilibrio proteasas/anti-proteasas:

Existen evidencias acerca del desequilibrio entre proteasas y antiproteasas presente en los pulmones de pacientes EPOC. Las proteasas median la destrucción de fibras de elastina, promueven la formación de tejido conectivo en parénquima pulmonar, y en consecuencia contribuyen a la instauración de enfisema.

Muchas proteasas derivadas de células inflamatorias y células epiteliales, están incrementadas en dichos pacientes, así como muchas antiproteasas ven disminuidas sus concentraciones (Tabla 8)

PROTEASAS Y ANTIPROTEASAS	
Proteasas incrementadas	Antiproteasas disminuidas
Proteasas de serina Elastasa neutrofilica Catepsina G Proteinasa 3	Alfa 1- antitripsina Alfa 1- antiqumiotripsina Elafina
Proteinases de cisteína Catepsina B K L S	Cistatinas
Metaloproteinases de matriz (MMPs) MMP-8, MMP-9, MMP-12	Inhibidores tisulares de MMP 1-4

TABLA 8 Proteasas y antiproteasas involucradas en la EPOC

1.4.3 FISIOPATOLOGÍA:

1.4.3.1 Limitación del flujo respiratorio y atrapamiento aéreo:

La extensión de la inflamación, fibrosis y exudados en vías aéreas de pequeño calibre está correlacionado con la disminución acelerada de VEF1 y el ratio VEF1/CVF características de la EPOC [48].

La obstrucción de vías aéreas periféricas provoca un atrapamiento aéreo o limitación espiratoria al flujo aéreo con la consiguiente hiperinsuflación (volumen pulmonar tras la espiración aumentado). A pesar de que la hiperinsuflación es un mecanismo de compensación que incrementa el flujo espiratorio, tiene varias desventajas como lo son el aumento del trabajo respiratorio, la colocación de los músculos inspiratorios en situación de desventaja mecánica, debido al efecto longitud-tensión, y una presión positiva alveolar (necesario superarla para iniciar la siguiente inspiración). El efecto neto es una marcada discrepancia entre el nivel de esfuerzo inspiratorio (que se aproxima al máximo) y la respuesta mecánica del sistema respiratorio (muy disminuida), que se manifiesta como disnea, inicialmente con el esfuerzo y más tarde en reposo [58].

Además, el enfisema aunque está más asociado a las alteraciones del intercambio gaseoso que a la reducción del VEF1, también contribuye a los fenómenos de atrapamiento aéreo.

1. Introducción

1.4.3.2 Alteraciones en el intercambio gaseoso:

Las alteraciones del intercambio gaseoso traen como consecuencia un estado de hipoxemia e hipercapnia que caracterizan la patología de la EPOC. En general, estas alteraciones empeoran conforme progresa la enfermedad.

El enfisema, definido como agrandamiento permanente de los espacios aéreos distales y bronquiolos terminales, con destrucción de la pared alveolar, con o sin fibrosis manifiesta; se correlaciona de manera directa con la presión arterial de O₂ (PaO₂) y con otros parámetros que demuestran desequilibrio en los fenómenos de ventilación-perfusión (V/P).

La obstrucción de las vías aéreas y el desequilibrio V/P, combinado con el deterioro de la función de los músculos respiratorios existentes en un grado severo de la enfermedad, conducen a una reducción de la ventilación y a un acumulo de CO₂ en el organismo de los pacientes.

1.4.3.3 Hipersecreción mucosa:

La hipersecreción mucosa, resultado de una tos productiva crónica, es característica de la bronquitis crónica y no está necesariamente asociada a la limitación de flujo aéreo. De hecho, no todos los pacientes diagnosticados de EPOC poseen sintomatología de hipersecreción mucosa.

Cuando presentan este fenómeno, es debido a la metaplasia mucosa; con incremento de células caliciformes y agrandamiento de glándulas submucosas, generalmente en respuesta a irritantes inhalados de manera crónica como el humo de tabaco u otros agentes nocivos. Diversos mediadores y proteasas, estimulan la hipersecreción mucosa ejerciendo sus efectos a través de la activación del receptor del factor de crecimiento epidermoide (EGFR) [59].

1.4.3.4 Alteraciones sistémicas de pacientes EPOC:

Se conoce que la EPOC está asociada a efectos sistémicos, particularmente en pacientes con un grado severo de la enfermedad, lo cual tiene un gran efecto sobre la comorbilidades y la supervivencia [60, 61].

La caquexia, es un estado común en pacientes con EPOC severa; se da una pérdida extrema de peso corporal con desnutrición, atrofia muscular, fatiga y debilidad. Los pacientes EPOC también tienen propensión a padecer osteoporosis, depresión o anemia crónica [62]. Y ven incrementado el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares correlacionadas con el incremento de la proteína C reactiva (PCR) [63].

El incremento de mediadores inflamatorios incluyendo factor de necrosis tumoral - α (TNF- α) o interleucina-6 (IL-6), especies reactivas de oxígeno etc. median sobre estos efectos sistémicos.

ALTERACIONES SISTÉMICAS
Caquexia
Pérdida de masa muscular
Osteoporosis
Depresión
Anemia normocrómica normocítica
Incremento del riesgo cardiovascular: asociado con el \uparrow PCR

TABLA 9 Alteraciones sistémicas de pacientes EPOC

1.5 REMODELADO EN LA EPOC: TRANSICIÓN FIBROBLASTO –MIOFIBROBLASTO:

1.5.1 EL PROCESO DE REMODELADO EN LA EPOC:

El remodelado de las vías aéreas es un proceso patológico observado en enfermedades de carácter obstructivo e inflamatorio tales como el asma y la EPOC;

1. Introducción

destacando que la extensión y progresión de dicha alteración se correlaciona con la severidad de la enfermedad [50, 64].

En la EPOC se desencadena una infiltración de células inflamatorias, como neutrófilos, macrófagos y otros tipos celulares, que participan en una respuesta inflamatoria crónica. Dichas células inflamatorias liberan una serie de moléculas inflamatorias y proteasas. Entre las moléculas inflamatorias destacan citoquinas y quimiocinas (tipo IL-8, TNF- α , IL-1 β) así como factores de crecimiento que contribuyen al remodelado de los bronquios de pequeño calibre a través de la hipertrofia e hiperplasia de la musculatura lisa bronquial [65]. La liberación de proteasas tipo elastasa, por los neutrófilos, o tipo granzima B, por los linfocitos CD8⁺ presentes en los folículos linfoides, contribuye a la destrucción del parénquima alveolar y a la formación de enfisema [66].

Estos procesos inflamatorios crónicos contribuyen a una serie de cambios estructurales que se conocen como el remodelado de la EPOC, que incluyen: desarrollo de enfisema, aumento de la masa de músculo liso en los bronquios de pequeño calibre, acúmulo de fibroblastos y miofibroblastos, hiperproducción de moco, como consecuencia de una disfunción mucociliar característica de la EPOC [67, 68]...Por lo tanto, podríamos resumir que el remodelado en la EPOC presenta las siguientes características (Tabla 10)

	EPOC
Células de músculo liso	Aumento de la masa de músculo liso bronquial Aumento de la broncoconstricción y limitación al flujo aéreo
Producción de moco	Hiperplasia de las células calciformes Hipertrofia de las glándulas mucosas
Vasos	Remodelado en los vasos pulmonares Aumento de la masa de músculo liso vascular con riesgo de hipertensión pulmonar
Matriz extracelular	Fibrosis de la pared de las vías aéreas
Enfisema	Pérdida de pared alveolar.

TABLA 10 Características del remodelado en la EPOC (información extraída de Gosens R, et al. 2006 [69])

1. Introducción

Por el interés que a la presente tesis doctoral respecta, nos centraremos en las alteraciones fibróticas que forman parte de los cambios estructurales observados en la EPOC, que ocurren en las vías aéreas de pequeño calibre con engrosamiento de sus paredes e infiltración por células inflamatorias [70], proceso conocido como fibrosis peribronquiolar.

Este proceso fibrótico, se caracteriza por la acumulación de fibroblastos y miofibroblastos con la formación de un denso tejido conectivo extracelular producido por dichas células. Esta fibrosis en vías aéreas de pequeño calibre se asocia con la contracción tisular engrosamiento de las paredes de las vías aéreas y la consiguiente limitación de flujo aéreo. Se conoce que citocinas pleiotropicas como TGF- β 1, altamente implicada en procesos de reparación de tejido, juega un papel principal en la patogénesis de la fibrosis peribronquiolar característica de los pacientes EPOC.

1.5.2 TRANSICIÓN FIBROBLASTO – MIOFIBROBLASTO:

Los fibroblastos integran una familia muy heterogénea de células residentes de tejido conectivo cuya función en condiciones normales es la reparación del tejido pulmonar lesionado. Diversos factores pro-fibroticos conducen a una hiperproliferación de fibroblastos, a su activación y consiguiente transformación a miofibroblastos lo cual hace que posean un papel crucial en el remodelado de las vías aéreas.

Los miofibroblastos son células clave en el desarrollo de la fibrosis que se da en el remodelado pulmonar [71]. Estas células presentan características morfológicas y bioquímicas intermedias entre fibroblastos y células de músculo liso y actualmente existen pocos marcadores moleculares específicos para diferenciarlas.

Los miofibroblastos presentan una alta capacidad de proliferación y migración y se localizan en los focos fibróticos. Comparten con las células de músculo liso la presencia de fibras de α -actina de músculo liso (α -SMA), que les confiere un fenotipo contráctil. Además, son células que sintetizan colágeno tipo 1 (COL1A) en grandes cantidades, siendo por ello las principales responsables junto con los fibroblastos de la síntesis y deposición de matriz extracelular, desencadenando alteraciones estructurales características del remodelado [71]. Tanto la presencia de α -SMA

1. Introducción

como la síntesis de COL1A se utilizan como indicador para diferenciar los miofibroblastos de los otros dos tipos celulares.

	Fenotipo Fibroblasto	Fenotipo Miofibroblasto	Fenotipo Célula músculo liso
Proliferación	+++	++++	+
Migración	++	+++	-
Contracción(α -SMA)	-	++++	++++
Secreción de matriz extracelular (COL1A)	+++	++++	+

TABLA 11. Características de los miofibroblastos (Singh SR, et al. 2008 [72]).

Opiniones recientes sugieren que los miofibroblastos poseen al menos tres orígenes posibles. Como se refleja en la figura 2, una posible vía, consistente en la diferenciación de células epiteliales a miofibroblastos mediante un proceso conocido como transición epitelial mesenquimal (TEM). Una segunda vía que sugiere que los miofibroblastos derivan del reclutamiento de fibrocitos circulantes o de otro tipo de células progenitoras que provengan de la médula espinal [73], y una tercera vía en la que se postula que el origen se encuentra en la proliferación y diferenciación de fibroblastos intrapulmonares, bajo la influencia de un ambiente pro-fibrótico [74].

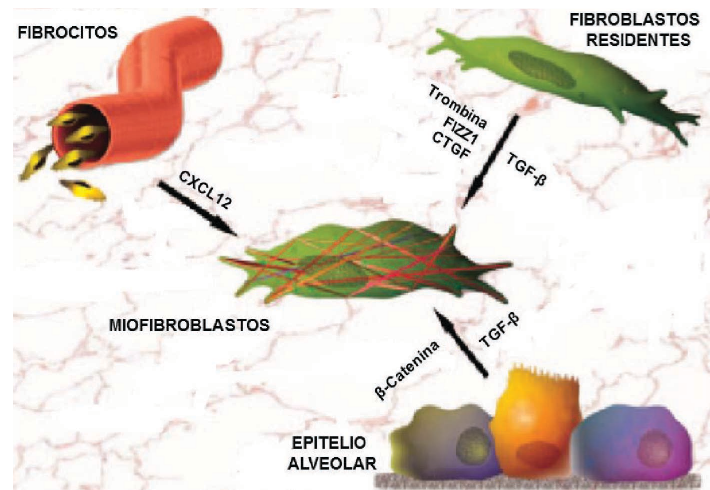


FIGURA 2. Posibles orígenes de los miofibroblastos [71]. Tal y como refleja la figura; los miofibroblastos pueden derivar de la proliferación/diferenciación de fibroblastos residentes en los pulmones, de la transición epitelial-mesenquimal o del reclutamiento de fibrocitos circulantes o de otro tipo de células progenitoras que provengan de la médula espinal.

En esta tesis doctoral, nos centraremos en la tercera de las vías; en la transición fibroblasto miofibroblasto que se da en condiciones inflamatorias. Proceso clave en la instauración de la fibrosis peribronquiolar de pacientes EPOC. Los fibroblastos residentes se activan y transforman en células con fenotipo miofibroblasto con la ya mencionada elevada capacidad contráctil, proliferativa y secretora de matriz extracelular.

Tal y como ilustra la figura 2, TGF- β 1 juega un rol importante en esta transición, es una citoquina multifuncional que controla una variedad de procesos celulares, como: proliferación, diferenciación, apoptosis y producción de matriz extracelular [75]. Sus isoformas desencadenan una serie de cascadas de señalización a través de una variedad de moléculas, como: Smads, miembro A de la familia de genes homólogos a Ras GTPasa (RhoA), fosfatidil inositol 3-quinasa (PI3K) y protein-quinasas activadas por mitógeno (MAPK). En este caso es capaz de inducir la diferenciación de fibroblasto a miofibroblasto, y es el inductor más potente de la producción de matriz extracelular caracterizado hasta la fecha [71]. Además TGF- β 1 es capaz de influir sobre la expresión de Colina acetiltransferasa (ChAT) enzima responsable de la síntesis de Acetilcolina (ACh), activando el sistema colinérgico no neuronal [76].

1.6 PAPEL DEL SISTEMA COLINÉRGICO:

1.6.1 NEUROTRANSMISOR DEL SISTEMA COLINÉRGICO:

La ACh es un neurotransmisor endógeno sintetizado, almacenado y liberado por las terminaciones nerviosas. Es sintetizada por la colin-acetiltransferasa (ChAT), enzima capaz de unir la colina con la acetil-CoA y en menor medida por la carnitin-acetiltransferasa [77]. La ACh se transporta hacia la sinapsis colinérgica mediante el transportador vesicular de ACh (TVACH) y se libera mediante exocitosis. Una vez liberada la ACh actúa sobre los receptores correspondientes y el exceso es degradado por la acetilcolinesterasa (AChE). La colina resultante del proceso de degradación accede de nuevo a la terminación colinérgica a través de los

1. Introducción

transportadores de colina de alta afinidad (TCh1). En la figura se esquematizan los componentes del sistema colinérgico neuronal. [78]

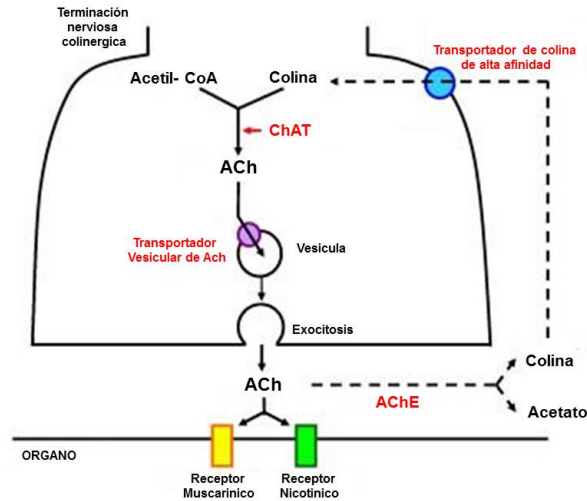


FIGURA3 Componentes del sistema colinérgico neuronal

El hecho de que células implicadas en la fisiología y fisiopatología de las vías aéreas posean estos componentes esenciales del sistema colinérgico, en mayor o en menor medida, sugiere la presencia de un sistema colinérgico no neuronal.

1.6.2. ACCIÓN DEL SISTEMA COLINÉRGICO EN PULMONES:

El sistema nervioso parasimpático desempeña un papel esencial en la regulación del tono bronquial, ya que la principal inervación vegetativa de las vías aéreas en la especie humana es de tipo parasimpático. Las fibras eferentes vagales preganglionares entran en el pulmón a través de los hilos, viajan a lo largo de las vías aéreas y terminan en los ganglios parasimpáticos de las paredes de los bronquios, con predominio en los bronquios grandes y medianos[79, 80]. Las fibras postganglionares cortas van desde estos ganglios a inervar la musculatura lisa de las vías aéreas, las glándulas submucosas y las estructuras vasculares.

Así pues la estimulación del nervio vago en animales produce la liberación de ACh de las terminaciones nerviosas que activan los receptores muscarínicos existentes en el tracto respiratorio produciendo broncoconstricción e hipersecreción

1. Introducción

de moco [80]. Además, la ACh también está involucrada en la regulación de mecanismos crónicos, como son el remodelado de vías aéreas y la modulación del sistema inmune [81].

Existen dos tipos de receptores para la ACh; los nicotínicos y los muscarínicos. Los receptores nicotínicos están concentrados en los ganglios peribonquiales, mientras que los muscarínicos, están altamente distribuidos por los pulmones. Existen 5 subtipos de receptores muscarínicos, de estos 5 sólo 3 (M1, M2 y M3) están presentes en los fibroblastos de las vías aéreas. Los receptores M1 y M3 están acoplados a proteínas Gq y el M2 a proteína Gi. Este último receptor M2, es el receptor predominante en fibroblastos [82], tal y como se ilustra en la tabla 12.

	M1	M2	M3	M4	M5
Cultivo 1º fibroblastos	16±8	100±24	3±1	0	0
MRC-5	0	100±32	42±11	11±7	1±1
IMR-90	0	100±35	2±1	13±2	2±1
HEL299	0	100±26	8±3	4±2	0

TABLA 12. Expresión de R muscarínicos en fibroblastos humanos[65]

La estimulación de dichos receptores muscarínicos induce la proliferación y la secreción de COL1A en fibroblastos de pulmón humano, [14, 23]. Sin embargo, el papel del sistema colinérgico en la transición de fibroblastos a miofibroblastos, así como el mecanismo que subyace a la activación de fibroblastos permanece hoy día sin esclarecer.

1.6.3. ACCIÓN DEL SISTEMA COLINÉRGICO NO NEURONAL EN PULMONES:

Recientes evidencias indican que la producción de ACh en las vías aéreas no queda restringida al sistema parasimpático, sino que podría tener un origen no neuronal [83]. Entre las células capaces de secretar ACh en ausencia de estímulos neuronales se encuentran las células epiteliales bronquiales, los fibroblastos pulmonares, células endoteliales, así como células inflamatorias. Estas células no

1. Introducción

neuronales, son capaces de liberar ACh directamente tras su síntesis intracelular, debido a que todas ellas poseen la enzima intracelular responsable de su síntesis ChAT, canales de liberación de ACh, así como receptores muscarínicos. La disfunción de este sistema colinérgico no neuronal parece estar involucrada en la fisiopatología del asma y la EPOC [69]. En este sentido, los fibroblastos podrían estar afectados por un sistema hasta ahora no relevante en el remodelado de las vías aéreas [78, 84]

Diversas evidencias sugieren que este sistema colinérgico no neuronal ha adquirido un importante papel en la fisiopatología pulmonar, de hecho la disfunción de este sistema se ha definido como un interesante objetivo para el abordaje terapéutico. La activación de este sistema contribuye a incrementar el tono colinérgico en los pulmones y por tanto promueve procesos fisiopatológicos como

1.7 PAPEL DEL HUMO DE TABACO:

El humo de tabaco es el principal factor de riesgo en la EPOC. Como ya se ha destacado en apartados anteriores, la prevalencia, morbilidad y mortalidad de la EPOC es variable alrededor del mundo, pero dichos factores están directamente relacionados con el hábito tabáquico.

1.7.1 HUMO DE TABACO: COMPOSICIÓN QUÍMICA:

Los primeros estudios realizados por Johnstone y Plimmer concluyen que el humo de tabaco contiene alrededor de 600 compuestos diferentes [85]. Posteriormente Stedman amplió el listado hasta 1000 compuestos diferentes [86] y fue en 1980, cuando Ishiguro a Sugawara estableció la composición en 1889 compuestos diferentes. Recientemente, Roberts listó 3794 compuestos como constituyentes del humo de tabaco [87-89] y Green y Rodgman identificaron alrededor de 4800 [90]. Un resumen de los componentes del humo de tabaco queda recogido en la tabla contigua.

1. Introducción

COMPUESTOS IDENTIFICADOS EN TABACO Y HUMO DE TABACO			
Grupos funcionales	Nº comp. en tabaco	Nº comp. en humo de tabaco	Nº comp. en cigarro
Acidos carboxilicos	450	69	140
Aminoacidos	95	18	16
Lactonas	129	135	39
Esteres	529	456	314
Amidas e imidas	205	227	32
Anhidridos	10	10	4
Aldehidos	111	106	48
Carbohidratos	138	30	12
Nitrilos	4	101	4
Ketonas	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-heterociclicas	63	324	46
Pirroles e indoles	9	88	3
Pirazinas	21	55	18
No-aromaticos	13	43	7
Policiclicos aromaticos	1	36	0
Otros	4	50	2
Eteres	53	88	15
Hidrocarburos alifáticos saturados	58	113	44
Hidrocarburos alifáticos insaturados	38	178	10
Monociclicos aromaticos	33	138	25
Policiclicos aromaticos	55	317	35
Pesticidas	28	25	25
Miscelaneos	112	110	19
Inorganicos y metales	105	111	69

TABLA 13. Compuestos identificados en tabaco y humo de tabaco *Tabla modificada de Stedman RL [86].*

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.

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

TABLA 14. Agentes del humo de tabaco causantes de la EPOC

1.7.2 ESPECIES REACTIVAS DE OXIGENO (ERO), EPOC Y ACTIVACIÓN DE FIBROBLASTOS:

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 ($-\text{OH}$) 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.

1. Introducción

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.

El humo de tabaco y en consecuencia las ERO inducen una hipersecreción mucosa en células epiteliales de bronquio humano[92], así como una proliferación de fibroblastos pulmonares[84]. Además, la enzima ChAT, responsable de la producción de ACh, está sobreexpresada en fibroblastos de pulmón de pacientes EPOC, así como en fibroblastos estimulados con humo de tabaco[84]. Sin embargo, no existen datos que evidencien el efecto del humo de tabaco en la transición fibroblasto a miofibroblasto, así como del potencial efecto inhibitorio de los anticolinérgicos.

1.8 TRATAMIENTO DE LA EPOC:

El reconocimiento de la heterogeneidad clínica de la EPOC sugiere un abordaje terapéutico específico. La base del tratamiento farmacológico de la EPOC es la broncodilatación, a la que se añaden diversos fármacos según el fenotipo clínico y la gravedad. La gravedad se evalúa según la obstrucción al flujo aéreo, la disnea y la historia de agudizaciones.

El objetivo del tratamiento farmacológico en la EPOC es prevenir y controlar los síntomas de la enfermedad, para reducir la frecuencia y la gravedad de las exacerbaciones, y mejorar el estado general de salud del paciente y la tolerancia al ejercicio. En conclusión los objetivos generales del tratamiento de la EPOC se resumen en tres:

- reducir los síntomas crónicos de la enfermedad,
- disminuir la frecuencia y gravedad de las agudizaciones.
- mejorar el pronóstico.

Se deben alcanzar tanto los beneficios a corto plazo (control de la enfermedad) como los objetivos a medio y a largo plazo (reducción del riesgo de agudizaciones, caída acelerada de función pulmonar o muerte)[93].

1. Introducción

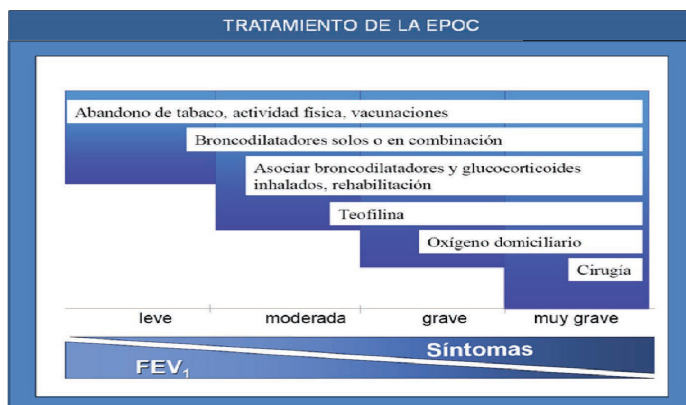


TABLA 15 Tratamiento de la EPOC

1.8.1 BRONCODILATADORES:

Como se ha señalado, la EPOC se caracteriza fundamentalmente por una obstrucción irreversible del flujo aéreo, por lo que los broncodilatadores (beta-agonistas, anticolinérgicos...) constituyen la base del tratamiento farmacológico de esta enfermedad al facilitar dicho flujo aéreo. Suelen mejorar la sintomatología, aunque no siempre producen cambios en los valores espirométricos o estos son de escasa magnitud. Con respecto a la vía de administración, resulta preferible utilizar estos agentes vía inhalatoria, ya que al administrarlos por vía oral los efectos adversos sistémicos aumentan. Los broncodilatadores se pueden administrar a demanda, o bien de forma regular, para evitar o reducir la aparición de síntomas.

1.8.1.1 β -agonistas:

Los β -agonistas producen broncodilatación al relajar directamente la musculatura lisa de las vías respiratorias mediante la estimulación de los receptores β_2 adrenérgicos y el incremento del AMP cíclico intracelular [94]. También originan una disminución de la hiperinsuflación pulmonar (estática y dinámica), lo que podría explicar la existencia de beneficios clínicos en ausencia de variaciones claras del VEF1.

1. Introducción

Los efectos adversos descritos con mayor frecuencia asociados a los agonistas β_2 , han sido: tos, irritación orofaríngea, broncoconstricción, palpitaciones, taquicardia, nerviosismo, temblor, hipopotasemia, náuseas vómitos.

Existen 2 subtipos de agonistas β_2 :

-Los agonistas β_2 de acción larga o LABA (por su nombre en inglés, long-acting beta-agonists) (formoterol, salmeterol, indacaterol) permiten su administración dos veces al día; permiten un mayor control de los síntomas y mejoran tanto la calidad de vida como la función pulmonar y la tolerancia al ejercicio, y además reducen las agudizaciones[95-99].

-Los agonistas β_2 de acción corta o SABA (por su nombre en inglés, short-acting beta-agonists) (fenoterol, salbutamol, terbutalina) fármacos eficaces en el control rápido de los síntomas. Estos fármacos, añadidos al tratamiento de base, son de elección para el tratamiento de los síntomas a demanda, sea cual sea el nivel de gravedad de la enfermedad [100].

Los β -agonistas de acción corta se recomiendan como tratamiento inicial, para disminuir la disnea y facilitar la capacidad para realizar ejercicio físico. Utilizándose los de acción larga para el tratamiento de los pacientes que no responden adecuadamente al tratamiento con β -agonistas de acción corta, o que presentan dos o más exacerbaciones al año.

Para evaluar la eficacia de la terapia broncodilatadora, además de valorar la función pulmonar, hay que tener en cuenta otros parámetros, como: la mejoría sintomatológica, la posibilidad de poder llevar una vida activa y de realizar ejercicio físico, y, la rapidez de la desaparición de los síntomas tras el tratamiento. La elección del broncodilatador dependerá de la respuesta clínica individual, de los efectos adversos que origine en cada paciente, de las preferencias individuales y de la relación coste/eficacia [94].

1.8.1.2 Anticolinérgicos:

La actividad parasimpática está incrementada en las vías aéreas de pacientes EPOC, base del empleo de terapias anticolinérgicas [101]. Los agentes

1. Introducción

anticolinérgicos producen broncodilatación al reducir la contracción de la musculatura lisa, antagonizando el tono colinérgico endógeno [94]. Presentan un efecto broncodilatador comparable, o incluso superior al observado con los agonistas β_2 de acción corta, con mayor margen de seguridad. Cuando se utilizan conjuntamente con los agonistas β_2 se observa un efecto broncodilatador aditivo.

Los anticolinérgicos son una serie de sustancias, naturales o de síntesis que inhiben los efectos de la ACh sobre el sistema nervioso central y periférico. Son inhibidores reversibles de los dos tipos de receptores colinérgicos: los muscarínicos y los nicotínicos, siendo la mayor parte de los anticolinérgicos que actúan sobre las vías respiratorias, antagonistas de los receptores muscarínicos.

En condiciones fisiológicas existe actividad tónica basal en la musculatura bronquial que depende del tono colinérgico. La broncoconstricción producida por esta estimulación vagal cumple una función fisiológica ya que el aumento del tono de las vías aéreas ayuda a prevenir el colapso de aquellas vías aéreas que no tienen cartílago y mejora el tono de las vías cartilaginosas. Aunque la broncoconstricción produce obstrucción de la vía aérea, es necesario un pequeño aumento del tono del músculo para mantener las vías aéreas permeables, especialmente para evitar que se colapsen durante la espiración.

No obstante, un tono vagal excesivo es responsable de la obstrucción de la vía aérea tal y como se observa en pacientes asmáticos y con EPOC [102]. Los anticolinérgicos constituyen una terapia broncodilatadora particularmente importante en la EPOC y en ciertas formas de asma [103]. Además, muestran un potencial efecto anti-inflamatorio y anti-remodelado en modelos animales, valor añadido a sus clásicos efectos broncodilatadores.

Existen 2 subtipos de anticolinérgicos:

-Los antagonistas colinérgicos de acción larga o LAMA (por su nombre en inglés, long-acting muscarinic antagonist) (bromuro de tiotropio).

-Los antagonistas colinérgicos de acción corta o SAMA (por su nombre en inglés, short-acting muscarinic antagonist) (bromuro de ipratropio).

Dentro del primer subtipo de antagonistas colinérgicos se encuentra Bromuro de aclidinio (ACL), que es el fármaco cuyo efecto se estudia en el desarrollo de esta tesis doctoral. Es un nuevo antagonista muscarínico de acción prolongada de la farmacéutica Almirall S.A, recientemente aprobado por la Comisión Europea para su comercialización bajo el nombre de Eklira/Bretaris Genuair® (322µg de aclidinio dos veces al día) en todos los estados miembros de la UE, además de Islandia y Noruega, como tratamiento broncodilatador de mantenimiento para el alivio de los síntomas de la EPOC, tras la opinión positiva recibida del Comité para Medicamentos de Uso Humano (CHMP) aprobado por la FDA en Mayo de 2012 (en EEUU en Julio de 2012).

1.8.1.3 Metilxantinas:

Las metilxantinas son fármacos broncodilatadores débiles pero que presentan efectos aditivos a los broncodilatadores habituales. Se ha descrito un efecto positivo de estos fármacos 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 [104]. En cualquier caso, su limitada eficacia clínica y su estrecho margen terapéutico las relega a ser tratamientos de segunda línea, principalmente en pacientes EPOC graves [105]. Aunque cabe destacar que los preparados de teofilina y sus derivados se han utilizado durante muchos años en el tratamiento de la EPOC.

Actúan relajando la musculatura lisa de las vías aéreas; si bien, su mecanismo de acción no se conoce por completo. En el tratamiento de la EPOC estable, la teofilina no parece ofrecer ventajas frente a los broncodilatadores en inhalación, al ser su efecto broncodilatador ligero, sus efectos adversos graves y originar interacciones con diversos medicamentos.

Su administración debería reservarse para pacientes que no responden al tratamiento con broncodilatadores de acción corta o larga; o a los que no se les

1. Introducción

pueda administrar fármacos en inhalación. En los pacientes que utilicen estos fármacos se precisa controlar su potencial toxicidad y las interacciones, especialmente en personas mayores que pueden presentar cambios farmacocinéticos.

1.8.2 GLUCOCORTICOIDES:

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[106]

El uso de corticoesteroides 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 corticoesteroides 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.

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

En pacientes con EPOC avanzada, los corticoesteroides 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 corticoesteroides 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.

1.8.3 INHIBIDORES DE FOSFODIESTERASA 4 (IPD4):

Los inhibidores de fosfodiesterasa 4 (IPD4) son fármacos con actividad antiinflamatoria que reducen la inflamación mediante la inhibición selectiva de la fosfodiesterasa 4 y la consiguiente inhibición de la degradación de adenosin monofosfato cíclico (AMPc). Han demostrado prevenir las agudizaciones en pacientes con EPOC grave que presentan tos y expectoración crónica y además sufren agudizaciones frecuentes[105, 107]. Este efecto se mantiene cuando se añade IPD4 al tratamiento de mantenimiento con un broncodilatador de larga duración, ya sea LABA o LAMA.

Un IPD4 es el Roflumilast, que aunque no posee actividad broncodilatadora *per se*, ha mostrado que mejora el VEF1 en pacientes tratados con LABA o LAMA[108]

1.8.4. OTROS TRATAMIENTOS FARMACOLÓGICOS:

1.8.4.1 Vacunas:

La vacunación puede reducir de manera significativa la morbimortalidad en pacientes EPOC en un 50%[109, 110] y es altamente recomendable en pacientes EPOC de avanzada edad[111]. 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% [112].

La vacuna para influenza virus también se ha asociado a una reducción en el riesgo de mortalidad de pacientes EPOC [113].

1.8.4.2 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

1. Introducción

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[114]. 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.

1.8.4.3 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[115].

1.8.4.4 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 [116, 117].

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 [118]. 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.

1.8.4.5 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 [119].

1.8.4.6 Antitusivos

La tos aunque es un molesto síntoma en los pacientes EPOC, posee un papel protector significativo [120]. Por ello, el uso regular de antitusivos en pacientes EPOC no está recomendado.

1.8.5 ASOCIACIONES:

Las asociaciones farmacológicas pueden ofrecer mejoras a los pacientes EPOC. El abordaje terapéutico por diferentes mecanismos nos permite tratar la enfermedad con mayor tasa de beneficios. Entre los distintos tipos de asociaciones recomendadas, se encuentran:

- 1) agonistas β_2 + anticolinérgicos (agonistas β_2 de acción corta (salbutamol) + anticolinérgicos (bromuro de ipratropio))
- 2) agonistas β_2 + teofilina
- 3) anticolinérgicos + teofilina
- 4) agonistas β_2 + corticoesteroides inhalados (formoterol + budesonida o salmeterol + fluticasona)



2. Hipótesis y Objetivos:

2.1 HIPÓTESIS:

La transición de fibroblastos a miofibroblastos es un proceso que participa en la fibrosis peribronquiolar de los pacientes EPOC. En condiciones inflamatorias, los fibroblastos residentes se activan y transforman en miofibroblastos células con fenotipo contráctil, proliferativo y con actividad secretora de matriz extracelular, la acumulación de miofibroblastos contribuye a la progresión del remodelado pulmonar, y a la limitación del flujo aéreo propio de los pacientes EPOC. Promoviendo la evolución de la enfermedad y un peor pronóstico.

El uso de un fármaco anticolinérgico podría revertir la activación de los fibroblastos pulmonares así como su transformación a miofibroblastos por lo que su uso podría enlentecer aquellos procesos fibróticos característicos del remodelado pulmonar observados en la EPOC.

En la presente tesis doctoral se estudian las diversas vías que podrían estar implicadas en la activación de fibroblastos pulmonares y el efecto de un tratamiento anticolinérgico. A continuación se esquematizan las posibles vías dividiéndolas según el tipo de estímulo empleado para inducir la transición.

•ESTUDIO 1: Activación colinérgica y colinérgica no neuronal:

El sistema parasimpático está incrementado en pacientes EPOC, si en condiciones *in vitro* empleamos un agonista colinérgico podemos simular las condiciones fisiopatológicas. En este caso, evidenciaremos el efecto del fármaco objeto de estudio, tras inducir la transición con una agonista colinérgico como es el Carbacol (Cch).

La estimulación con CCh del receptor muscarínico M2 (M2) activa la ruta de las quinasas regulada por señales extracelulares (ERK1/2) y provoca depleción de los niveles de AMPc, provocando ambas vías un incremento de los niveles de α -SMA, COL1A y TGF- β 1.

2. Hipótesis y objetivos

La activación de los receptores muscarínicos M1 y M3 (M1 y M3) por CCh activa la ruta de Miembro A de la familia de genes homólogos a Ras GTPasa (RhoA) provocando igual resultado a nivel de marcadores celulares.

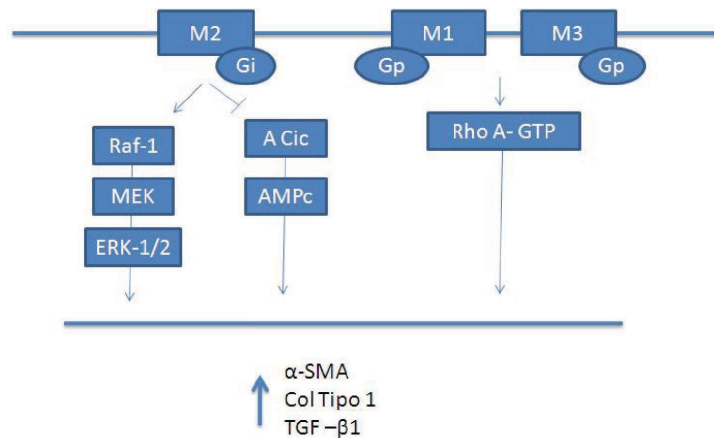


FIGURA 4. Hipótesis estudio 1: Posibles vías de señalización implicadas en la activación de fibroblastos tras estimulación colinérgica.

En paralelo; recientes evidencias proponen que, la liberación de ACh no queda restringida al sistema colinérgico neuronal; diversos tipos celulares de las vías aéreas, no neuronales, pueden liberar ACh. La disfunción de este sistema colinérgico no neuronal, puede contribuir a fisiopatología de la EPOC [69]. Activaremos esta vía mediante TGF-β1 y evidenciaremos el efecto del fármaco objeto de estudio.

La estimulación con TGF-β1 activa la ruta específica de los SMADS con el consiguiente incremento de los niveles de α-SMA, COL1A y de ChAT; el incremento de esta enzima implica la liberación de ACh que actúa sobre los receptores M activando la vía explicada en el ruta 1

2. Hipótesis y objetivos

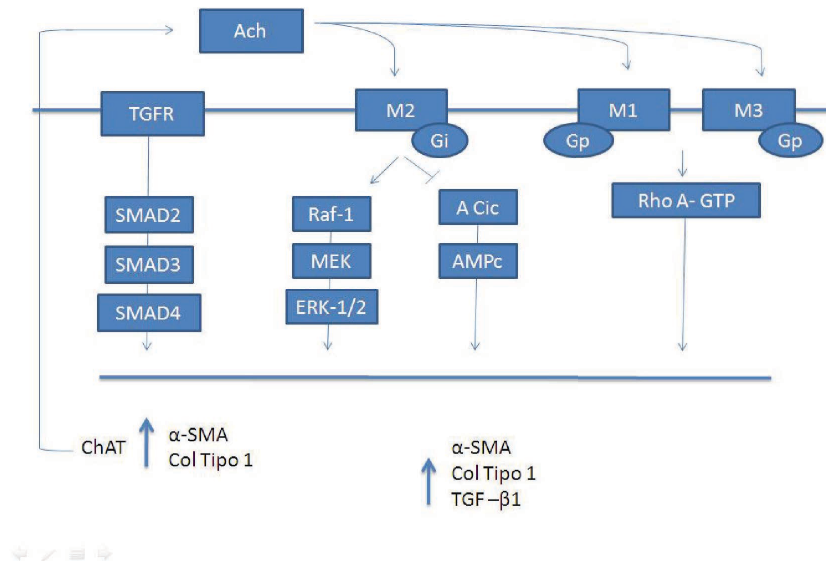


FIGURA 5. Hipótesis estudio 1: Posibles vías de señalización implicadas en la activación de fibroblastos tras estimulación con TGF-β1; activación del sistema colinérgico no neuronal.

•ESTUDIO 2: Activación oxidativa

El humo de tabaco es el principal factor de riesgo de la EPOC y contribuye a los cambios estructurales de las vías aéreas que dan lugar a una evolución de la patología. Se sabe, que el tratamiento anticolinérgico, inhibe la proliferación de fibroblastos pulmonares tras la inducción con EHT[84]; y también que la enzima ChAT está sobreexpresada en fibroblastos de pacientes EPOC así como en fibroblastos estimulados con EHT.

2. Hipótesis y objetivos

No existen datos sobre el papel que ejerce el EHT en la activación de fibroblastos, así como el potencial efecto inhibitorio del tratamiento anticolinérgico. Estimaremos los fibroblastos con EHT y evidenciaremos el efecto del fármaco objeto de estudio.

La estimulación con EHT activa la NADPH oxidasa con el consiguiente incremento de los niveles de ChAT por un lado y de ERO intracelulares; las ERO activan la ruta de ERK1/2 provocando un incremento de los niveles de α -SMA, COL1A y TGF- β 1

La sobreexpresión de ChAT implica la liberación de Ach que actúa sobre los receptores M activando la vía explicada en el ruta 1

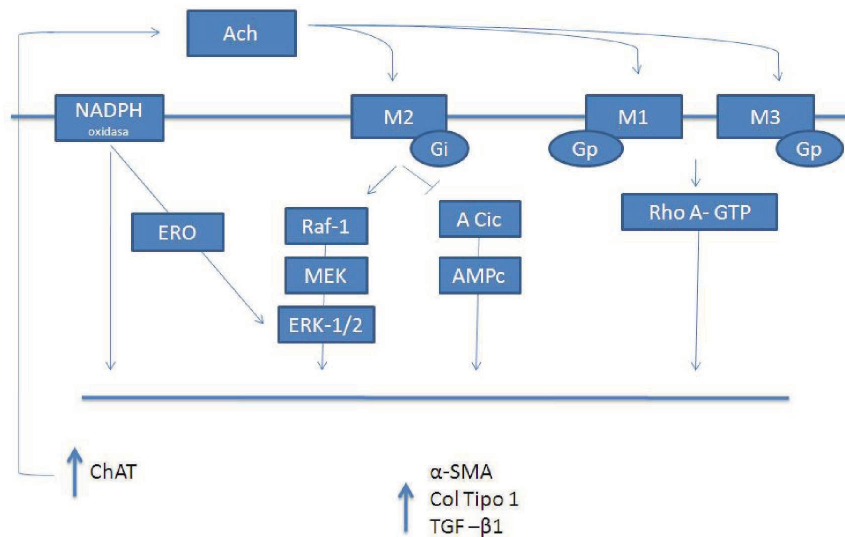


FIGURA 6. Hipótesis estudio 2: Posible vías de señalización implicadas en la activación de fibroblastos tras estimulación con EHT

2.2 OBJETIVOS:

Los objetivos del presente estudio son:

- 1) Estudiar el efecto de ACL en la regulación de la transición fibroblasto miofibroblasto inducida por CCh, así como los mecanismos implicados en este proceso.
- 2) Estudiar la relación del sistema colinérgico no neuronal y el sistema del TGF- β 1 en la formación y la progresión de miofibroblastos así como el papel inhibitorio de ACL.
- 3) Estudiar el efecto de ACL en la regulación de la transición fibroblasto miofibroblasto inducida por EHT, así como los mecanismos implicados en este proceso.



3. Material y Métodos:

3.1 AISLAMIENTO Y CULTIVO DE FIBROBLASTOS DE BRONQUIO HUMANO:

Con la finalidad de obtener el cultivo de fibroblastos de bronquio humano, se partió de un fragmento de bronquio obtenido por disección tras lobulectomía parcial o total por carcinoma de pulmón. Para ello, se obtuvo el consentimiento informado del paciente con previa aprobación del proyecto por el Comité Ético de Investigación clínica (CEIC) del Hospital General Universitario de Valencia.

Se sabe que la limitación del flujo aéreo en pacientes EPOC ocurre en vías aéreas distales, que son las vías no cartilagosas con un diámetro interno <2 mm. En este trabajo los fibroblastos se obtuvieron de bronquios pequeños de aproximadamente 2 mm, los cuales, fueron representativos de la zona pulmonar donde tiene lugar la fibrosis peribronquiolar [121].

El fragmento de bronquio obtenido se lavó con medio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Lonza, catalogo nºBE12-604F) con antibióticos. Tras la limpieza del fragmento, éste se cortó longitudinalmente en pequeñas porciones y se trató con pronasa (1 mg/mL; Calbiochem®, Novabiochem®, San Diego, CA, USA) a 37°C durante 30 min. El extracto celular obtenido se colocó en placas de cultivo de 6 pocillos y se incubó a 37°C con 5% de CO₂ con medio DMEM; suplementado con suero bobino fetal al 10% (Lonza, catalogo nº. DE14-801F), penicilina/estreptomicina (100 U/mL; Lonza, catalogo nºDE17-602E) y Anfoteracina B (2,5U/mL; Lonza, catalogo nº17-836E). Tras aproximadamente 2 semanas, se obtuvo una confluencia adecuada para proceder al primer pase celular mediante tripsinización estándar. Las células empleadas en este estudio fueron cultivos primarios de 3 – 10 pases.

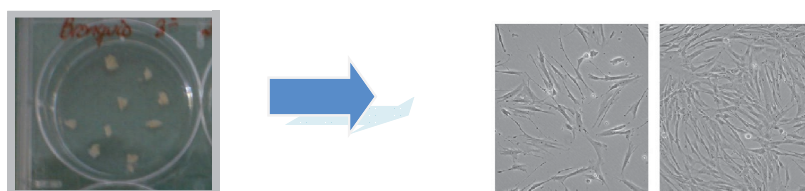


FIGURA 7. Aislamiento y cultivo de fibroblastos de bronquio humano

3. Material y Metodos

3.2 DISEÑO EXPERIMENTAL:

3.2.1 ESTUDIO 1:

3.2.1.1 Estudios preliminares:

Se determinó el tiempo y dosis óptimo de incubación del agonista colinérgico, para ello se realizó una curva de dosis y tiempos de incubación (CCh; 100nM-100µM 24-72h); determinando en cada caso la expresión a nivel proteico y a nivel de ARNm de α -SMA y COL1A mediante Western blott y RT-PCR cuantitativa a tiempo real.

3.2.1.2 Protocolo experimental:

Se utilizó; ACL, acetilcolinesterasa humana (10 U/mL; AChE; Sigma-Aldrich: catalogo n°. C1682), N6, 2'-O-Dibutiriladenosina 3',5'-cíclica monofosfato (1 mM; dbcAMP; Sigma-Aldrich: catalogo n°. D0260) como análogo sintético del adenosín monofosfato cíclico (AMPc), PD98050 (10 µM; Sigma-Aldrich: catalogo n°. P215) como inhibidor de ERK1/2, Y27632 (10 µM; Sigma-Aldrich: catalogo n°. Y0503) como inhibidor de Rho quinasa, pirenzepina (Antagonista M1, 1 µM; Sigma-Aldrich: catalogo n°. P7412), methoctramina (Antagonista M2, 1 µM; Sigma-Aldrich: catalogo n°. M105) y p-fluoro-hexahydro siladifenidol (pFHHSid) (Antagonista M3, 1 µM; Sigma-Aldrich: catalogo n°. H127). Monoclonal anti-TGF- β 1 humano mAb (4 µg/mL; anti-TGF- β 1; R&D Systems, Madrid, España; catalogo n°. AB-246-NA) se empleó para bloquear la forma activa de TGF- β 1 en sobrenadantes, como se referencia en la bibliografía[122].

Los fibroblastos de bronquio humano fueron estimulados con CCh (Sigma-Aldrich: catalogo n°. C4382) el cual fue seleccionado como agonista colinérgico ya que es el más empleado en la literatura y además es resistente a la degradación por colinesterasas presentes en fibroblastos pulmonares humanos [64]. La concentración empleada fue de 10^{-5} M; dicha concentración está cerca de producir la máxima respuesta, según estudios de cultivo celular de fibroblastos de pulmón humano que emplean dicho agonista [72, 101] y según estudios preliminares. El otro estímulo empleado fue el factor de crecimiento TGF- β 1 (2 ng/mL; Sigma-Aldrich: catalogo n°. T7039).

3. Material y Metodos

Las células se pre-incubaron 30 minutos con los fármacos y posteriormente, se expusieron a los estímulos y fármacos durante 48 horas a 37°C y 5% CO₂, cambiando medio y estímulos a las 24 horas. Las monocapas celulares fueron privadas del suero bobino fetal, 24 horas antes de la estimulación. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se extrajeron las muestras correspondientes para realizar las pruebas bioquímicas y moleculares programadas. Las condiciones experimentales se indican en la tabla.

Condiciones		ARN	Prot	IF	Prolif y Mig	ELISA		
						Ach (TGF)	AMPc (CCh)	TGFβ1 (CCh)
Curva Tiempo- Respuesta CCh (n=3)	Control	X	X					
	CCh 10 ⁻⁵ M 24h	X	X					
	CCh 10 ⁻⁵ M 48h	X	X					
	CCh 10 ⁻⁵ M 72h	X	X					
Curva Concentra- ción- Respuesta CCh(n=3)	Control	X	X					
	CCh 10 ⁻⁸ M	X	X					
	CCh 10 ⁻⁷ M	X	X					
	CCh 10 ⁻⁶ M	X	X					
	CCh 10 ⁻⁵ M	X	X					
Estímulos + Bromuro de aclidinio	Control	X	X		X	X	X	
	CCh 10 ⁻⁵ M o TGFβ1 2ng/mL	X	X		X	X	X	
	Estimulo + Acl 10 ⁻⁹ M	X	X		X	X	X	
	Estimulo + Acl 10 ⁻⁸ M	X	X		X	X	X	
	Estimulo + Acl 10 ⁻⁷ M	X	X		X	X	X	
Estímulos + fármacos	Control	X	X	X	X			X
	CCh 10 ⁻⁵ M o TGFβ1 2ng/mL	X	X	X	X			X
	Estimulo + Acl 10 ⁻⁷ M	X	X	X	X			X
	Estimulo + Y27632 10μM	X	X		X			X
	Estimulo +dbcAMP 1mM	X	X		X			X
	Estimulo +PD98059 10μM	X	X		X			X
	Estimulo + anti TGFβ1 4 μg/mL	X	X					
	Estimulo + IgG	X	X					

3. Material y Metodos

Condiciones		ARN	Prot	IF	ELISA		
					Ach (TGF)	AMPc (CCh)	TGFβ1 (CCh)
TGFβ1 2ng/mL + AChE 10U/mL	Control		X				
	TGFβ1 2ng/mL		X				
	TGFβ1 2ng/mL + AChE 10U/mL		X				
	AChE 10U/mL		X				
Estímulos + antagonistas M1,M2, M3	Control		X				
	CCh 10-5M o TGFβ1 2ng/mL		X				
	Estimulo + pirenzepina 1μM		X				
	Estimulo + methoctramina 1μM		X				
	Estimulo + pFHHSid 1μM		X				
CCh 10 ⁻⁵ M + siARN M1,M2,M3	Control		X				
	CCh 10-5M		X				
	siARN M1 + CCh 10 ⁻⁵ M		X				
	siARN M2 + CCh 10 ⁻⁵ M		X				
	siARN M3+ CCh 10 ⁻⁵ M		X				

TABLA 16. Condiciones experimentales estudio 1. Definición de abreviaturas: ARN =Estudios de expresión génica; Prot= Estudios de expresión proteica; IF=Estudios de Inmunofluorescencia; Prolif y Mig= Estudios de proliferación y migración

3.2.2 ESTUDIO 2:

3.2.2.1 Obtención del extracto de humo de tabaco.

El extracto de humo de tabaco (EHT), utilizado como estímulo para los experimentos, se obtuvo siguiendo el procedimiento que se describe a continuación, que ha sido utilizado previamente para estudiar los efectos del humo de tabaco en distintos tipos de cultivos celulares [123].

El EHT se obtuvo a partir de cigarrillos de investigación (2R4F; Tobacco Health Research, Universidad de Kentucky, KY, EEUU). 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 de volumen de cámara en el respirador).

3. Material y Metodos



FIGURA 8. Bomba de respiración de animales utilizada para generar el extracto de humo de tabaco (EHT).

El humo de tres cigarrillos, generado mediante este procedimiento, se burbujeó en un frasco con 25 mL de medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) precalentado a 37°C. El EHT generado se filtró con un filtro de acetato de celulosa de 0.22 μm (Corning, NY, EEUU). 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.

La normalización y calidad de la solución de EHT se comprobó mediante medida de absorbancia a 320 nm, que es la longitud de onda específica de absorción del peroxinitrito contenido en el EHT. Las soluciones de EHT madre presentaron una absorción de 3.0 ± 0.1 . Se trataron las células con concentraciones crecientes de EHT (hasta 20%) durante 24, 48 y 72 horas. No se observaron diferencias significativas en los niveles de lactato deshidrogenasa del sobrenadante en comparación con el grupo control.

3.2.2.2 Estudios preliminares:

Se determinó el tiempo y dosis óptimo de incubación del EHT, para ello se realizó una curva de dosis y tiempos de incubación (EHT 1%, 2,5%, 5% y 10% 24-72h); determinando en cada caso la expresión a nivel proteico y a nivel de ARNm de α -SMA y COL1A mediante Western blott y RT-PCR cuantitativa a tiempo real.

3.2.2.3 Protocolo experimental:

Se utilizó; ACL, acetilcolinesterasa humana (10 U/mL; AChE; Sigma-Aldrich: catalogo nº. C1682), N6 2'-O-Dibutiriladenosina 3',5'-cíclica monofosfato (1 mM; dbcAMP; Sigma-Aldrich: catalogo nº. D0260) como análogo sintético del AMPc, PD98050 (10 μM ; Sigma-Aldrich: catalogo nº. P215) como inhibidor de ERK1/2, N-acetil-L-cisteína (1mM NAC, Sigma-Aldrich A7250) como antioxidante y apocinina (100 μM ; APO, SAFC, W508454) como inhibidor de la NADPH oxidasa.

3. Material y Metodos

Los fibroblastos de bronquio humano fueron estimulados con EHT 2,5%. Las células se pre-incubaron 30 minutos con los fármacos y posteriormente, se expusieron al estímulo y fármacos durante 24 horas a 37°C y 5% CO₂. Las monocapas celulares fueron privadas del suero bobino fetal, 24 horas antes de la estimulación. Las condiciones experimentales se indican en la tabla contigua.

Condiciones		ARN	Prot	DCF	ELISA	
					Ach	AMPc
Curva Tiempo-Respuesta EHT (n=3)	Control	X	X			
	EHT 2,5% 24h	X	X			
	EHT 2,5% 48h	X	X			
	EHT 2,5% 72h	X	X			
Curva Concentración-Respuesta CCh(n=3)	Control	X	X			
	EHT 1%	X	X			
	EHT 2,5%	X	X			
	EHT 5%	X	X			
Estímulo + Bromuro de acilidinio	Control	X	X		X	X
	EHT 2,5%	X	X		X	X
	EHT 2,5% + Acl 10 ⁻⁹ M	X	X		X	X
	EHT 2,5% + Acl 10 ⁻⁸ M	X	X		X	X
	EHT 2,5% + Acl 10 ⁻⁷ M	X	X		X	X
Estímulo + fármacos	Control		X	X		
	EHT 2,5%		X	X		
	EHT 2,5% + Acl 10 ⁻⁹ M		X	X		
	EHT 2,5% + Acl 10 ⁻⁸ M		X	X		
	EHT 2,5% + Acl 10 ⁻⁷ M		X	X		
	EHT 2,5% + Apo 100µM		X	X		
	EHT 2,5% + NAC 1mM		X	X		
	EHT 2,5% + dbcAMP 1mM		X	X		
	EHT 2,5% + AchE 10U/mL		X			
EHT 2,5% + PD98059 10µM		X				
Estímulo + siARN M1,M2,M3	Control		X			
	EHT 2,5%		X			
	siARN M1 + EHT 2,5%		X			
	siARN M2 + EHT 2,5%		X			
	siARN M3+ EHT 2,5%		X			

TABLA 17. Condiciones experimentales estudio 2. Definición de abreviaturas: ARN =Estudios de expresión génica; Prot= Estudios de expresión proteica; DCF=Estudios de la producción de ERO intracelular.

3.3. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE REAL TIME-PCR:

3.3.1 EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL Y CUANTIFICACIÓN:

Una vez transcurrido el tiempo de estimulación, se lisaron las células con buffer de lisis Nucleic Acid Purification Lysis Solution (Applied Biosystems, Darmstadt, Alemania). El ácido ribonucleico (ARN) total se aisló mediante el sistema ABI Prism™ 6100 Nucleic Acid Prep Station (Applied Biosystems, Darmstadt, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se extrajo y se purificó el ARN utilizando este método de extracción automático.

A continuación se determinó la concentración del mismo, mediante el espectrofotómetro NanoDrop 2000C (ThermoScientific) siguiendo las instrucciones del fabricante. Este sistema permitió determinar la concentración del ARN total mediante medidas de absorbancia a 260 y 280 nm a partir del espectro de absorción de las muestras. Se obtuvo el valor de la concentración (ng/μL) y el valor de la pureza de las muestras. El ARN extraído se almacenó a -80°C hasta su utilización.

3.3.2 RETROTRANSCRIPCIÓN INVERSA (RT):

En la retrotranscripción inversa, la enzima retrotranscriptasa inversa sintetiza ácido desoxiribonucleico (ADN) complementario (ADNc) a 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 Taq Man Reverse Transcription Reagents Kit (Applied Biosystems, Perkin-Elmer Corporation, CA, EEUU) en un volumen final de 15 μL. Se realizó este proceso en un termociclador 9800 Fast Thermal Cycler (Applied Biosystems) con los siguientes pasos: incubación durante 10 minutos a 25°C, ciclo de 30 minutos a 48°C e inactivación de la enzima, durante 5 minutos a 95°C. El ADNc sintetizado se almacenó a -20°C hasta su utilización.

3. Material y Metodos

3.3.3 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 y 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 en 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. Se utilizaron oligonucleótidos y sondas específicas marcadas con fluorocromos Ensayos de Expresión Génica TaqMan® (Applied Biosystems). Los oligonucleótidos utilizados se indican en la Tabla 18.

Cada reacción de PCR contenía 1 μL de ADNc sintetizado en la transcripción inversa, 5 μL de FluoCycle™ Mix (Applied Biosystems) para oligonucleótidos Taqman, 0,5 μL de la sonda correspondiente y la cantidad necesaria de agua dietilpirocarbonato (DEPC, Applied Biosystems) para alcanzar un volumen final de 10 μL . La PCR se desarrolló en un termociclador ABI Prism 7900 Sequence Detection System® (Applied Biosystems) con las siguientes condiciones: un paso inicial de 2 minutos a 0°C, 1 ciclo de 10 minutos a 95°C y 40 ciclos de 15 segundos a 95°C seguidos de 1 minuto a 60°C.

3. Material y Metodos

Tipo de oligonucleótido		Gen	Símbolo	Referencia
Oligonucleótidos y sondas Taqman (Applied Biosystems)	Control interno	Glyceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa humano	GAPDH	4310884E
	Genes a estudio	α -Actina de musculo liso	α -SMA	Hs00559403_m1
		Colágeno tipo I	COL1A1	Hs00164004_m1
		Factor de crecimiento transformante β 1	TGF- β 1	Hs00171257_m1
		Receptor Colinérgico Muscarínico 1	M1	Hs00912795_m1
		Receptor Colinérgico Muscarínico 2	M2	Hs00265208_s1,
		Receptor Colinérgico Muscarínico 3	M3	Hs00327458_m1
		NADPH oxidasa 1	NOX1	Hs00246589_m1
		NADPH oxidasa 4	NOX4	Hs00418356_m1
		Subunidad p47 de la NADPH	P47 phox	Hs00417167_m1
Subunidad p67 de la NADPH	P67 phox	Hs01084940_m1		

TABLA 18. Oligonucleótidos utilizados en la RT-PCR.

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 GAPDH como control endógeno y normalizando los resultados al grupo control.

En este método se utiliza la siguiente ecuación: $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct1 - \Delta Ct2$. Siendo:

$$\Delta Ct1 = (Ct \text{ gen problema} - Ct \text{ gen referencia}) \text{ de la muestra 1}$$

$$\Delta Ct2 = (Ct \text{ gen problema} - Ct \text{ gen referencia}) \text{ de la muestra 2}$$

3. Material y Metodos

Para que la determinación a través de esta fórmula aritmética sea válida, debe cumplirse que la eficiencia de la reacción para el gen problema y para el gen de referencia sea aproximadamente igual. El proveedor de las sondas utilizadas en los experimentos garantiza que la eficiencia en las reacciones es de 1.

Se estudió cada muestra por duplicado, se corrigieron los valores frente al gen referencia y se normalizaron frente al grupo control. Se calculó el valor $2^{-\Delta\Delta Ct}$ de los distintos grupos y se representó junto al grupo control, cuyo valor de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ es igual a 1. El valor $2^{-\Delta\Delta Ct}$ equivale a la expresión relativa de ARNm de un determinado gen.

3.4 ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN PROTEICA MEDIANTE WESTERN BLOTT:

Una vez transcurrido el tiempo de estimulación de los fibroblastos, sembrados en frascos de 25cm², se lisaron las células mediante la adición del buffer de lisis Buffer C, cuya composición es la siguiente: Ácido N-2-hidroxietilpiperacina-N'-2'-etanesulfónico (HEPES, Sigma-Aldrich) 1 M, cloruro sódico (NaCl, Panreac) 4M, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA, Panreac) 0,5M, ácido tetra acético-etilenglicol (EGTA, Sigma-Aldrich) 0,1M, glicerol 99,5% y agua milli-Q (Millipore).

La concentración de proteínas se determinó mediante BCA Protein Assay Kit (Pierce Chemical Co, Rockford IL, USA). Se cargó un total de 10 µg de proteína desnaturalizada, por muestra, en un gel de poliacrilamida y SDS (SDS/PAGE), junto con un marcador de pesos moleculares, Amersham High-Range Rainbow Molecular Weight Markers (Amersham GE Healthcare, Reino Unido). Al gel, formado por un gel de concentración (5% de acrilamida) y un gel de resolución de 10% de acrilamida (para una separación de 21-100 KDa) y de 7.5% de acrilamida (para una separación de 100-200 kDa), se le aplicó un voltaje de 100V durante 1h y 30 minutos aproximadamente. Las proteínas se separaron de acuerdo con su peso molecular.

Posteriormente se transfirieron las proteínas a una membrana de nitrocelulosa Amersham Hybond ECL Nitrocellulose Membrane (Amersham GE Healthcare)

3. Material y Metodos

mediante transferencia semi-húmeda. Se bloqueó la membrana con suero de albúmina bovina (BSA, Sigma-Aldrich) en solución salina tamponada con fosfato (PBS, Sigma-Aldrich) con 0,1% de TWEEN®20 (Sigma-Aldrich) durante 3 horas. Transcurrido el bloqueo, se incubó la membrana con el anticuerpo primario correspondiente 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. Tras los lavados, se utilizó ECL Plus (Amersham GE Healthcare), siguiendo las instrucciones del fabricante, para la detección de las proteínas. La densitometría de las bandas fue realizada empleando el software Imaje J 1.42 (disponible en <http://rsb.info.nih.gov/ij> USA). Los anticuerpos primarios y secundarios utilizados se indican en la Tabla 19

Anticuerpo primario				Anticuerpo secundario		
Nombre	Referencia	PM	Dilución	Nombre	Referencia	Dilución
α-SMA	A-5228 Sigma-Aldrich	42kD	1:1000	anti-Mouse conjugado a HRP	SA1-100 Thermo- Scientific	1:1000
β-Actina	A-5441 Sigma-Aldrich	42kD	1:1000			
ChAT	AB143 Millipore	65 kD	1:1000	anti-Rabbit conjugado a HRP	SA1-200 Thermo- Scientific	1:1000
COL1A	PA1-26204 Affiniti Bio Reagents	138 kD	1:1000			
ERK1/2	4695 Cell Signalling	42-44 kD	1:1000			
M1	Sc-9106 Santa Cruz Biotech.	52 kD	1:1000			
M2	Sc-9107 Santa Cruz Biotech.	70 kD	1:1000			
M3	Sc-9108 Santa Cruz Biotech.	75 kD	1:1000			
Nox4	NB110-58849 Novus Biologicals	67 kD	1:1000			
p-ERK1/2	4376S Cell Signalling	42-44 kD	1:1000			
P67phox	HPA002327 Sigma-Aldrich	67 kD	1:1000			
TGF-β1	56E4 Cell Signaling	40;60 kD	1:1000			

TABLA 19. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados para Western Blott.

Los resultados se expresan siempre referenciados al control endógeno β-actina y en el caso de proteínas fosforiladas como es el caso de p-ERK1/2 a la proteína total ERK1/2.

3. Material y Metodos

La expresión proteica de RhoA-GTP fue determinada mediante un kit comercial para el estudio de la activación de RhoA IP/WB (NewEast Bioscience, Malvern, PA, USA; catalogo n°. 80601) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

3.5 TRANSFECCIÓN CON ARN DE INTERFERENCIA:

Se silenciaron los receptores colinérgicos muscarínicos M1, M2 y M3 mediante transfección con ARN de interferencia (siARN) [92, 124]. El siARN, fue diseñado y distribuido por Ambion (Huntingdon, Cambridge, UK). El agente de transfección empleado fue lipofectamina-2000 (2 µl/mL; Invitrogen, Paisley, UK)

<i>siARN</i>	<i>Simbolo</i>	<i>REF</i>
siARN control negativo	siARN -	AM4611
siARN Receptor colinérgico M1	siARN M1	s3024
siARN Receptor colinérgico M2	siARN M2	s3026
siARN Receptor colinérgico M3	siARN M3	s230642

TABLA 20. ARN interferentes empleados en el silenciamiento génico

Los fibroblastos de bronquio humano fueron transfectados con el ARN interferente a una concentración de 50 nM en medio libre de suero y antibióticos. Tras un periodo de 6 horas, el medio fue aspirado y reemplazado por medio suplementado únicamente con suero bobino fetal al 10%. Pasadas 48 horas se estimuló normalmente siguiendo el diseño experimental.

Con el fin de evaluar la eficiencia del silenciamiento, en paralelo a las condiciones experimentales se establecieron condiciones control para las que se determinó 48h post silenciamiento, por una parte, la expresión de ARNm de los transcritos de M1, M2 y M3 por RT-PCR (tal y como se describe en el apartado de RT-PCR) comparandola con la expresión de dichos transcritos en el siARN control y por otra la expresión proteica de M1, M2 y M3 mediante la técnica de western blott (tal y como se describe en el apartado correspondiente a dicha técnica)

3.6 INMUNOFLUORESCENCIA:

Los fibroblastos fueron sembrados en placas de 12 pocillos cada uno de los cuales contenía una cubreobjetos de cristal redondo de 14mm de diámetro y se incubaron durante 24 horas con DMEM suplementado[124]. Pasado este tiempo fueron privados de suero bovino fetal, y estimulados con las sustancias ya indicadas, durante 48 horas.

Las células fueron lavadas con PBS frío y fijadas con paraformaldehído al 4% durante 30 minutos a temperatura ambiente, tras ello se permeabilizaron (HEPES 20 mM pH 7,6, sucrosa 300 mM, NaCl 50 mM, MgCl₂ 3 mM y TritonX-100 0,5%), se bloquearon (10% suero bovino de cabra en PBS), y se incubaron con el anticuerpo primario a 4°C durante toda la noche. Posteriormente se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente antibody anti-mouse-FITC; ver tabla 21 y con DAPI (2 µg/mL; Molecular Probes) para el marcaje de los núcleos. Se lavaron 3 veces con PBS y se procedió al montaje con medio de específico para fluorescencia (DAKO; Medio de Montaje Fluorescencia: catalogo n°.S3023)

Se tomaron fotografías de la preparación con un microscopio acoplado a cámara (x400 y x1000; microscopio invertido Nikon eclipse TE200). Las células positivas fueron contadas en un total de 6 campos por condición y se relativizaron al porcentaje de expresión de α-SMA en la condición control.

Anticuerpo primario			Anticuerpo secundario		
Nombre	Referencia	Dilución	Nombre	Referencia	Dilución
α-SMA	Molecular probes	1:100	anti-mouse- FITC	Molecular probes	1:200

TABLA 21 Anticuerpo primario y secundario empleado para la inmunofluorescencia.

3.7 ELISA:

Para medir la cantidad de TGF-β1 finalizadas las 48 horas de incubación, se recogió el sobrenadante de los fibroblastos cultivados en placas de cultivo de 6 pocillos. Posteriormente, se utilizó el kit Quantikine human TGF-B1 immunoassay (R&D Systems; catalogo n°. 891124), que permite determinar cuantitativamente los

3. Material y Metodos

niveles de TGF- β 1 en el sobrenadante de las células, siguiendo las instrucciones del fabricante [125].

Para medir los complejos latentes de TGF- β 1 se procedió a su activación con tratamiento ácido, con ácido clorhídrico 1N (HCl, Panreac) durante 10 minutos y posterior neutralización con hidróxido sódico 1,2 N (NaOH, Panreac) y 0,5 M HEPES (Sigma-Aldrich).

Para medir la cantidad de ACh, finalizadas las 48 horas de incubación, se recogió el sobrenadante de los fibroblastos cultivados en placas de cultivo de 6 pocillos. Posteriormente se utilizó ACh assay kit (Abcam, UK; catalogo n°. ab65345) para determinar los niveles de ACh liberada al medio, siguiendo las instrucciones del fabricante

El contenido de AMPc total fue determinado mediante un kit comercial (kit inmunoensayo; Amersham; referencia n° RPN2251) [126]. El protocolo experimental consiste en la incubación de las células con ACL durante 30 min seguido de la adición de CCh (10^{-5} M) durante 10 min e isoprenalina (10^{-6} M; inductor de la adenilato ciclasa, sin dicho inductor los niveles basales de AMPc no son detectables) durante otros 10 minutos. Dichas concentraciones y tiempos de incubación fueron seleccionados de la literatura [127].

3.8 MEDIDA DE LA PRODUCCIÓN DE ERO INTRACELULAR:

El sustrato fluorogénico DCFDA es un indicador permeable a las células que es oxidado por H_2O_2 y O_2 intracelular a 2',7'-diclorofluoresceína (DCF), una molécula altamente fluorescente. Se utilizó esta reacción para monitorizar la formación de ERO intracelular [124].

Una vez transcurrido el tiempo de estimulación, se lavaron las células con PBS y se tomaron imágenes de fluorescencia con un microscopio de fluorescencia (x200; Nikon eclipse TE200). Para cuantificar los niveles de ERO, se midió la fluorescencia (con filtro de excitación de 485 nm y de emisión de 528 nm) a 30 minutos. Se midió

la fluorescencia en un total de seis campos por pocillo seleccionados de forma aleatoria. Los resultados se expresaron como fluorescencia de DCFDA (en unidades de fluorescencia relativas, UFR) para las distintas condiciones.

3.9. ENSAYO DE PROLIFERACIÓN Y MIGRACIÓN CÉLULAR

El ensayo de proliferación se realizó mediante inmunoensayo colorimétrico basado en la incorporación de 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU) durante la síntesis de ADN empleando un kit (Roche Catalogo nº 11647229001), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los fibroblastos fueron sembrados en placas de 96 pocillos a una densidad de 3×10^3 células/pocillo y se incubaron durante 24h con las distintas condiciones experimentales. Transcurrido el tiempo de incubación se cuantificó la absorbancia a 490nm empleando un espectrofotómetro de placa (Perkin Elmer Victor 1420). Los datos de proliferación se expresan como el valor de absorbancia del BrdU retenido por el ADN existente en cada pocillo con respecto a la condición control.

El ensayo de migración de fibroblastos se realizó midiendo la capacidad migratoria de las células tras realizar un surco en la monocapa del cultivo celular. Los fibroblastos fueron sembrados en placas de 6 pocillos una vez pre-tratados con los moduladores farmacológicos correspondientes durante 30 min, se realizó un surco lineal en la monocapa celular empleando una punta de pipeta estéril de 200 μ L, creando un daño lineal coincidente con el diámetro del pocillo en la monocapa, de 1 mm de anchura. A continuación se lavaron las células con medio de cultivo para eliminar las células muertas. Tras el lavado, se adicionaron las condiciones correspondientes a cada pocillo.

Para asegurar que la medida del área de migración se realizaba en el mismo punto durante todo el proceso, se pintó una cruz negra en fondo del pocillo y las mediciones se realizaban siempre en la intersección de la cruz pintada. El proceso de migración-reparación se monitorizó inmediatamente, tras la realización del surco empleando un microscopio de contraste de fases que registra las imágenes

Material y Metodos

digitalmente y a tiempos regulares hasta la reparación total del daño en la monocapa. El área del daño se midió empleando el software Image J 1.42 (disponible en <http://rsb.info.nih.gov/ij/>,USA), la extensión de la reparación se calculó y expresó como un porcentaje del área del daño en el momento inicial.

3.10 ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS:

Los resultados se expresan como la media \pm error estándar de la media (SEM) de grupos experimentales de n=3-4. El análisis estadístico de los datos se ha llevado a cabo mediante un análisis de varianza (ANOVA) con intervalos de confianza del 95% (GraphPad Software Inc, San Diego, CA, EEUU). La comparación entre dos grupos se ha realizado mediante el test post hoc Bonferroni-Holm. Un valor $P < 0.05$ es aceptado estadísticamente significativo.



4. Resultados:

4.1 RESULTADOS ESTUDIO 1:

4.1.1 ACL INHIBE LA EXPRESIÓN DE COL1A Y α -SMA INDUCIDA POR CCH Y TGF-B1 EN FIBROBLASTOS DE PULMÓN HUMANO:

CCh (10^{-5} M) aumentó la expresión de transcritos primarios de COL1A y α -SMA, alcanzando valores máximos 48 horas tras la exposición con el agonista colinérgico (figura 9A, B). Además CCh, de manera concentración dependiente incrementó la expresión proteica y de ARNm, de COL1A y α -SMA, alcanzando valores máximos a una concentración 10^{-5} M (figura 9C, D). Por ello, se seleccionó esta concentración y este tiempo de incubación para el resto de experimentos.

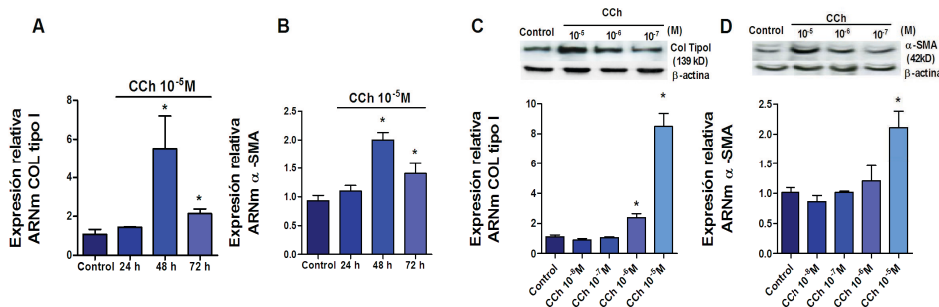


FIGURA 9. Carbacol (CCh) tiempo y concentración dependiente incrementa colágeno tipo I (COL1A) y α -actina de músculo liso (α -SMA) en fibroblastos de pulmón humano.

Se estimuló con CCh a los tiempos indicados (A, B) o durante 48 h a las concentraciones indicadas (C, D). Tras la incubación, se extrajo ARN para la cuantificación relativa de los niveles de ARNm de col tipo I y α -SMA mediante RT-PCR (A–D). Tras la incubación, se realizó la extracción de proteína total y se realizó western blot con anticuerpos específicos para COL1A y α -SMA (C, D).

Cada gráfica representa la media de 4 experimentos independientes por condición. 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 dos grupos se ha realizado mediante el test post hoc Bonferroni-Holm. * $P < 0.05$ respecto al grupo control.

ACL, de manera concentración dependiente fue capaz de reducir la expresión de COL1A y α -SMA inducida por CCh, tanto a nivel proteico como a nivel de ARNm, alcanzando un valor máximo inhibitorio a la concentración de 10^{-7} M (figura 10A, B). En paralelo, TGF- β 1 provocó un pronunciado incremento a nivel de la expresión

4. Resultados

proteica y de ARNm de COL1A y α -SMA, que fue completamente bloqueado por ACL 10^{-7} M (figura 10C, D).

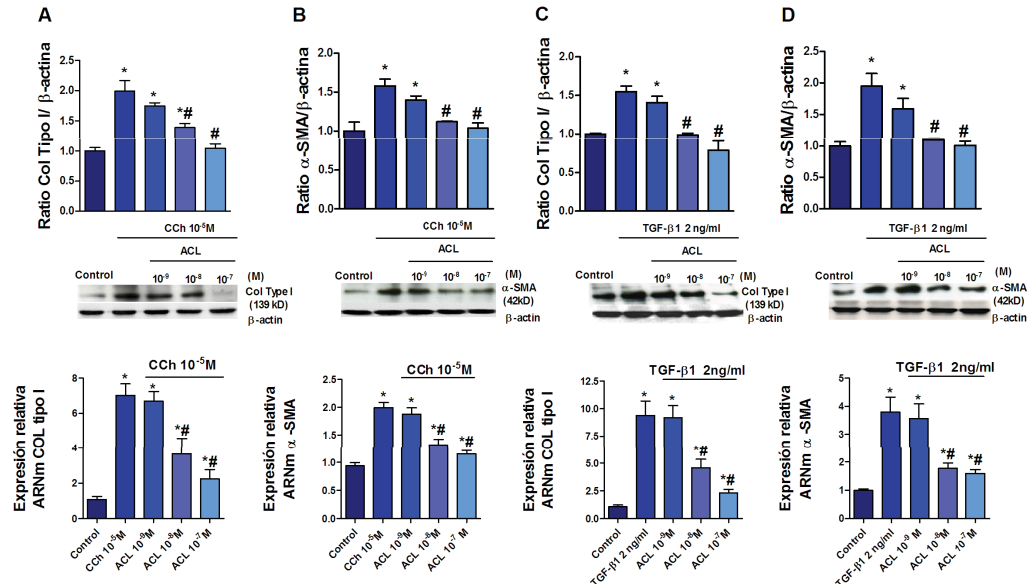


FIGURA 10. Carbacol (CCh) y factor de crecimiento transformante- β 1 (TGF- β 1) inducen la expresión de Colágeno tipo I (COL1A) y α -actina de musculo liso (α -SMA) dicho efecto es inhibido por Bromuro de aclidinio (ACL).

Los fibroblastos de pulmón humano fueron estimulados con CCh (A, B) o TGF- β 1 (C, D) durante 48 h. (ACL) se añadió al medio a las concentraciones indicadas 30 min antes de la estimulación con CCh (A, B) o TGF- β 1 (C, D). Tras la incubación se extrajo ARN y proteína total. Las gráficas superiores representan valores de densitometría de la expresión proteica de COL1A (A, C) o α -SMA (B, D) relativa a β -actina y normalizada frente al grupo control. Las imágenes representativas de los western blott de col tipo I (A, C) o α -SMA (B, D) también se muestran. Las gráficas inferiores muestran la cuantificación relativa de los niveles de ARNm de COL1A (A, C) y α -SMA (B, D) mediante RT-PCR.

Cada gráfica representa la media de 3 experimentos independientes por condición de western blott y 8 experimentos independientes por condición de RT-PCR. 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 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.

Las imágenes de inmunofluorescencia para α -SMA mostraron una apariencia diferencial con aglomerados de microfilamentos de α -SMA en respuesta a CCh; comparable a la apariencia que adquieren en respuesta a TGF- β 1. Los fibroblastos control, mostraron una disposición citoplásmica de α -SMA no filamentosa, difusa e irregular. Tras la exposición a CCh o a TGF- β 1 el porcentaje de células que expresó microfilamentos de α -SMA fue del 36% (5) y del 60% (10) respectivamente. ACL 10^{-7} M redujo significativamente dicha inducción en la

4. Resultados

formación de microfilamentos de α -SMA un 5% (2) y un 15% (3), respectivamente (figura 11A, B).

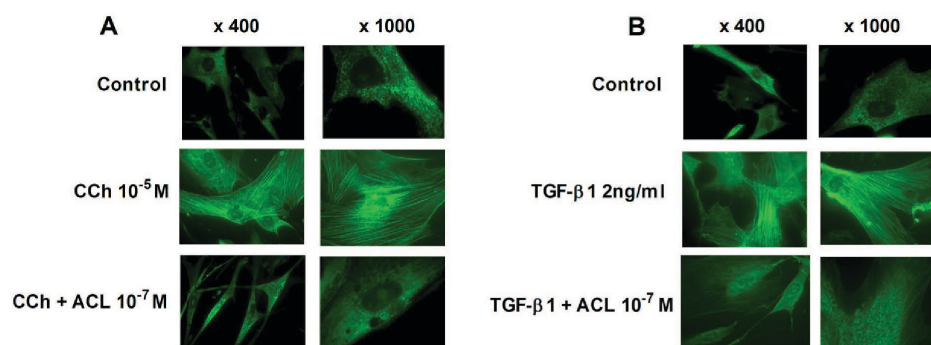


FIGURA 11. Carbacol (CCh) y factor de crecimiento transformante- β 1 (TGF- β 1) inducen la formación de microfilamentos de α -actina de musculo liso (α -SMA), dicho efecto es inhibido por Bromuro de aclidinio (ACL).

Los fibroblastos fueron sembrados en placas de 12 pocillos cada uno de los cuales contenía un cubreobjetos de cristal redondo de 14mm de diámetro y se incubaron durante 48 horas con CCh (A) o TGF- β 1 (B) en presencia o ausencia de ACL. Las células fueron fijadas, permeabilizadas e incubadas con anticuerpo anti- α -SMA seguido del anticuerpo secundario anti-FITC. Las imágenes de fluorescencia son representativas de tres experimentos independientes por condición, se emplearon objetivos de x400 y x1000 aumentos.

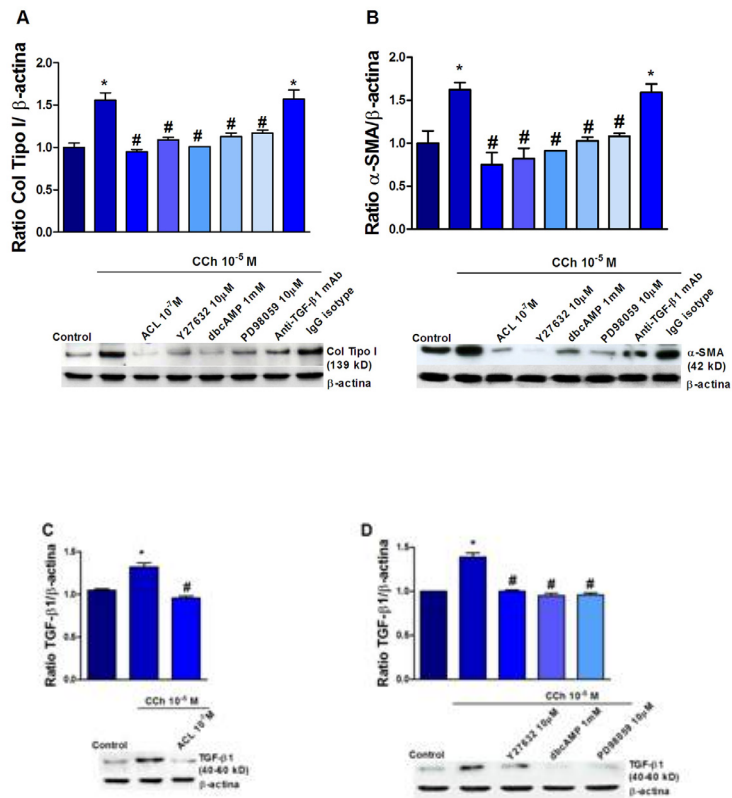
4.1.2 CCH INCREMENTA LA EXPRESIÓN DE MARCADORES DE MIOFIBROBLASTOS MEDIANTE MECANISMOS COMPARTIDOS CON TGF- β 1:

La inducción proteica de COL1A y α -SMA resultante tras la estimulación colinérgica con CCh, fue revertida en las células pretratadas con ACL, con el inhibidor de Rho quinasa; Y27632, con el análogo del AMPc; dbcAMP y con inhibidor de ERK1/2; PD98059, así como por el anticuerpo anti-TGF- β 1 (4 μ g/mL) (figura 12A, B).

Además, CCh fue capaz de inducir la cantidad de TGF- β 1 a nivel intracelular, lo que se evidenció a nivel proteico y de expresión relativa de ARNm (figura 12C-E), así como a nivel extracelular, lo cual se evidenció en menor medida, pero también de manera significativa (figura 12F). El pretratamiento de las células con ACL, con

4. Resultados

Y27632, dbcAMP o PD98059 actuó como tratamiento efectivo tanto en la supresión intracelular como en la extracelular de TGF- β 1.



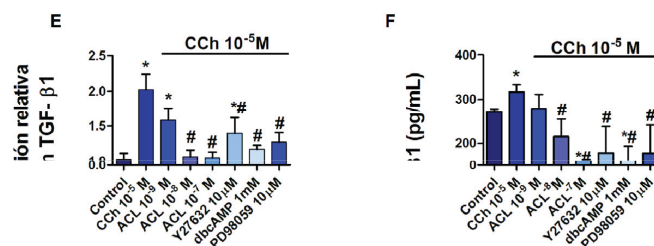


FIGURA 12. Carbacol (CCh) induce la expresión de Colágeno tipo I (COL1A) y α -actina de musculo liso (α -SMA): dicho resultado está parcialmente mediado por el factor de crecimiento transformante- β 1 (TGF- β 1).

Los fibroblastos de pulmón humano fueron estimulados con CCh durante 48 h. (A, B). ACL, inhibidor Rho kinasa (Y27632), N6, 2'-O-Dibutiriladenosina 3',5'-cíclica monofosfato (dbcAMP), inhibidor ERK1/2 (PD98059), anticuerpo anti-TGF- β (4 μ g/mL) o su isotipo IgG fueron añadidos al medio 30 min antes de la estimulación con CCh. Tras la estimulación se extrajo la proteína total y se realizaron western blotts, las gráficas representan valores de densitometría de la expresión proteica de COL1A (A) o α -SMA (B) relativa a β -actina y normalizada frente al grupo control. Las imágenes representativas de los western blotts también se muestran.

En otros experimentos, las células fueron estimuladas con CCh en presencia o ausencia de ACL (C, E, F), Y27632 (D, E, F), PD98059 (D, E, F) o dbcAMP (D, E, F). Tras la incubación, se recogió proteína total (C, D), ARN (E) y sobrenadantes de cultivos y mediante western blot, RT-PCR y ELISA se determinó respectivamente; expresión proteica (C, D) y de mRNA (E) de TGF- β 1 (E) así como la forma activa de TGF- β 1 presente en el medio de cultivo (F).

Cada gráfica representa la media de 3 experimentos independientes por condición (A–D) y 6 experimentos independientes por condición (E, F). El análisis estadístico de los datos se ha llevado a cabo mediante un análisis de varianza (ANOVA) con $p < 0.001$ (A–F). 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 continuación, se estudió si TGF- β 1 era capaz de activar el sistema colinérgico no neuronal. Para ello, se empleó la enzima AChE (10 U/mL) para eliminar la ACh extracelular durante las 48h de estimulación con TGF- β 1. Como resultado se obtuvo una reducción del incremento en la expresión de COL1A y α -SMA inducido por TGF- β 1 (figura 13A, B). Sin embargo, el análisis de los niveles de ACh en sobrenadante no reveló diferencias entre las células control y las células tratadas con TGF- β 1 o ACL (figura 13C), probablemente debido a la rápida degradación por las colinesterasas extracelulares presentes en fibroblastos [103, 128].

Experimentos paralelos, evidenciaron que TGF- β 1 era capaz de sobreexpresar ChAT en fibroblastos de pulmón humano y dicho efecto era revertido por ACL (figura

4. Resultados

13D). Todos estos resultados sugerían que la activación de receptores muscarínicos podía compartir mecanismos de señalización comunes con la vía del TGF- β 1

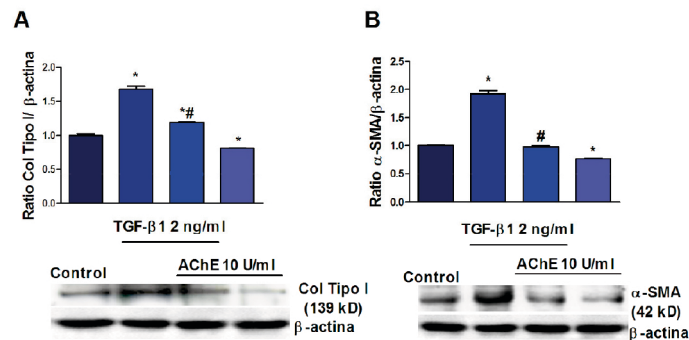


FIGURA 13. El factor de crecimiento transformante- β 1 (TGF- β 1) induce la expresión de colágeno tipo I (COL1A) y α -actina de músculo liso (α -SMA) mediado parcialmente por el sistema colinérgico no neuronal.

Los fibroblastos de pulmón humano fueron estimulados con TGF- β 1 durante 48 h. Se añadió AChE al medio 30 min antes de la estimulación con TGF- β 1 (A, B). Tras la estimulación se extrajo la proteína total, las gráficas representan valores de densitometría de la expresión proteica de COL1A (A) o α -SMA (B) relativa a β -actina y normalizada frente al grupo control. Las imágenes representativas de los western blots también se muestran.

En otros experimentos, las células fueron estimuladas con TGF- β 1 durante 48 h en presencia o ausencia de ACL (C, D). Tras la incubación se recogieron tanto sobrenadantes (C) como proteína total (D) y se procedió a la determinación de los niveles de ACh (ACh) en sobrenadante mediante ELISA (C), y de expresión de ChAT mediante western blott (D), la gráfica representa valores de densitometría de la expresión proteica de ChAT (D), normalizada frente al grupo control. Las imágenes representativas de los western blots también se muestran.

Cada gráfica representa la media de 3 experimentos independientes por condición (A–D). 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 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.

Esta hipótesis se sustentó porque tanto CCh como TGF- β 1 provocaron un incremento de la fosforilación de ERK1/2 y en la formación de RhoA-GTP lo cual fue

4. Resultados

inhibido por ACL (figura 14A, B). Cabe destacar también, que ACL también restauró los niveles de AMPc, que había disminuido el agonista colinérgico (figura 14C)

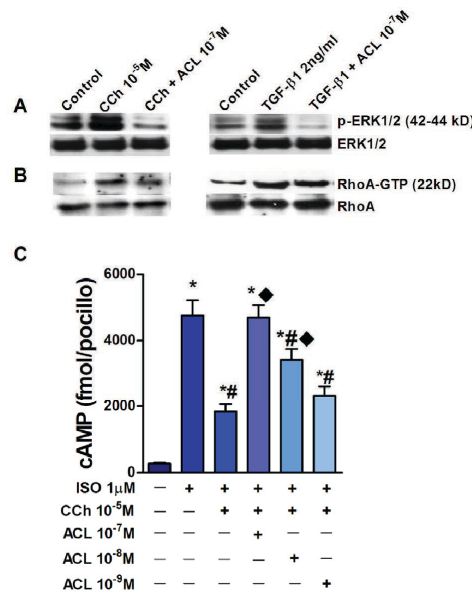


FIGURA 14. La inducción mediada por Carbacol (CCh) de: la fosforilación de ERK1/2, el incremento de expresión de RhoA-GTP y la inhibición de AMPc; es prevenida por Bromuro de aclidinio (ACL).

Los fibroblastos de pulmón humano fueron estimulados con CCh o TGF-β1 durante 48h (A, B). ACL fue añadido al medio 30 min antes de la estimulación (A, B). Tras la incubación se extrajo la proteína total y se realizaron westerns blotts de pERK1/2 -- total ERK1/2 (A) y de RhoA-GTP -- RhoA (B).

En(C), ACL fue incubado durante 30 min, seguido de la adición de CCh durante 10 min e isoprenalina (ISO) (10⁻⁶M) durante otros 10 min. La cantidad total de AMPc fue determinada por ELISA. Las imágenes de western blot (A, B) son representativas de 3 experimentos independientes por condición y la gráfica representa la media de 3 experimentos independientes por condición (A–D). El análisis estadístico de los datos se ha llevado a cabo mediante un análisis de varianza (ANOVA) con p<0.001 (C). 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 grupo con ISO; ◆ p<0.05 respecto al grupo con CCh + ISO

4.1.3 CCH Y TGF-B1 MODIFICAN LA EXPRESIÓN DE RECEPTORES MUSCARINICOS:

De acuerdo con antecedentes previos de cultivos primarios de fibroblastos humanos, se puede decir que dicho tipo celular muestra altos niveles de ARNm del

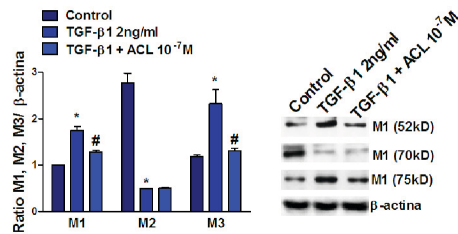
4. Resultados

receptor muscarínico M2 y en menor medida de los receptores M1 y M3, respectivamente, mientras que los transcritos de M4 y M5 ni se detectan [129].

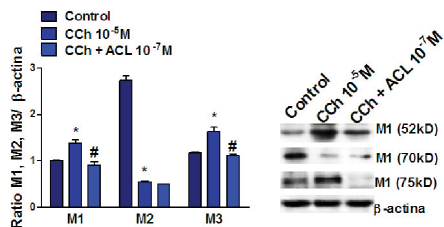
Estableciendo el nivel de expresión proteica de M1 en un valor de 1, la cantidad de proteína M2 en fibroblastos de pulmón humano en condiciones basales fue de aproximadamente 2,6-veces y 2,4-veces superior que de M1 y M3, respectivamente (figura 15A–C).

Cuando las células fueron incubadas con TGF- β 1 o CCh durante 48 h, se produjo una sobreexpresión de M1 y M3, mientras que la expresión de M2 se vió disminuida significativamente (figura 15A, B). El pretratamiento con ACL previno la sobreexpresión de M1 y M3, pero no la disminución de expresión de M2 inducida por CCh o TGF- β 1 (figura 15A, B). Del mismo modo, experimentos con Y27632, dbcAMP o PD98059 redujeron la sobreexpresión de M1 y M3 inducida por CCh pero no modificaron la expresión de M2 (Figura 15C).

A



B



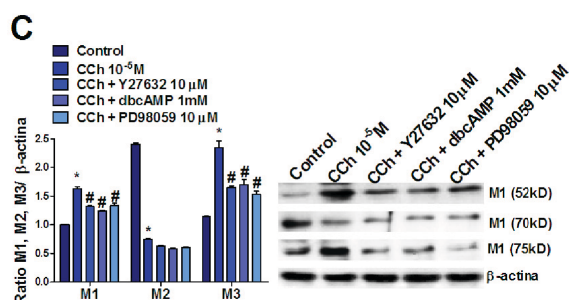


FIGURA 15. Carbacol (CCh) y factor de crecimiento transformante-β1 (TGF-β1) alteran la expresión de receptores muscarínicos (M) e inducen la transición fibroblasto -- miofibroblasto vía M1, M2 y M3

Los fibroblastos de pulmón humano fueron estimulados con CCh (B, C) o TGF-β1 (A) durante 48h. (A, B) ACL (ACL), (C) inhibidor Rho kinasa (Y27632), (C) dibutyl cyclic adenosine monophosphate analogue (dbcAMP) o (C) inhibidor de ERK1/2 (PD98059) fueron añadidos al medio 30 min antes de la estimulación. Tras ello, se extrajo proteína total para la realización de western blot de M1, M2 y M3.

Las gráficas (A, B, C) representan valores de densitometría de la expresión proteica de M1, M2 y M3 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 de western blot. 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; # $p < 0.05$ respecto al estímulo.

Para poder entender mejor que los receptores muscarínicos estaban involucrados en la transición fibroblasto -- miofibroblasto, las células fueron preincubadas con el antagonista de M1; pirenzepina, el antagonista de M2; methoctramina y el antagonista de M3; pFHHSid. Obteniendo como resultado que, el incremento de expresión de COL1A y α-SMA provocado por CCh o TGF-β1 se veía prevenido por los antagonistas de M1, M2 y M3.

Aunque el antagonismo de M2 fue menos efectivo en la inhibición de la expresión de α-SMA (figura 16A, B). En otros experimentos en los cuales los receptores fueron selectivamente silenciados por transfección con siARN-M1, siARN-M2 y siARN-M3, la inducción de COL1A y α-SMA mediada por CCh, fue suprimida por completo (figura 16C).

4.Resultados

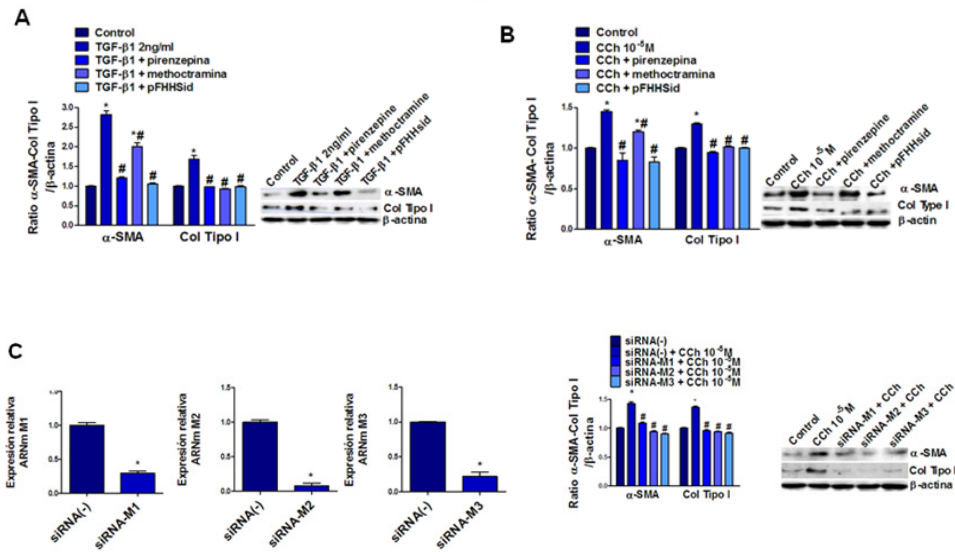


FIGURA 16. El factor de crecimiento transformante-β1 (TGF-β1) y carbacol (CCh) aumentan la expresión de colágeno tipo I (COL1A) y α-actina de músculo liso (α-SMA), dicho proceso es inhibido por los antagonistas de M1 M2 y M3.

Los fibroblastos de pulmón humano fueron estimulados con TGF-β1 (A) o CCh (B) en presencia o ausencia de: antagonista M1; pirenzepina, antagonista M2; methoctramina o antagonista M3 p-fluoro-hexahydro siladifenidol (pFHHSid) durante 48 h. Tras la incubación, se extrajo la proteína total, las gráficas (A, B) representan valores de densitometría de la expresión proteica de COL1A y α-SMA (A, B) relativa a β-actina y normalizada frente al grupo control. Las imágenes representativas de los western blots de COL1A y α-SMA (A, B) también se muestran.

En la figura C las 3 primeras gráficas representan la expresión relativa de ARNm de M1, M2 y M3 48h tras su silenciamiento con siARN-M1, siARN-M2 y siARN-M3, la última gráfica muestra como afecta a la expresión proteica de COL1A y α-SMA el tratamiento con CCh a las células transfectadas con siARN-M1, siARN-M2 y siARN-M3, se representan valores de densitometría de la expresión proteica de M1, M2 y M3 relativa a β-actina y normalizada frente al grupo control. Las imágenes representativas de los western blots 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; # $p < 0.05$ respecto al estímulo.

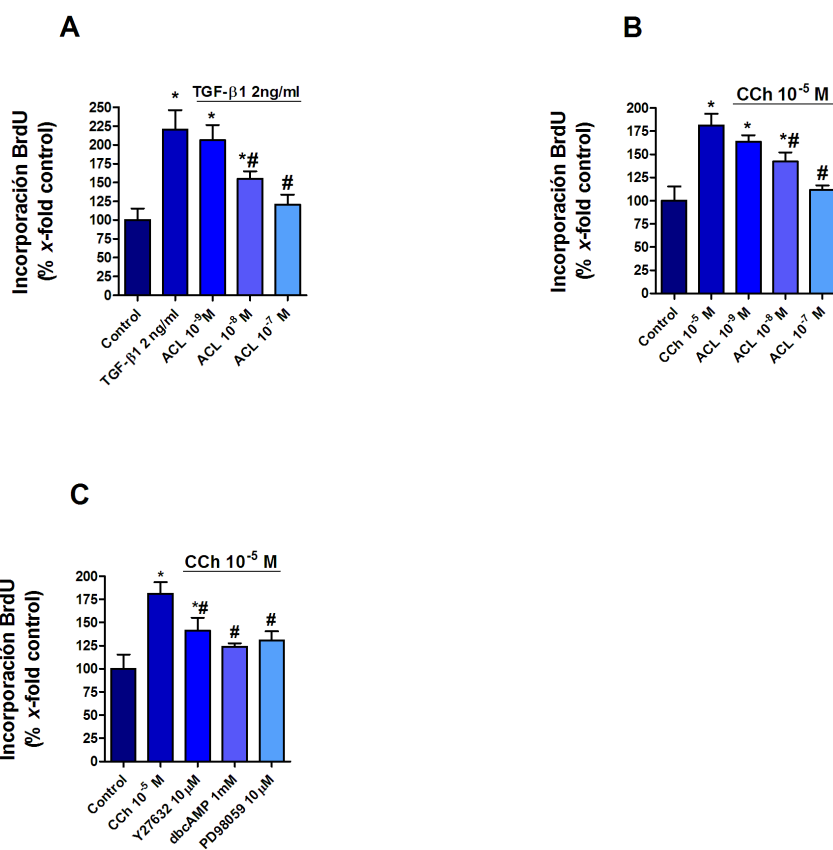
4.1.4 ACL INHIBE LA PROLIFERACIÓN Y MIGRACIÓN DE FIBROBLASTOS PULMONARES:

Las células fueron expuestas a TGF-β1 o CCh durante 48h en presencia o ausencia de ACL (10^{-9} – 10^{-7} M). Ambos incrementan la proliferación celular aproximadamente 2,25 y 1,75 veces respectivamente (figura 17A- C) ACL de

4.Resultados

manera dosis dependiente inhibe la proliferación celular inducida por TGF- β 1 o CCh con resultados significativos a una D de 10^{-8} y 10^{-7} M (figura 17A y B). Además la preincubación con Y27632, dbcAMP y PD98059 reduce significativamente la proliferación inducida por CCh (figura 17C).

En los experimentos de migración, tras 48h de estimulación con CCh o vehiculo en presencia o ausencia de ACL (10^{-9} y 10^{-7} M), Y27632, dbcAMP o PD98059, se realizo un surco lineal en la monocapa celular, se lavó y reestimuló con las mismas condiciones. La reparación de daño ocasionado se monitorizó a las 24h y 48h. ACL (figura 17D y E) así como Y27632, dbcAMP o PD98059 (figura 17F) inhibieron de manera dosis dependiente la migración celular y el cierre del surco en la monocapa.



4.Resultados

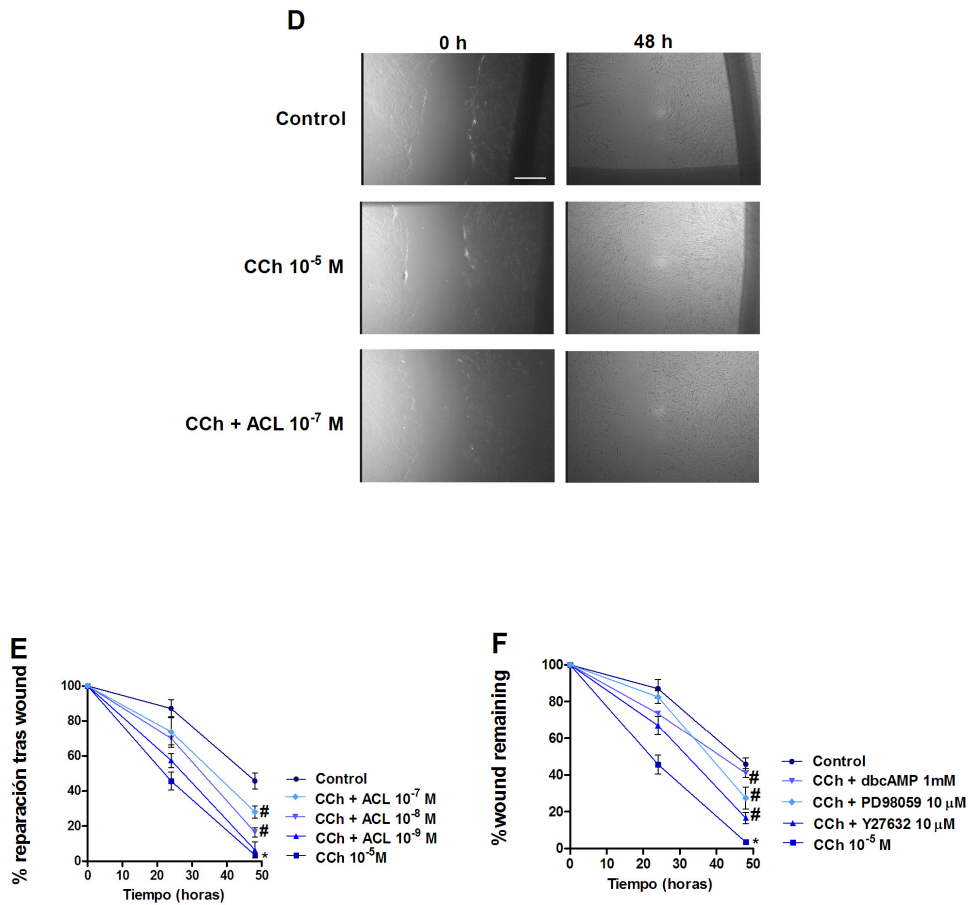


FIGURA 17 Acridinium (ACL) inhibe la proliferación y migración de fibroblastos.

Los fibroblastos se sembraron en placa de 96 pocillos en presencia o ausencia de factor de crecimiento transformante TGF- β 1 (A) o Carbacol (CCh) (B) durante 48h. Acridinium (ACL), inhibidor de Rho kinasa (Y27632), análogo del AMPc (dbcAMP) e inhibidor de ERK1/2 (PD98059), se añadieron al medio 30 minutos antes de la estimulación. Tras la incubación se determinó la proliferación celular mediante el ensayo colorimétrico BrDU.

En las figuras D y F los fibroblastos fueron estimulados durante 48h con CCh o vehiculo en presencia o ausencia de ACL (D, E); Y27632 (F), dbcAMP (F) o PD98059 (F). Tras la estimulación se realizó un surco en la monocapa celular se lavó y se reestimuló con las mismas condiciones. La reparación de daño ocasionado se monitorizó a las 24h y 48h. La figura D representa la migración celular a un aumento 50x.

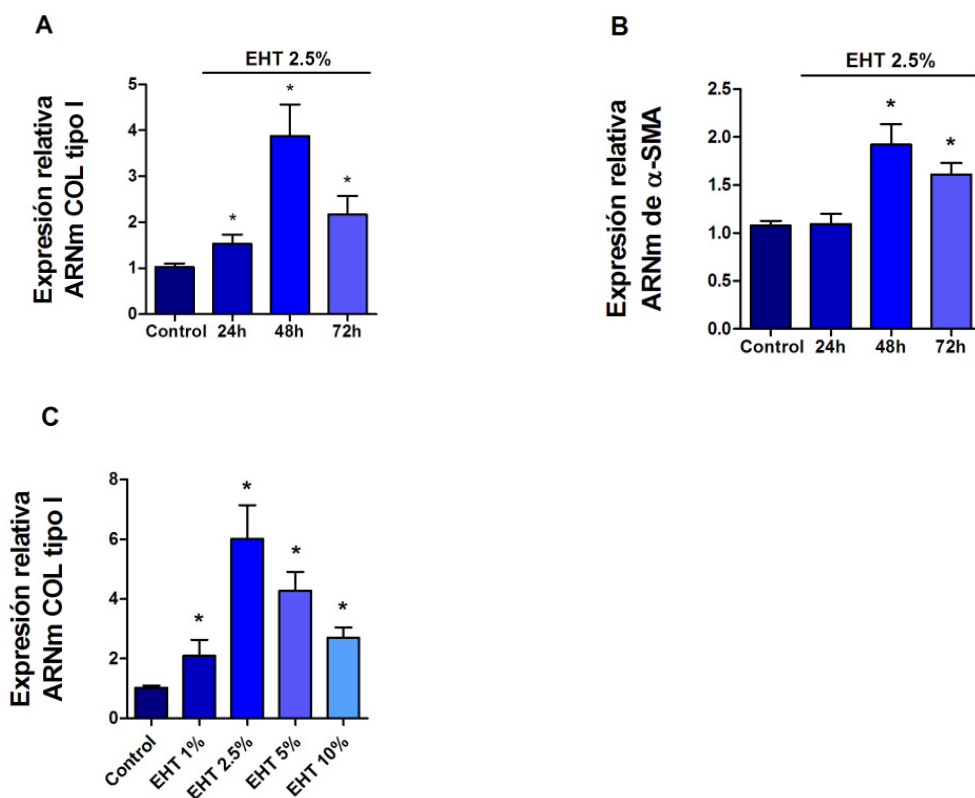
Cada gráfica representa la media de 4 experimentos independientes por condición (A– C) o 3 (D y F). El análisis estadístico de los datos se ha llevado a cabo mediante un análisis de varianza (ANOVA) con $p < 0.001$ (A– F). La comparación entre dos grupos se ha realizado mediante el test post hoc Bonferroni-Holm. * $P < 0.05$ respecto al grupo control; # $p < 0.05$ res ecto al estímulo.

4.2 ESTUDIO 2:

4.2.1. ACL ATENÚA LA INDUCCIÓN DE MARCADORES DE MIOFIBROBLASTOS MEDIADA POR EHT EN FIBROBLASTOS DE BRONQUIO HUMANO:

El EHT a una concentración de 2,5%, provocó un incremento de la expresión de COL1A y α -SMA de manera tiempo dependiente. Alcanzando valores máximos tras 48h de exposición (figura 18A-B).

Además EHT de modo concentración dependiente incrementa la expresión de sendos marcadores, a nivel proteico y molecular alcanzando valores estadísticamente significativos a una concentración de 2,5% durante 48h de exposición (figura 17C-F). Por ello se seleccionó esta concentración y este tiempo de incubación para el resto de experimentos.



4.Resultados

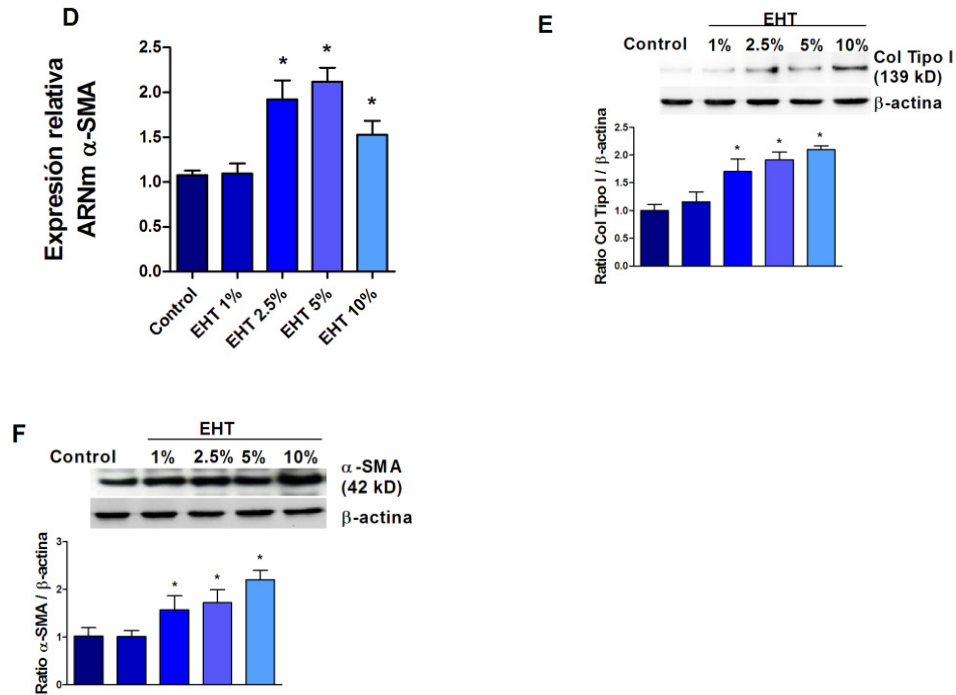
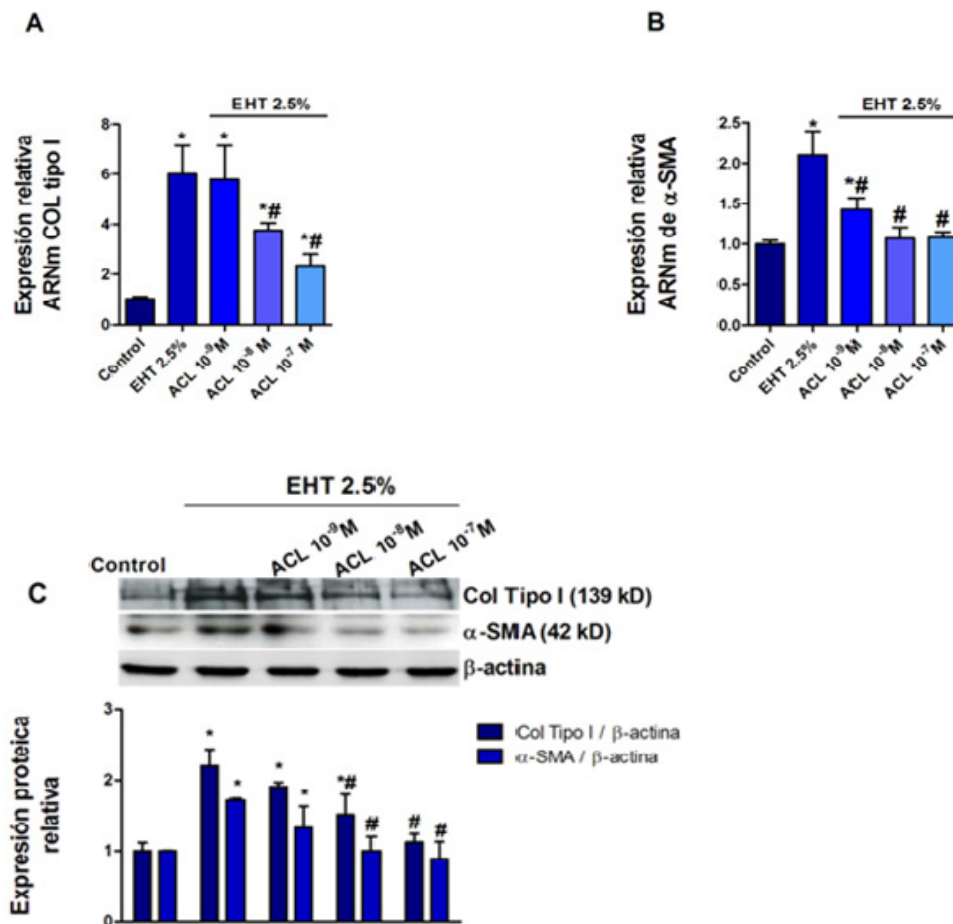


FIGURA 18. Extracto de humo de tabaco (EHT) tiempo y dosis dependiente incrementa colágeno tipo I (COL1A) y α - actina de musculo liso (α -SMA) en fibroblastos de bronquio humano.

Se estimuló con EHT a los tiempos indicados (A, B) o durante 48 h a las concentraciones indicadas (C-F). Tras la incubación, se extrajo ARN para la cuantificación relativa de los niveles de ARNm de COL1A I y α -SMA mediante RT-PCR (A-D) Tras la incubación, se realizó la extracción de proteína total y se realizó western blott con anticuerpos específicos para COL1A y α -SMA (E, F). Cada gráfica representa la media de 4 experimentos independientes por condición(A-D) o 3 experimentos independientes por condición (E, F). El análisis estadístico de los datos se ha llevado a cabo mediante un análisis de varianza (ANOVA) con $p < 0.001$ (A-F). La comparación entre dos grupos se ha realizado mediante el test post hoc Bonferroni-Holm. * $P < 0.05$ respecto al grupo control.

4.Resultados

Por otra parte, ACL fue añadido 30 minutos antes de la estimulación con EHT 2,5%, dicho fármaco concentración dependiente fue capaz de inhibir tanto a nivel proteico como a nivel molecular, la inducción de la expresión de α -SMA así como de COL1A mediada por EHT dando un pico de inhibición máximo a una concentración de 10^{-7} M (figura 19A-C). Resultados similares se observan con atropina, que disminuye de forma significativa ambos marcadores de miofibroblasto a una concentración de 1μ M, lo que sugiere la participación del sistema colinérgico en este proceso (figura 19D-F).



4.Resultados

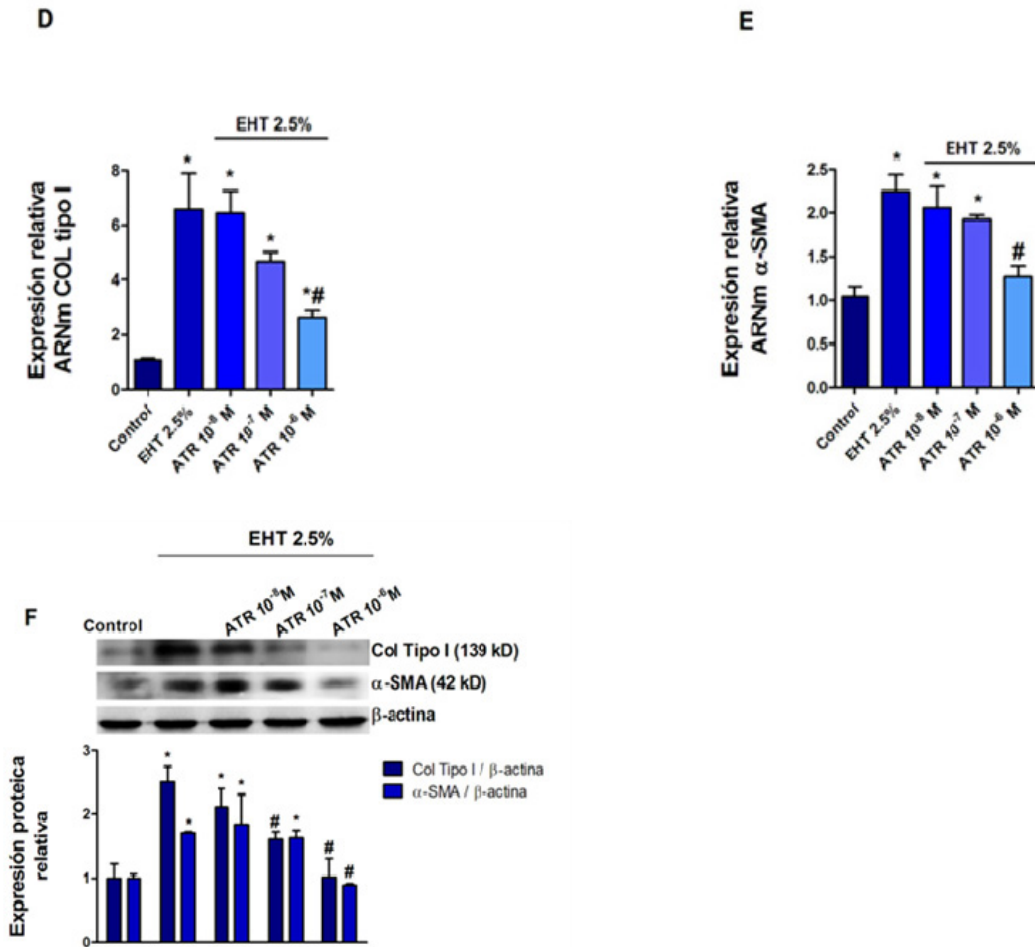


FIGURA 19. Acilidinium (ACL) de manera dosis dependiente reduce la expresión de Colágeno tipo I (Col tipo I) y α -actina de musculo liso (α -SMA) inducida por extracto de humo de tabaco (EHT) en fibroblastos de bronquio humano.

Los fibroblastos de pulmón humano fueron estimulados con EHT durante 48 h. ACL o Atropina se añadieron al medio a las concentraciones indicadas 30 min antes de la estimulación con EHT. Tras la incubación se extrajo ARN (A, B y D, E) y proteína total (C y F). Las gráficas A, B y D, E muestran la cuantificación relativa de los niveles de ARNm de COL1A (A, D) y α -SMA (B, E) mediante RT-PCR. Las gráficas C y F representan valores de densitometría de la expresión proteica de COL1A (A, C) o α -SMA (B, D) relativa a β -actina y normalizada frente al grupo control. Las imágenes representativas de los western blot de col tipo I o α -SMA también se muestran. Cada gráfica representa la media de 3 experimentos independientes por condición de western blott y 4 experimentos independientes por condición de RT-PCR. 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; # $p < 0.05$ respecto al estímulo.

Ambos, tanto ACL como atropina *per se* no muestran ningún efecto sobre los marcadores de miofibroblastos (figura 20 A y B)

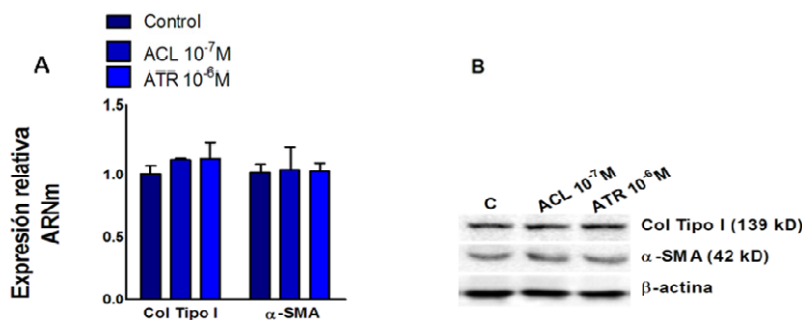


FIGURA 20 Tanto ACL como atropina *per se* no muestran ningún efecto sobre los marcadores de miofibroblastos

Los fibroblastos de pulmón humano fueron incubados con ACL o Atropina a las concentraciones indicadas. Tras la incubación se extrajo ARN (A) y proteína total (B). La gráfica A muestra la cuantificación relativa de los niveles de ARNm de COL1A y α -SMA mediante RT-PCR. La figura B representa la imagen de western blott de la expresión proteica de COL1A y α -SMA relativa a β -actina. La gráfica representa la media de 4 experimentos independientes por condición de RT-PCR. El análisis estadístico de los datos se ha llevado a cabo mediante un análisis de varianza (ANOVA) con $p < 0.001$ (A). La comparación entre dos grupos se ha realizado mediante el test post hoc Bonferroni-Holm. * $P < 0.05$ respecto al grupo control.

4.2.2. ACL REDUCE LA ELEVACIÓN DE ERO INTRACELULAR MEDIADA POR EHT EN FIBROBLASTOS DE BRONQUIO HUMANO:

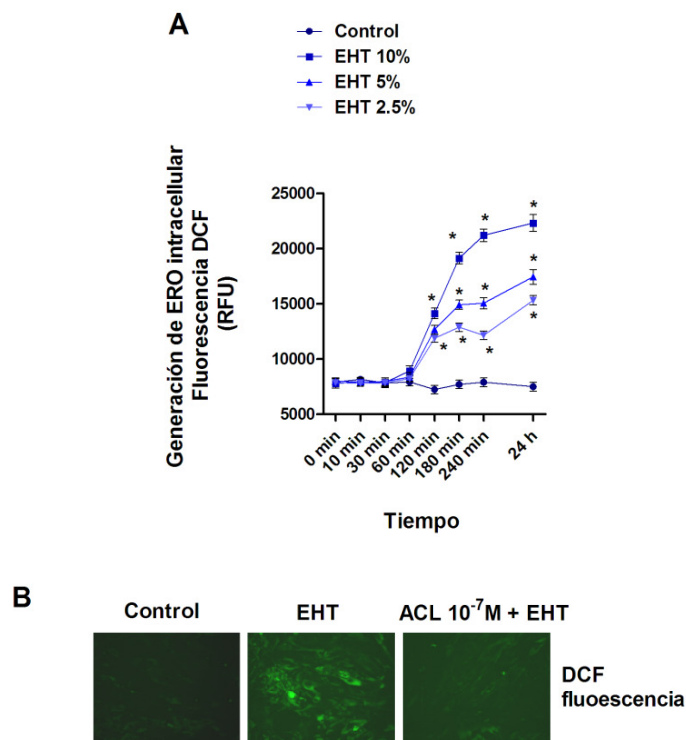
Existen evidencias de que el humo de tabaco activa el complejo de las NADPH oxidasas promoviendo la generación de ERO intracelular [130, 131], así como de que las ERO pueden participar en la activación de cascadas de señalización intracelular en fibroblastos induciendo su activación y transformación a miofibroblastos.[132], por eso, el efecto atenuador de ACL en la generación de ERO intracelular inducida por EHT podría explicar su efecto inhibitorio en la transición a miofibroblastos.

En la presente tesis doctoral EHT (2.5%-10%) de forma concentración dependiente induce la generación intracelular de ERO otorgando valores

4.Resultados

significativos desde las 2 horas hasta las 24h de estimulación (figura 21A). La concentración de EHT 10% nos dió un pico máximo de generación de ERO, es por ello que es esta la concentración seleccionada para evaluar el efecto de ACL sobre la generación de ERO.

El pretratamiento de los fibroblastos de bronquio humano con ACL de modo concentración dependiente reduce la generación de ERO intracelular mediada por EHT aproximadamente en un 50% a la concentración 10^{-7} M y tras 24h de estimulación (figura 21B y C). En paralelo, se realizaron experimentos atenuando ERO con apocinina (100 μ M; inhibidor de la NADPH oxidasa) o N-Acetil Cisteina (NAC; 1mM antioxidante), así como incrementando los niveles de AMPc con su análogo dbcAMP; la generación de ERO intracelular provocada por EHT fue bloqueada por estas moléculas (Fig 21C).



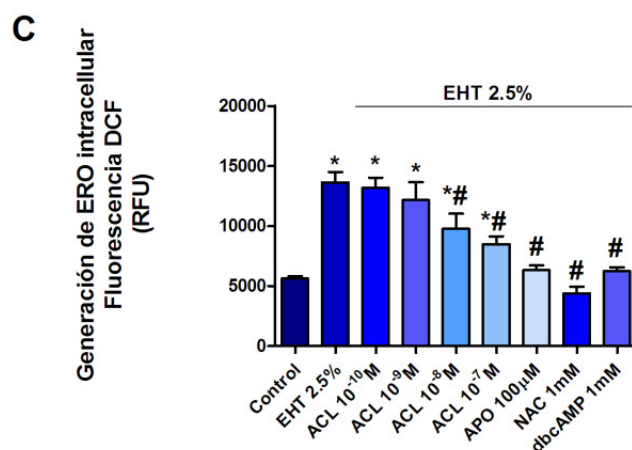


FIGURA 21. Acridinium (ACL) mitiga la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) intracelular inducida por extracto de humo de tabaco (EHT) en fibroblastos de bronquio humano.

Los fibroblastos de bronquio humano fueron incubados en presencia de 2',7'-dicolorofluorescein diacetato 50 µM (DCFDA) durante 30 minutos, posteriormente fueron estimulados con EHT 2,5%. EHT de manera tiempo y dosis dependiente incrementa la generación d ERO intracelular en fibroblastos de bronquio humano (A).

Fibroblastos de bronquio humano fueron incubados en presencia de DCFDA en presencia o ausencia de ACL (ACL; 10-10M-10-7M), apocinina (APO; 100 µM), N-acetil-L-cisteina (NAC; 1 mM), dbcAMP (1 mM) o con vehículo (control) durante 30 minutos. (B y C) posteriormente el exceso de DCFDA se eliminó por lavado con PBS; se reincubo con el fármaco correspondiente ACL, APO, NAC, dbcAMP o vehículo y se estimuló con EHT. (B)

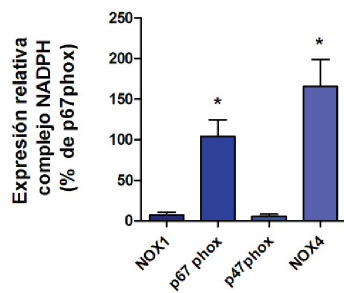
Pasadas las 24h de incubación se tomaron imágenes de fluorescencia con un microscopio de fluorescencia (x200; Nikon eclipse TE200). Para cuantificar los niveles de ERO, se midió la fluorescencia (con filtro de excitación de 485 nm y de emisión de 528 nm). Las imágenes tras 24h de estimulación en presencia o ausencia de ACL mostraron que ACL de manera tiempo y dosis dependiente atenúa la generación de ERO intracelular. Resultados similares se obtuvieron para APO, NAC y dbcAMP (C)

Los resultados representan la media de 3 experimentos independientes por condición. 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; # $p < 0.05$ respecto al estímulo.

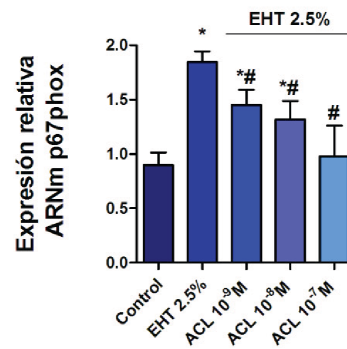
4.Resultados

El complejo NADPH oxidasa está constituido por varias subunidades plasmáticas y citosólicas [133]. Entre las subunidades de la NADPH oxidasa analizadas, encontramos que la subunidad citosólica p67phox así como la subunidad de la membrana plasmática NOX4, eran las más expresadas en fibroblastos de bronquio humano en condiciones basales (Fig. 22A). Tras 24h de exposición, EHT 2,5% es capaz de provocar la sobreexpresión de ambas subunidades tanto a nivel proteico como molecular, dicho efecto es prevenido de manera concentración dependiente por ACL alcanzando un máximo de inhibición a la concentración de 10^{-7} M (Fig. 22 B-D).

A



B



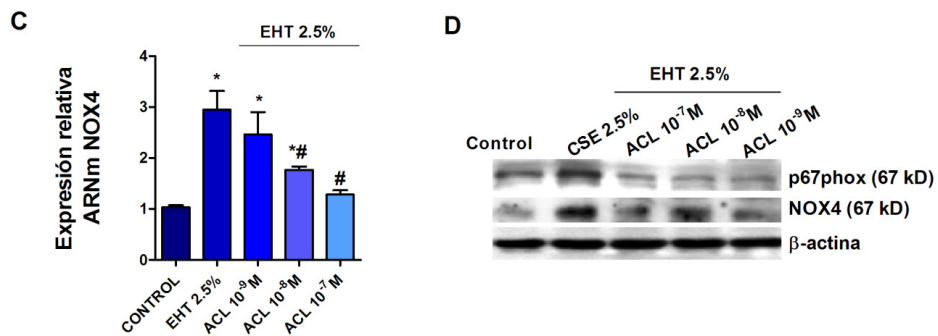


FIGURA 22. Acridinium (ACL) reduce la expresión de p67phox y NOX4 inducida por extracto de humo de tabaco (EHT) en fibroblastos de bronquio humano

Se estimuló con EHT durante 24h, tras la incubación, se extrajo ARN para la cuantificación relativa de los niveles de ARNm de NOX1, p67phox, p47phox and NOX4 mediante RT-PCR la cuantificación y normalización se hicieron tomando p67phox como el 100%(A)

ACL dosis dependiente atenuó la expresión de p67phox and NOX4 inducida por EHT 2,5% a nivel de ARNm (B y C) así como a nivel proteico (D)

Los resultados representan la media de 3 experimentos independientes por condición. 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; # $p < 0.05$ respecto al estímulo.

4.Resultados

4.2.3. EHT ACTIVA EL SISTEMA COLINÉRGICO NO NEURONAL; DICHO EFECTO ES PREVENIDO POR ACL:

Evidencias previas sugieren que EHT activa el sistema colinérgico no neuronal en fibroblastos de pulmón humano, pero el mecanismo no está claro. ChAT es la enzima intracelular responsable de la síntesis de acetilcolina, en este estudio determinaremos el efecto del EHT sobre la expresión de dicha enzima. En este sentido observamos como EHT 2,5% incrementó la expresión de ChAT lo que fue inhibido de manera concentración dependiente por ACL y por los antioxidantes apocinina 100 μ M y NAC 1mM (figura 23A)

Los niveles intracelulares de AMPc, así como la fosforilación de ERK1/2 estan relacionadas con la activación de fibroblastos de pulmón humano [134, 135]. En este trabajo observamos como EHT 2,5% fue capaz de reducir los niveles intracelulares de AMPc e incrementar la fosforilación de ERK 1/2 tras 24h de exposición (figura 23B- D). El pretratamiento con ACL concentración dependiente previene la depleción de los niveles de AMPc así como el incremento de fosforilación de ERK1/2 (figura 23B y C). Además el tratamiento antioxidante con apocinina 100 μ M o NAC 1 mM también previene estos efectos (figura 23B y D).

Ya que el EHT podría activar el sistema colinérgico no neuronal, se añadió la enzima AChE (10 U/mL) para eliminar la ACh extracelular durante las 24h de estimulación con EHT 2,5%. Dicha enzima revirtió parcialmente la depleción de los niveles intracelulares de AMPc así como la fosforilación de ERK1/2 provocada por el EHT (figura 23B y D).

4.Resultados

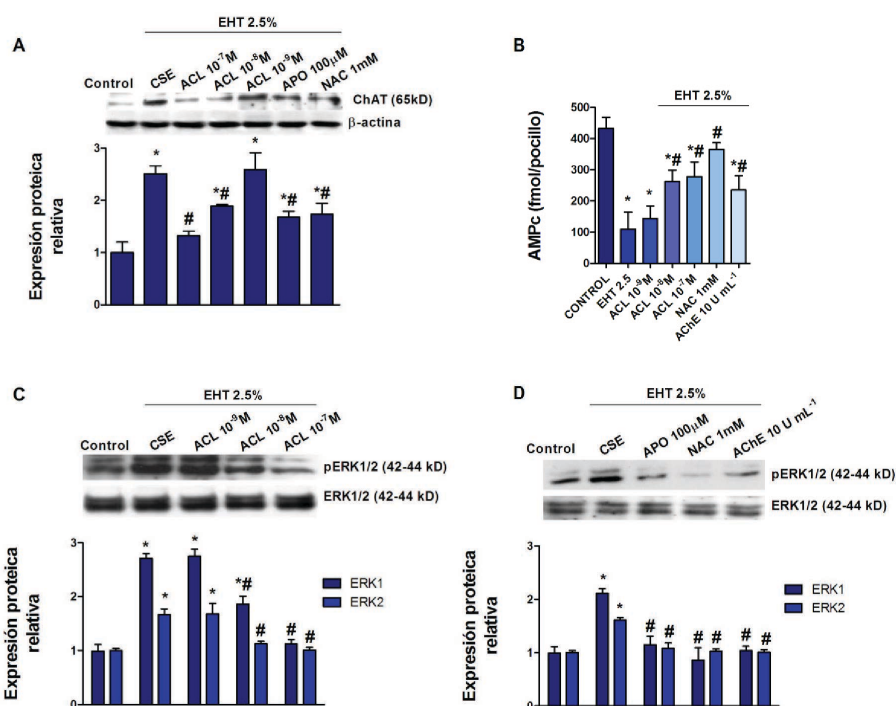


FIGURA 23. Extracto de humo de tabaco al 2,5% (EHT) activa el sistema colinérgico no neuronal; disminuyendo los niveles de AMPc y fosforilando ERK1/2.

Los fibroblastos de pulmón humano fueron preincubados durante 30 minutos con ACL (ACL: 10-9M-10-7M), (A-C), con apocinina (APO: 100 μ M), N-acetyl-L-cysteina (NAC: 1 mM) (A, B y D) o con acetil colinesterasa (AChE: 10 U/mL-1) (B, D) y posteriormente estimulados con EHT 2.5% durante 24 h.

Tras la incubación se extrajo proteína total y se determinó la expresión mediante western blott de ChAT relativa a β -actina y normalizada frente al grupo control (A) y de pERK1/2 -- total ERK1/2 (C, D) Las imágenes representativas de los western blots también se muestran. La cantidad total de AMPc fue determinada por ELISA cAMP Biotrak enzyme immunoassay (EIA) system (B)

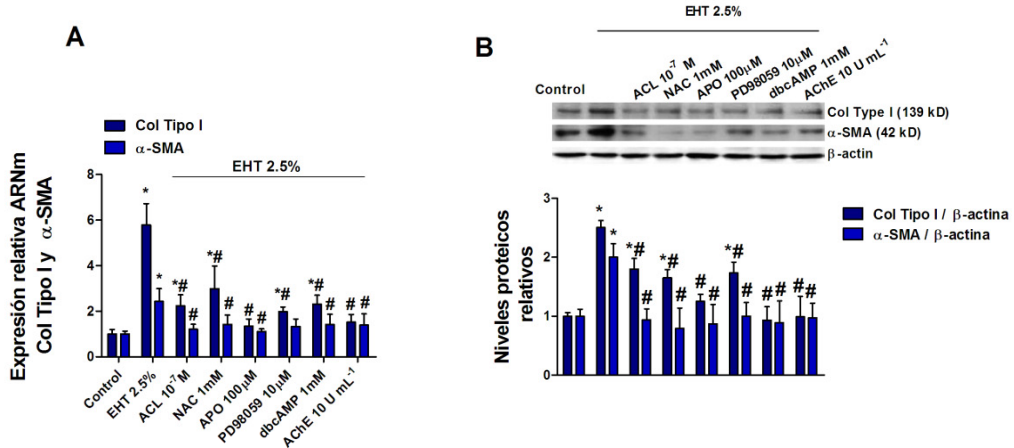
Los resultados representan la media de 3-4 experimentos independientes por condición. El análisis estadístico de los datos se ha llevado a cabo mediante un análisis de varianza (ANOVA) con $p < 0.001$ (A-C). La comparación entre dos grupos se ha realizado mediante el test post hoc Bonferroni-Holm. * $P < 0.05$ respecto al grupo control; # $p < 0.05$ respecto al estímulo.

Los antioxidantes apocinina 100 μ M y NAC 1mM así como el análogo de AMPc 1mM y el inhibidor de ERK1/2 PD98059 10 μ M suprimen de manera parcial el incremento de expresión de COL1A y α -SMA a nivel proteico y molecular inducido por EHT 2,5% (figura 23 A-B).

4.Resultados

Por otra parte, ACL 10⁻⁷M y AChE 10U/ml también fueron capaces de suprimir estos efectos en los fibroblastos de bronquio humano lo que implica la intervención del sistema colinérgico no neuronal en la regulación de marcadores de miofibroblastos (figura 24A-B).

Para profundizar en la implicación del sistema colinérgico no neuronal en la transformación de fibroblastos a miofibroblastos, los fibroblastos pulmonares se incubaron; con el inhibidor del transportador de la colina (Hemicolina-3 a una concentración de 50µM), o con el inhibidor de la acetilcolinesterasa (Neostigmina 10µM), previamente a la exposición con EHT 2,5%. Hemicolina-3 inhibió de manera significativa el incremento de expresión de COL1A y α-SMA a nivel proteico y molecular inducido por EHT 2,5%, mientras que la Neostigmina produjo el efecto contrario (figura 24C-D).



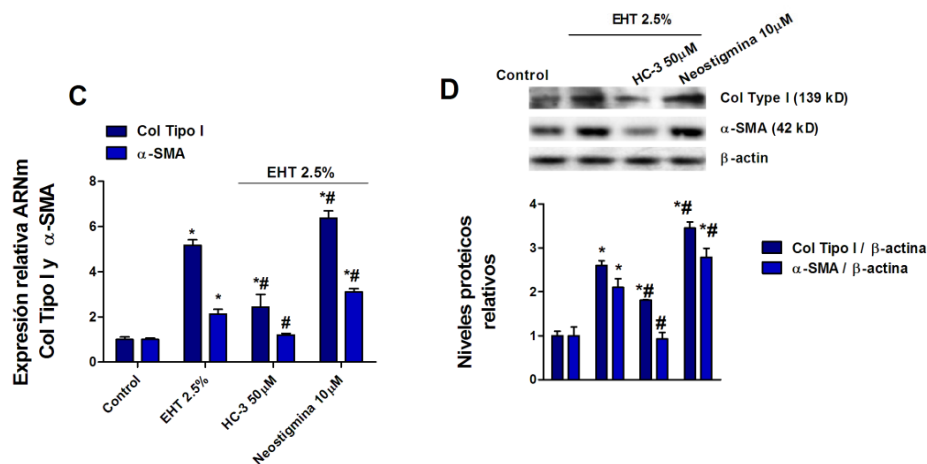


FIGURA 24. Extracto de humo de tabaco al 2,5% (EHT) induce la expresión de colágeno tipo I (COL1A) y α -actina de musculo liso (α -SMA) mediado parcialmente por el sistema colinérgico no neuronal.

Los fibroblastos de pulmón humano fueron preincubados durante 30 min con acilidinium (ACL: 10^{-7} M), apocinina (APO: $100 \mu\text{M}$), N-acetyl- -cysteina (NAC: 1 mM), PD98059 ($10 \mu\text{M}$), dbcAMP (1 mM), acetilcolinesterasa (AChE: 10 U/ml), hemicolina-3 (HC-3: $50 \mu\text{M}$) o neostigmina ($10 \mu\text{M}$) a continuación, se estimuló con EHT 2.5% durante 24 h.

Tras la estimulación se extrajo ARN total (A y C) o proteína total (B y D) para cuantificar la expresión a nivel molecular y proteico de COL1A o α -SMA empleando los primers o los anticuerpos apropiados.

Las gráficas A y C representan los valores de expresión de relativa de ARNm de COL1A y α -SMA normalizada frente al grupo control usando GAPDH como control interno.

Las gráficas B y D representan valores de densitometría de la expresión proteica de COL1A (A) o α -SMA (B) 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 3-4 experimentos independientes por condición (A-D).

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.

En ausencia de EHT 2,5%. Las distintas sustancias ensayadas no muestran ningún efecto *per se* sobre los marcadores de miofibroblastos, ni sobre la fosforilación de ERK1/2 (figura 25 A y B).

4.Resultados

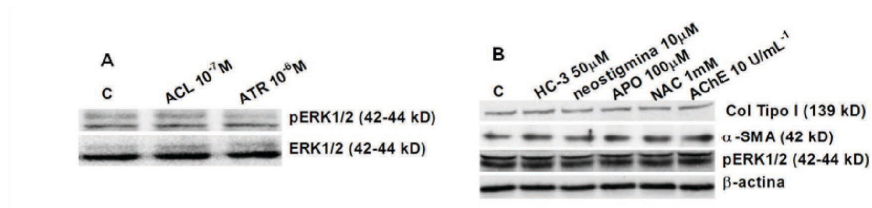
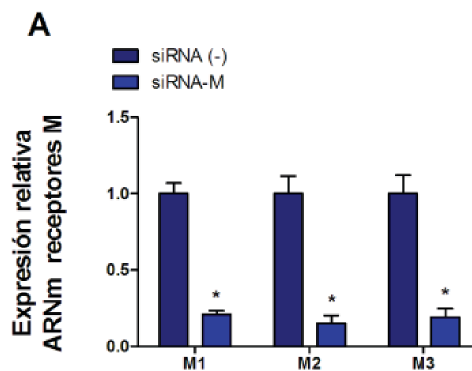


FIGURA 25 Las distintas sustancias ensayadas *per se* no muestran ningún efecto sobre los marcadores de miofibroblastos

Los fibroblastos de pulmón humano fueron incubados con ACL, Atropina, HC-3, Neostigmina, APO, NAC AChE a las concentraciones indicadas. Tras la incubación se extrajo proteína total. Se muestran las imágenes de western blot de la expresión proteica de COL1A o α-SMA y ERK1/2 relativa a β-actina.

4.2.4. EHT PROMUEVE LA SOBREENPRESION DE MARCADORES DE MIOFIBROBLASTOS PARCIALMENTE MEDIADO POR M1, M2 AND M3:

Los receptores M1, M2 y M3 de fibroblastos de bronquio humano se silenciaron de manera selectiva, sin afectar a la expresión del resto de receptores muscarínicos (Figura 26 A y B). El silenciamiento de los tres subtipos de receptores produjo una inhibición de la inducción de marcadores de miofibroblastos COL1A y α-SMA provocada por EHT 2,5 % (Figura 26 C), lo cual indica que los tres subtipos están implicados en la activación de fibroblastos pulmonares.



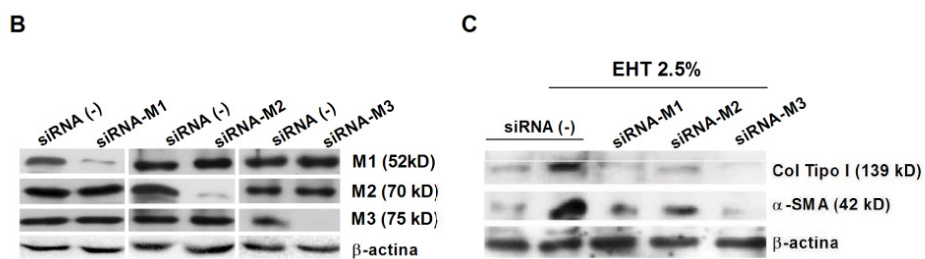


FIGURA 26. Extracto de humo de tabaco (EHT) induce la transición fibroblasto -- miofibroblasto por la activación del sistema colinérgico no neuronal vía M1, M2 y M3.

Los fibroblastos de pulmón humano fueron selectivamente trasfectados con ARN de silenciamiento (siARN: 50 nM) para M1, M2 y M3 o con control negativo RNA(-) durante 48h, empleando lipofectamina a una concentración final de 2 µg/ml. (A y B)

El silenciamiento de los receptores M1, M2 and M3 es capaz de reducir a nivel proteico y molecular y de manera significativa la expresión de dichos receptores sin afectar al resto de receptores muscarínicos. β-actina fue empleada como control positivo. El silenciamiento de los receptores M1, M2 and M3 atenúa la sobreexpresión de Col tipo I y α-SMA inducida por EHT 2.5%

Cada gráfica representa la media de 3 experimentos independientes por condición. El análisis estadístico de los datos se ha llevado a cabo mediante un análisis de varianza (ANOVA) con $p < 0.001$ (A). La comparación entre dos grupos se ha realizado mediante el test post hoc Bonferroni-Holm. * $P < 0.05$ comparado con control negativo RNA(-)



5. Discusión:

5.1 ESTUDIO 1:

Los resultados obtenidos en el primer estudio describen la implicación del sistema colinérgico no neuronal en la transición fibroblasto - miofibroblasto aportando evidencias para el uso de anticolinérgicos en las enfermedades pulmonares con remodelado de las vías aéreas. Los miofibroblastos se caracterizan por secretar componentes de la matriz extracelular tales como el COL1A (característica compartida con fibroblastos) y por la formación de sistemas contráctiles como los microfilamentos de α -SMA (característica que comparte con células de músculo liso bronquial). Por otra parte, los miofibroblastos muestran una alta capacidad proliferativa y migratoria bajo condiciones inflamatorias [72]. Recientes evidencias en ensayos *in vivo* en humanos han mostrado que la inhalación de agonistas muscarínicos (metacolina) promueven el sobrecrecimiento y la dediferenciación a miofibroblastos, a partir de células del músculo liso bronquial, a nivel submucoso contribuyendo al engrosamiento de la pared muscular bronquial [128]. Estos datos, junto con la capacidad de la ACh de promover la proliferación celular y la secreción de colágeno en fibroblastos, sugiere que el sistema colinérgico podría estar involucrado en la transición fibroblasto - miofibroblasto contribuyendo al incremento de la población celular de miofibroblastos que ha sido observada en pulmones de pacientes con asma o EPOC.

Hasta ahora, los datos disponibles sobre los efectos de agonistas muscarínicos en fibroblastos pulmonares, se limitaba a aportar información sobre la proliferación y la síntesis de colágeno [82, 129, 136]. En la presente tesis se describe que COL1A y la formación de microfilamentos de α -SMA está regulada al alza tras la exposición con CCh. Además se demuestra el vínculo existente entre el sistema colinérgico y el de TGF- β 1. Evidencias previas demostraron que la estimulación de receptores colinérgicos puede aumentar la expresión y liberación de TGF- β en diferentes tipos celulares [135, 137]. Recientemente se ha observado que fibroblastos pulmonares estimulados con IL-1 β , TNF- α o extracto de humo de tabaco (EHT) sobreexpresan

5. Discusión

ChAT, lo cual sugiere la presencia de un sistema colinérgico no neuronal en fibroblastos pulmonares[84].

En este estudio, el agonista muscarínico CCh, es capaz de incrementar la expresión y secreción de TGF- β 1, y este activar el sistema colinérgico no neuronal, lo cual podría explicar que la inducción de COL1A y α -SMA producida tras la estimulación colinérgica sea parcialmente inhibida al adicionar un anticuerpo anti-TGF- β 1. Además, ACL fue capaz de reducir significativamente la expresión y secreción de TGF- β 1 inducida por CCh, lo que indica que los receptores muscarínicos, están involucrados en este proceso. A su vez, el TGF- β 1 es capaz de aumentar la expresión ChAT y, más interesante, la adición de la AChE suprime el incremento de COL1A y α -SMA inducido por TGF- β 1. Todos estos resultados sugieren que el TGF- β 1 activa el sistema colinérgico no neuronal, y que ambas vías están relacionadas.

CCh y TGF- β 1 inducen la transición fibroblasto – miofibroblasto provocando alteraciones en marcadores celulares, así como en la expresión de receptores muscarínicos. El patrón de expresión de receptores muscarínicos en fibroblastos de pulmón se ha estudiado recientemente en detalle [138], sin embargo, los datos disponibles de la expresión de dichos receptores en miofibroblastos son escasos. Los fibroblastos de pulmón humano expresan grandes cantidades del transcrito M2 seguido de M1 y, en menor medida, M3 [84, 138], lo cual se ajusta con nuestros resultados (figura 15). Cabe destacar que CCh y TGF- β 1 incrementan la expresión proteica de M1 y M3 y reducen la expresión de M2 tras 48 h de exposición. Hallazgos similares se muestran en fibroblastos de pulmón después de la exposición con IL-1 β , TNF- α o EHT [84], así como en fibroblastos pulmonares de pacientes EPOC que muestran el mismo patrón de expresión (regulación al alza de M1 y M3 y una disminución de la expresión de M2 con respecto a sujetos control) [84]. Resultados anteriores también mostraron que el TGF- β 1 reduce la expresión de M2 en fibroblastos de pulmón de embriones humanos [65] y puede aumentar la expresión de M3 en células de músculo liso [139]. El fenotipo de miofibroblastos posee características morfológicas y bioquímicas intermedias entre fibroblastos y células de músculo liso, por lo que la regulación al alza de M1 y M3, que se da tras

5. Discusión

la transición a miofibroblastos podría estar relacionada con su alta capacidad contráctil [140]. Estos resultados son coherentes con conclusiones obtenidas en experimentos previos *in vivo*, donde M3 y, en menor medida, M1 están acoplados a proteínas Gq y por lo tanto contribuyen a la contracción de la musculatura lisa bronquial y traqueal [69]. En nuestro contexto se concluyó que el antimuscarínico ACL atenúo la regulación al alza de M1 y M3 inducida por CCh y TGF- β 1, lo cual se correlaciona con el efecto inhibitorio del ACL en la transición fibroblastos a miofibroblastos.

No está claro si existe un receptor muscarínico específico implicado en la transición fibroblastos – miofibroblastos. Hasta ahora, M2 estaba considerado como el subtipo de receptor principal responsable de la proliferación de fibroblastos y la síntesis de colágeno. Recientemente, los resultados de estudios con fibroblastos de pulmón muestran que todos los receptores muscarínicos están involucrados en la proliferación de fibroblastos [84]. El presente estudio, intenta profundizar en dicha afirmación mediante una intervención farmacológica (antagonistas de M1, M2 y M3), así como con técnicas genéticas que permiten el silenciamiento específico de cada receptor (siARNs de M1, M2 y M3). Demostrando, que la regulación al alza del COL1A y α -SMA, y por lo tanto la transición a miofibroblastos, está mediada por los tres tipos de receptores muscarínicos.

También existen evidencias de la implicación de ERK1 / 2 en la síntesis de colágeno y en la proliferación de fibroblastos inducida por agonistas muscarínicos [84, 129, 136]. Este trabajo describe como CCh y TGF- β 1 inducen la fosforilación de ERK1 / 2, y que este efecto es bloqueado de manera efectiva por ACL. Por otra parte, PD98059, el inhibidor específico de ERK1 / 2, atenúa la expresión de COL1A y α -SMA inducida por CCh, así como la expresión y secreción de TGF- β 1. Se observaron resultados similares para la activación de RhoA y para la depleción de los niveles intracelulares de AMPc, concluyendo que ambas vías están implicadas en la transición en estudio. ACL demostró inhibir la formación de RhoA-GTP y prevenir la mencionada disminución de los niveles de AMPc inducida por CCh. Del mismo modo, el inhibidor de la Rho-quinasa, Y27632 y dbcAMP fueron capaces de inhibir la transición fibroblasto – miofibroblasto.

5. Discusión

Estos datos refuerzan que, ERK1 / 2, RhoA-GTP y AMPc actúan como mensajeros intracelulares que contribuyen a la transición fibroblasto – miofibroblasto inducida por agonista colinérgico y TGF- β 1; ambas vías interactúan para inducir la transición en estudio. Y se evidencia que, el antagonista muscarínico ACL es un potente inhibidor de dicha transición inducida mediante exposición a CCh o TGF- β 1. Por tanto, además de su actividad broncodilatadora, podría desempeñar un papel en la regulación del remodelado fibrótico que tiene lugar en enfermedades inflamatorias crónicas como la EPOC.

5.2. ESTUDIO 2:

Los resultados obtenidos en el segundo estudio evidencian el efecto anti-remodelado de ACL en fibroblastos de bronquio humano cuando han sido expuestos a humo de tabaco. Lo que sugiere que dicho fármaco puede contribuir a la mejora de la fibrosis peribronquiolar observada en pacientes EPOC fumadores.

La transformación de fibroblastos pulmonares a miofibroblastos, está considerado como un paso clave en el proceso de engrosamiento de las paredes de los bronquiolos, reduciendo la luz aérea e incrementando la limitación al flujo aéreo.

Como se ha descrito a lo largo de esta tesis doctoral, los miofibroblastos comparten características fenotípicas con fibroblastos y con células de musculo liso. Cabe destacar que se caracterizan por la secreción de componentes de matriz extracelular como COL1A, característica que comparten con fibroblastos pero no con células de musculo liso, y por la formación de fibras contráctiles de α -SMA, característica que comparten con células de musculo liso pero no con fibroblastos [72]. Es por eso que se seleccionaron sendos marcadores para determinar el fenotipo de miofibroblasto, mismos marcadores empleados en el estudio 1

Varios factores de crecimiento y mediadores proinflamatorios como TGF β 1, IL-13 o CTGF han sido descritos como inductores de la transición a miofibroblasto [71]; sin embargo no hay datos disponibles sobre el efecto del humo de tabaco, principal

5. Discusión

factor de riesgo de la EPOC. En este trabajo, se emplea EHT tal y como se describe previamente [141, 142], que corresponde aproximadamente con un hábito fumador de medio paquete/día o de 2 paquetes /día equivalente a EHT 2,5% y al EHT 10% respectivamente.

Actualmente, diversos estudios *in vitro* se han centrado en el efecto de EHT sobre fibroblastos pulmonares, pero no existen datos disponibles del efecto del EHT sobre la transición de fibroblastos a miofibroblastos. En este estudio, evidenciamos que el EHT promueve la sobreexpresión de marcadores de miofibroblastos, y por tanto con la transición a fenotipo miofibroblasto [72].

Además, el EHT promueve esta transición mediado por ERO, de manera significativa tras 2h - 24h de exposición. El incremento de ERO precede a la sobreexpresión de COL1A y α -SMA (tras 48h), lo cual sugiere que ERO poseen un importante rol como segundo mensajero. Estudios previos en fibroblastos pulmonares humanos, muestran resultados similares de tiempo respuesta en la producción de ERO[130].

La producción de ERO intracelular en respuesta a la exposición a EHT esta mediado por la activación directa del complejo NADPH oxidasa [143]. Dicho complejo está constituido por varias unidades; de membrana plasmática y citosólicas; que pueden variar en función del tipo celular. En fibroblastos de pulmón humano los componentes de la NADPH presentes son p47phox, p67phox, p22phox and NOX4 [144].

Evidenciamos que las subunidades p67phox y NOX4 de la NADPH oxidasa son las más abundantes en fibroblastos bronquiales. La subunidad p67phox se moviliza bajo ciertas condiciones para activar las unidades plasmáticas de membrana NOX1, NOX2 o NOX3 y producir $O^{\cdot -}$ y/o H_2O_2 . En contraste, la unidad de membrana plasmática NOX4 no requiere de la interacción ni de la activación por parte de subunidades citosólicas reguladoras, por eso su activación está directamente relacionada con su expresión [133]. En este sentido, en esta tesis se observa como EHT es capaz de inducir la sobreexpresión de ambas subunidades; p67phox y NOX4 tras 24 h de estimulación, lo cual está en concordancia con el incremento de ERO intracelular.

5. Discusión

Recientes artículos, muestran que la expresión de NOX4 es un factor clave en la activación de fibroblastos [145]. También que tratamientos capaces de disminuir NOX4, y en consecuencia ERO intracelular, puede prevenir la transición a miofibroblasto. Nuestros resultados demuestran que un antioxidante como NAC o un inhibidor de la NADPH oxidasa (apocinina) son capaces de inhibir la sobreexpresión de p67phox y NOX4 ocasionada por una exposición a EHT durante 24 h. Las sustancias antioxidantes fueron también capaces de reducir la expresión de marcadores de miofibroblastos inducida por EHT, estableciendo de este modo el vínculo entre el estrés oxidativo y la activación de fibroblastos pulmonares.

El tratamiento anticolinérgico con ACL atenúa la expresión de marcadores de miofibroblastos inducida por EHT y este efecto está mediado, en parte, por una menor expresión de p67phox y NOX4, así como por una reducción consecuente del ERO intracelular. Estos resultados sugieren que EHT activa el sistema colinérgico no neuronal. Bibliografía previa, sugiere que el humo de tabaco puede activar el sistema colinérgico no neuronal en diferentes tipos celulares, incluyendo fibroblastos de bronquio humano. Por ejemplo; recientemente nuestro grupo de investigación ha publicado como el EHT promueve la síntesis y liberación de mucina MUC5AC en células epiteliales de bronquio humano diferenciadas, por un mecanismo mediado por la liberación de Ach, y como es inhibido dicho efecto por ACL [92]. Además, fibroblastos de bronquio humano de pacientes EPOC muestran un incremento de receptores M, así como de la expresión de ChAT, un efecto que fue mimetizado en fibroblastos pulmonares de pacientes sanos tras exponerlos a EHT[84].

En nuestros experimentos, AChE previene la sobreexpresión de marcadores de miofibroblastos inducida por EHT, lo cual aboga por la presencia del sistema colinérgico o neuronal. Otra evidencia que soporta la activación de este sistema por EHT incluye la sobreexpresión de ChAT, enzima intracelular responsable de la síntesis de Ach. Se observa como el EHT es capaz de provocar un incremento de expresión de ChAT, y como dicho efecto es prevenido por los antioxidantes NAC y apocinina, así como por ACL, lo cual sugiere la implicación de ERO intracelular. Además, la participación del sistema colinérgico no neuronal se evidencia con la

5. Discusión

inhibición de la transición a miofibroblasto al bloquear la captación de colina por la hemicolina y con la activación de la transición a miofibroblasto al inhibir la AchE con neostigmina.

Actualmente se conoce que el humo de tabaco contiene más de 6000 compuestos, y posiblemente esta lista continúe creciendo debido a la disponibilidad de nuevas técnicas analíticas [146]. Teniendo en cuenta esta consideración, cabe destacar que el EHT, tiene la ventaja que contiene todos los componentes inhalados por los fumadores. Sin embargo, debido a la elevada complejidad del EHT, es muy difícil identificar el agente específico que medie un efecto en concreto, de hecho, estudios previos, muestran para determinados agentes del EHT diferencias según concentración y duración de la exposición. En esta línea, realizar un estudio de dosis-respuesta y dosis-tiempo permite calcular a groso modo la exposición que mimetiza a la de un sujeto fumador. Así, por ejemplo, bajas concentraciones de EHT (menos del 5%) han mostrado efectos sobre la proliferación de fibroblastos de pulmón [147-149], mientras que las concentraciones más altas (más de 10%) muestran efectos inhibitorios sobre la proliferación de fibroblastos de pulmón [89], lo que indica que entre las aproximadamente 6.000 sustancias presentes en el de humo de cigarrillo, hay algunas con actividad proliferativa y otras anti-proliferativa que actuarán en función de un equilibrio final. Incluso pudiendo calcular la exposición *in vivo*, los experimentos realizados con EHT no pueden reproducir todos los componentes del microambiente existente en un organismo vivo (como interacciones célula-célula). A pesar de ello, los resultados de este estudio permiten determinar el efecto de EHT sobre ciertas funciones celulares, eliminando las variables lógicas de trabajar en ensayos *in vitro*.

En el presente trabajo se ha empleado EHT 2.5%; lo cual concuerda con las dosis empleadas en estudios previos, en los que se emplearon concentraciones bajas de EHT, con los consiguientes efectos proliferativos [147-149], respaldando la transición de fibroblasto a miofibroblasto [150].

AMPc intracelular es un segundo mensajero que media numerosos procesos antiinflamatorios. Además de este efecto, también controla la inhibición de la activación de fibroblastos, así como su transición a miofibroblasto[151]. De hecho,

5. Discusión

un descenso de los niveles de AMPc puede promover la transición fibroblasto--miofibroblasto. Este hecho está evidenciado por TGF β 1, el cual es capaz de incrementar la expresión y actividad de fosfodiesterasas, las enzimas que degradan el AMPc, promoviendo la transición en estudio [152,153].

En esta tesis, se observó que EHT disminuye los niveles intracelulares de AMPc y que este efecto se revierte parcialmente por el antioxidante NAC y con ACL, lo que sugiere el papel de ERO intracelular. Además, AChE también atenúa la reducción de AMPc provocada por EHT, lo que indica la implicación del sistema colinérgico no neuronal. Esto puede explicarse por el hecho de que el receptor M expresado de manera mayoritaria en fibroblastos de pulmón es el M2 [65], que está acoplado a una proteína Gi, por tanto la estimulación de M2 por un mediador cuyo origen es el sistema colinérgico no neuronal también podría promover la inhibición de la vía adenilato ciclasa (AC) / AMPc, y por lo tanto, la transición de miofibroblastos.

Otra ruta estudiada es la vía de señalización de ERK1/2. En el estudio 1 se ha demostrado que ERK1 / 2 participa en la transición fibroblastos-miofibroblastos al igual que en artículos recientes [154] y que el EHT fosforila directamente ERK1 / 2 [84]. Por lo tanto, la transición fibroblasto miofibroblasto inducida por EHT podría estar mediada en parte por ERK1 / 2. En este trabajo, se observó que el EHT indujo la fosforilación de ERK1 / 2, y como dicho efecto fue reducido por ACL y por el tratamiento antioxidante. Además, AChE también atenúa la fosforilación de ERK1 / 2 inducida por EHT, lo que sugiere que la activación de los receptores M está también implicado. Resultados anteriores apoyan la noción de que la activación del receptor M aumenta la expresión de COL1A en los fibroblastos de pulmón humano por medio de la activación de ERK1 / 2 [82]. Por lo tanto, un sistema colinérgico no neuronal también puede participar en el proceso de fosforilación de ERK1 / 2, inducida por EHT. De hecho, el papel de ERK1 / 2 en la transición a miofibroblasto fue confirmada por el efecto inhibitor del antagonista de ERK1 / 2; PD98059.

Basándose en estos resultados, se puede concluir que el EHT activa los receptores M en fibroblastos de bronquio humano por un sistema colinérgico no neuronal, y que este mecanismo está implicado en la regulación al alza de los

5. Discusión

marcadores de miofibroblastos. Sin embargo, la respuesta a cual es la isoforma del receptor M que desempeña un papel importante en este mecanismo no está clara. Se ha demostrado que la inhibición de la proteína Gi con toxina *pertussis* reduce la proliferación de fibroblastos y la expresión de colágeno observados en respuesta a los agonistas muscarínicos [82], lo que sugiere un papel clave para el receptor M2. Sin embargo, los antagonistas de M1, M2 y M3 fueron efectivos en la inhibición de la proliferación de fibroblastos inducida por Ach [84], aunque los antagonistas de M específicos disponibles no son totalmente selectivos [155]. Para abordar esta cuestión, hemos silenciado selectivamente M1, M2 y M3 con siARN. Nuestros resultados sugieren que todos los receptores M1, M2 y M3 participan en la expresión de marcadores de miofibroblastos inducida por EHT.

En resumen, hemos demostrado que el humo de tabaco, principal factor de riesgo de la EPOC, participa en la remodelación pulmonar, aumentando los marcadores de miofibroblasto COL1A y α -SMA a través de la activación del sistema colinérgico no neuronal, y como dicho efecto es atenuado por el anticolinérgico ACL. Por lo tanto, los resultados observados en este segundo estudio avalan que ACL puede jugar un papel regulatorio en los procesos del remodelado de la EPOC como la fibrosis peribronquiolar, en adición a su actividad broncodilatadora clásica.



6. Conclusiones:

1. CCh activa la transición fibroblasto -- miofibroblasto vía: Fosforilación ERK 1/2 ; depleción de los niveles de AMPc intracelulares y activación de RhoA
2. TGF- β 1 activa la transición fibroblasto – miofibroblasto a través de la activación del sistema colinérgico no neuronal
3. El EHT provoca un incremento de los marcadores de miofibroblastos COL1A y α -SMA en fibroblastos de bronquio humano a través de un mecanismo en el que interviene: el incremento de ERO intracelular, la depleción de los niveles de AMPc y la fosforilación de ERK1/2
4. Las vías estudiadas interactúan entre sí dando lugar a la activación de fibroblastos.
5. La transición en estudio esta mediada por los receptores M1, M2 y M3.
6. ACL es un potente inhibidor de dicha transición inducida mediante exposición a CCh o TGF- β 1.
7. ACL es capaz de atenuar el incremento de los marcadores de miofibroblastos, actuando sobre la generación de ERO, la depleción de niveles de AMPc, la fosforilación de ERK1/2 y la expresión de ChAT inducida por el EHT.
8. Por tanto, ACL además de su actividad broncodilatadora, puede desempeñar un papel en la regulación del remodelado fibrótico que tiene lugar en las enfermedades inflamatorias crónicas como la EPOC.

6.Conclusiones

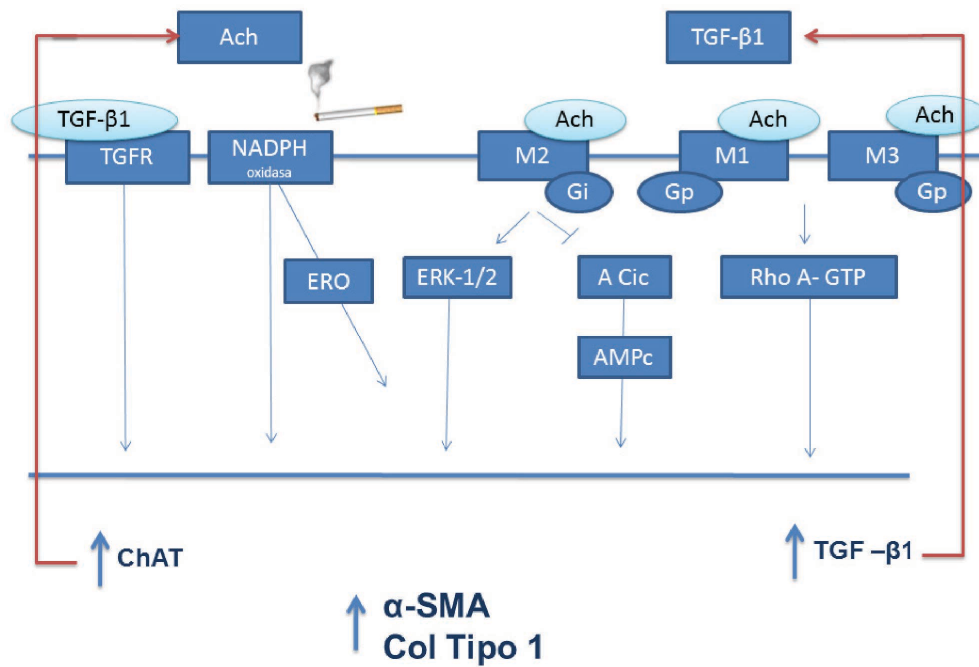


FIGURA 27 .Esquema que refleja el mecanismo propuesto para transición fibroblasto - miofibroblasto desencadenada por Carbacol (CCh), factor de crecimiento transformante-β1 (TGF-β1) y EHT.



7. Referencias Bibliográficas:

7. Referencias bibliográficas

1. Orozco-Levi M, Garcia-Aymerich J, Villar J, Ramirez-Sarmiento A, Anto JM, Gea J. Wood smoke exposure and risk of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2006; 27(3): 542-546.
2. Perez-Padilla R, Regalado J, Vedal S, Pare P, Chapela R, Sansores R, Selman M. Exposure to biomass smoke and chronic airway disease in Mexican women. A case-control study. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154(3 Pt 1): 701-706.
3. Celli BR, MacNee W. Standards for the diagnosis and treatment of patients with COPD: a summary of the ATS/ERS position paper. *Eur Respir J* 2004; 23(6): 932-946.
4. Gomez FP, Rodriguez-Roisin R. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) guidelines for chronic obstructive pulmonary disease. *Curr Opin Pulm Med* 2002; 8(2): 81-86.
5. Cerveri I, Corsico AG, Accordini S, Niniano R, Ansaldo E, Anto JM, Kunzli N, Janson C, Sunyer J, Jarvis D, Svanes C, Gislason T, Heinrich J, Schouten JP, Wjst M, Burney P, de Marco R. Underestimation of airflow obstruction among young adults using FEV1/FVC <70% as a fixed cut-off: a longitudinal evaluation of clinical and functional outcomes. *Thorax* 2008; 63(12): 1040-1045.
6. Pellegrino R, Viegi G, Brusasco V, Crapo RO, Burgos F, Casaburi R, Coates A, van der Grinten CP, Gustafsson P, Hankinson J, Jensen R, Johnson DC, MacIntyre N, McKay R, Miller MR, Navajas D, Pedersen OF, Wanger J. Interpretative strategies for lung function tests. *Eur Respir J* 2005; 26(5): 948-968.
7. Johannessen A, Omenaas ER, Bakke PS, Gulsvik A. Implications of reversibility testing on prevalence and risk factors for chronic obstructive pulmonary disease: a community study. *Thorax* 2005; 60(10): 842-847.
8. Tirimanna PR, van Schayck CP, den Otter JJ, van Weel C, van Herwaarden CL, van den Boom G, van Grunsven PM, van den Bosch WJ. Prevalence of asthma and COPD in general practice in 1992: has it changed since 1977? *Br J Gen Pract* 1996; 46(406): 277-281.
9. Halbert RJ, Natoli JL, Gano A, Badamgarav E, Buist AS, Mannino DM. Global burden of COPD: systematic review and meta-analysis. *Eur Respir J* 2006; 28(3): 523-532.
10. Halbert RJ, Isonaka S, George D, Iqbal A. Interpreting COPD prevalence estimates: what is the true burden of disease? *Chest* 2003; 123(5): 1684-1692.
11. van den Boom G, van Schayck CP, van Mollen MP, Tirimanna PR, den Otter JJ, van Grunsven PM, Buitendijk MJ, van Herwaarden CL, van Weel C. 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): 1730-1738.
12. Hnizdo E, Glindmeyer HW, Petsonk EL, Enright P, Buist AS. Case definitions for chronic obstructive pulmonary disease. *COPD* 2006; 3(2): 95-100.
13. Roberts SD, Farber MO, Knox KS, Phillips GS, Bhatt NY, Mastronarde JG, Wood KL. FEV1/FVC ratio of 70% misclassifies patients with obstruction at the extremes of age. *Chest* 2006; 130(1): 200-206.

7. Referencias bibliográficas

14. Celli BR, Halbert RJ, Isonaka S, Schau B. Population impact of different definitions of airway obstruction. *Eur Respir J* 2003; 22(2): 268-273.
15. Hankinson JL, Crapo RO, Jensen RL. Spirometric reference values for the 6-s FVC maneuver. *Chest* 2003; 124(5): 1805-1811.
16. Soriano JB, Maier WC, Egger P, Visick G, Thakrar B, Sykes J, Pride NB. Recent trends in physician diagnosed COPD in women and men in the UK. *Thorax* 2000; 55(9): 789-794.
17. Chapman KR. Chronic obstructive pulmonary disease: are women more susceptible than men? *Clin Chest Med* 2004; 25(2): 331-341.
18. Schellevis FG, Van de Lisdonk EH, Van der Velden J, Hoogbergen SH, Van Eijk JT, Van Weel C. Consultation rates and incidence of intercurrent morbidity among patients with chronic disease in general practice. *Br J Gen Pract* 1994; 44(383): 259-262.
19. Lopez AD, Shibuya K, Rao C, Mathers CD, Hansell AL, Held LS, Schmid V, Buist S. Chronic obstructive pulmonary disease: current burden and future projections. *Eur Respir J* 2006; 27(2): 397-412.
20. Murray CJ, Lopez AD, Jamison DT. The global burden of disease in 1990: summary results, sensitivity analysis and future directions. *Bull World Health Organ* 1994; 72(3): 495-509.
21. Murray CJ, Lopez AD. Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: Global Burden of Disease Study. *Lancet* 1997; 349(9064): 1498-1504.
22. Celli BR, Halbert RJ, Nordyke RJ, Schau B. Airway obstruction in never smokers: results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Am J Med* 2005; 118(12): 1364-1372.
23. Behrendt CE. Mild and moderate-to-severe COPD in nonsmokers: distinct demographic profiles. *Chest* 2005; 128(3): 1239-1244.
24. Stoller JK, Snider GL, Brantly ML, Fallat RJ, Stockley RA, Turino GM, Konietzko N, Dirksen A, Eden E, Luisetti M, Stolk J, Strange C. [American Thoracic Society/European Respiratory Society Statement: Standards for the diagnosis and management of individuals with alpha-1 antitrypsin deficiency]. *Pneumologie* 2005; 59(1): 36-68.
25. Soler Artigas M, Loth DW, et al. Genome-wide association and large-scale follow up identifies 16 new loci influencing lung function. *Nat Genet* 2011; 43(11): 1082-1090.
26. Jindal SK, Aggarwal AN, Chaudhry K, Chhabra SK, D'Souza GA, Gupta D, Katiyar SK, Kumar R, Shah B, Vijayan VK. A multicentric study on epidemiology of chronic obstructive pulmonary disease and its relationship with tobacco smoking and environmental tobacco smoke exposure. *Indian J Chest Dis Allied Sci* 2006; 48(1): 23-29.
27. Eisner MD, Balmes J, Katz PP, Trupin L, Yelin EH, Blanc PD. Lifetime environmental tobacco smoke exposure and the risk of chronic obstructive pulmonary disease. *Environ Health* 2005; 4(1): 7.
28. Tager IB, Ngo L, Hanrahan JP. Maternal smoking during pregnancy. Effects on lung function during the first 18 months of life. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152(3): 977-983.

7. Referencias bibliográficas

29. Trupin L, Earnest G, San Pedro M, Balmes JR, Eisner MD, Yelin E, Katz PP, Blanc PD. The occupational burden of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2003; 22(3): 462-469.
30. Hnizdo E, Sullivan PA, Bang KM, Wagner G. 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): 738-746.
31. Hnizdo E, Sullivan PA, Bang KM, Wagner G. Airflow obstruction attributable to work in industry and occupation among U.S. race/ethnic groups: a study of NHANES III data. *Am J Ind Med* 2004; 46(2): 126-135.
32. Ezzati M. Indoor air pollution and health in developing countries. *Lancet* 2005; 366(9480): 104-106.
33. Boman C, Forsberg B, Sandstrom T. Shedding new light on wood smoke: a risk factor for respiratory health. *Eur Respir J* 2006; 27(3): 446-447.
34. Sezer H, Akkurt I, Guler N, Marakoglu K, Berk S. A case-control study on the effect of exposure to different substances on the development of COPD. *Ann Epidemiol* 2006; 16(1): 59-62.
35. MacNee W. Pulmonary and systemic oxidant/antioxidant imbalance in chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* 2005; 2(1): 50-60.
36. Xu X, Weiss ST, Rijcken B, Schouten JP. Smoking, changes in smoking habits, and rate of decline in FEV1: new insight into gender differences. *Eur Respir J* 1994; 7(6): 1056-1061.
37. Mannino DM, Homa DM, Akinbami LJ, Ford ES, Redd SC. Chronic obstructive pulmonary disease surveillance--United States, 1971-2000. *Respir Care* 2002; 47(10): 1184-1199.
38. Anthonisen NR, Connett JE, Kiley JP, Altose MD, Bailey WC, Buist AS, Conway WA, Jr., Enright PL, Kanner RE, O'Hara P, et al. Effects of smoking intervention and the use of an inhaled anticholinergic bronchodilator on the rate of decline of FEV1. The Lung Health Study. *JAMA* 1994; 272(19): 1497-1505.
39. Silverman EK, Weiss ST, Drazen JM, Chapman HA, Carey V, Campbell EJ, Denish P, Silverman RA, Celedon JC, Reilly JJ, Ginns LC, Speizer FE. Gender-related differences in severe, early-onset chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162(6): 2152-2158.
40. Retamales I, Elliott WM, Meshi B, Coxson HO, Pare PD, Scieurba FC, Rogers RM, Hayashi S, Hogg JC. Amplification of inflammation in emphysema and its association with latent adenoviral infection. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164(3): 469-473.
41. Sethi S, Maloney J, Grove L, Wrona C, Berenson CS. Airway inflammation and bronchial bacterial colonization in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 173(9): 991-998.
42. Seemungal T, Harper-Owen R, Bhowmik A, Moric I, Sanderson G, Message S, Maccallum P, Meade TW, Jeffries DJ, Johnston SL, Wedzicha JA. Respiratory viruses,

7. Referencias bibliográficas

symptoms, and inflammatory markers in acute exacerbations and stable chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164(9): 1618-1623.

43. Barker DJ, Godfrey KM, Fall C, Osmond C, Winter PD, Shaheen SO. Relation of birth weight and childhood respiratory infection to adult lung function and death from chronic obstructive airways disease. *BMJ* 1991; 303(6804): 671-675.

44. Tager IB, Segal MR, Speizer FE, Weiss ST. The natural history of forced expiratory volumes. Effect of cigarette smoking and respiratory symptoms. *Am Rev Respir Dis* 1988; 138(4): 837-849.

45. Shaheen SO, Barker DJ, Shiell AW, Crocker FJ, Wield GA, Holgate ST. The relationship between pneumonia in early childhood and impaired lung function in late adult life. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 149(3 Pt 1): 616-619.

46. Prescott E, Lange P, Vestbo J. Socioeconomic status, lung function and admission to hospital for COPD: results from the Copenhagen City Heart Study. *Eur Respir J* 1999; 13(5): 1109-1114.

47. Coxson HO, Chan IH, Mayo JR, Hlynsky J, Nakano Y, Birmingham CL. Early emphysema in patients with anorexia nervosa. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 170(7): 748-752.

48. Hogg JC. Pathophysiology of airflow limitation in chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet* 2004; 364(9435): 709-721.

49. Saetta M, Turato G, Maestrelli P, Mapp CE, Fabbri LM. Cellular and structural bases of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163(6): 1304-1309.

50. Hogg JC, Chu F, Utokaparch S, Woods R, Elliott WM, Buzatu L, Cherniack RM, Rogers RM, Sciurba FC, Coxson HO, Pare PD. The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2004; 350(26): 2645-2653.

51. Cosio MG, Majo J. Inflammation of the airways and lung parenchyma in COPD: role of T cells. *Chest* 2002; 121(5 Suppl): 160S-165S.

52. Wright JL, Levy RD, Churg A. Pulmonary hypertension in chronic obstructive pulmonary disease: current theories of pathogenesis and their implications for treatment. *Thorax* 2005; 60(7): 605-609.

53. Stockley RA. Neutrophils and the pathogenesis of COPD. *Chest* 2002; 121(5 Suppl): 151S-155S.

54. Barnes PJ. Mediators of chronic obstructive pulmonary disease. *Pharmacol Rev* 2004; 56(4): 515-548.

55. Rahman I. Oxidative stress in pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease: cellular and molecular mechanisms. *Cell Biochem Biophys* 2005; 43(1): 167-188.

56. MacNee W. Oxidative stress and lung inflammation in airways disease. *Eur J Pharmacol* 2001; 429(1-3): 195-207.

57. Ito K, Ito M, Elliott WM, Cosio B, Caramori G, Kon OM, Barczyk A, Hayashi S, Adcock IM, Hogg JC, Barnes PJ. Decreased histone deacetylase activity in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2005; 352(19): 1967-1976.

7. Referencias bibliográficas

58. O'Donnell DE, Reville SM, Webb KA. Dynamic hyperinflation and exercise intolerance in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164(5): 770-777.
59. Burgel PR, Nadel JA. Roles of epidermal growth factor receptor activation in epithelial cell repair and mucin production in airway epithelium. *Thorax* 2004; 59(11): 992-996.
60. Wouters EF. Chronic obstructive pulmonary disease. 5: systemic effects of COPD. *Thorax* 2002; 57(12): 1067-1070.
61. Agusti AG, Noguera A, Sauleda J, Sala E, Pons J, Busquets X. Systemic effects of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2003; 21(2): 347-360.
62. Similowski T, Agusti A, MacNee W, Schonhofer B. The potential impact of anaemia of chronic disease in COPD. *Eur Respir J* 2006; 27(2): 390-396.
63. Gan WQ, Man SF, Senthilselvan A, Sin DD. Association between chronic obstructive pulmonary disease and systemic inflammation: a systematic review and a meta-analysis. *Thorax* 2004; 59(7): 574-580.
64. Benayoun L, Druilhe A, Dombret MC, Aubier M, Pretolani M. Airway structural alterations selectively associated with severe asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167(10): 1360-1368.
65. Racke K, Haag S, Bahulayan A, Warnken M. Pulmonary fibroblasts, an emerging target for anti-obstructive drugs. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2008; 378(2): 193-201.
66. Gorska K, Maskey-Warzechowska M, Krenke R. Airway inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. *Curr Opin Pulm Med* 2010; 16(2): 89-96.
67. Voynow JA, Rubin BK. Mucins, mucus, and sputum. *Chest* 2009; 135(2): 505-512.
68. Rogers DF. Mucociliary dysfunction in COPD: effect of current pharmacotherapeutic options. *Pulm Pharmacol Ther* 2005; 18(1): 1-8.
69. Gosens R, Zaagsma J, Meurs H, Halayko AJ. Muscarinic receptor signaling in the pathophysiology of asthma and COPD. *Respir Res* 2006; 7: 73.
70. Molfino NA, Jeffery PK. Chronic obstructive pulmonary disease: histopathology, inflammation and potential therapies. *Pulm Pharmacol Ther* 2007; 20(5): 462-472.
71. Scotton CJ, Chambers RC. Molecular targets in pulmonary fibrosis: the myofibroblast in focus. *Chest* 2007; 132(4): 1311-1321.
72. Singh SR, Hall IP. Airway myofibroblasts and their relationship with airway myocytes and fibroblasts. *Proc Am Thorac Soc* 2008; 5(1): 127-132.
73. Lama VN, Phan SH. The extrapulmonary origin of fibroblasts: stem/progenitor cells and beyond. *Proc Am Thorac Soc* 2006; 3(4): 373-376.
74. Phan SH. The myofibroblast in pulmonary fibrosis. *Chest* 2002; 122(6 Suppl): 286S-289S.
75. Dennler S, Goumans MJ, ten Dijke P. Transforming growth factor beta signal transduction. *J Leukoc Biol* 2002; 71(5): 731-740.

7. Referencias bibliográficas

76. Al-Zi'abi MO, Bowolaksono A, Okuda K. Survival role of locally produced acetylcholine in the bovine corpus luteum. *Biol Reprod* 2009; 80(4): 823-832.
77. Tucek S. The synthesis of acetylcholine in skeletal muscles of the rat. *J Physiol* 1982; 322: 53-69.
78. Gwilt CR, Donnelly LE, Rogers DF. The non-neuronal cholinergic system in the airways: an unappreciated regulatory role in pulmonary inflammation? *Pharmacol Ther* 2007; 115(2): 208-222.
79. Barnes PJ, Belvisi MG, Mak JC, Haddad EB, O'Connor B. Tiotropium bromide (Ba 679 BR), a novel long-acting muscarinic antagonist for the treatment of obstructive airways disease. *Life Sci* 1995; 56(11-12): 853-859.
80. White MV. Muscarinic receptors in human airways. *J Allergy Clin Immunol* 1995; 95(5 Pt 2): 1065-1068.
81. Gosens R, Zaagsma J, Grootte Bromhaar M, Nelemans A, Meurs H. Acetylcholine: a novel regulator of airway smooth muscle remodelling? *Eur J Pharmacol* 2004; 500(1-3): 193-201.
82. Matthiesen S, Bahulayan A, Kempkens S, Haag S, Fuhrmann M, Stichnote C, Juergens UR, Racke K. Muscarinic receptors mediate stimulation of human lung fibroblast proliferation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006; 35(6): 621-627.
83. Kawashima K, Fujii T. Basic and clinical aspects of non-neuronal acetylcholine: overview of non-neuronal cholinergic systems and their biological significance. *J Pharmacol Sci* 2008; 106(2): 167-173.
84. Profita M, Bonanno A, Siena L, Bruno A, Ferraro M, Montalbano AM, Albano GD, Riccobono L, Casarosa P, Pieper MP, Gjomarkaj M. Smoke, choline acetyltransferase, muscarinic receptors, and fibroblast proliferation in chronic obstructive pulmonary disease. *J Pharmacol Exp Ther* 2009; 329(2): 753-763.
85. Carruthers W, Johnstone RA. Composition of a paraffin wax fraction from tobacco leaf and tobacco smoke. *Nature* 1959; 184: 1131-1132.
86. Stedman RL. The chemical composition of tobacco and tobacco smoke. *Chem Rev* 1968; 68(2): 153-207.
87. Arnarp J, Bielawski J, Dahlin BM, Dahlman O, Enzell CR, Pettersson T. Tobacco smoke chemistry. 2. Alkyl and alkenyl substituted guaiacols found in cigarette smoke condensate. *Acta Chem Scand* 1989; 43(1): 44-50.
88. Arnarp J, Dahlin BM, Enzell CR, Pettersson T. Tobacco smoke chemistry 3. Aromatic acids of cigarette smoke condensate. *Acta Chem Scand* 1989; 43(4): 381-385.
89. Arnarp J, Enzell C, Petersson K, Pettersson T. Tobacco smoke chemistry. 1. A chemical and mass spectrometric study of tobacco smoke alkyl 2-hydroxy-2-cyclopentenones. *Acta Chem Scand B* 1986; 40(10): 839-854.
90. Rodgman A, Smith CJ, Perfetti TA. The composition of cigarette smoke: a retrospective, with emphasis on polycyclic components. *Hum Exp Toxicol* 2000; 19(10): 573-595.

7. Referencias bibliográficas

91. Wu WS. The signaling mechanism of ROS in tumor progression. *Cancer Metastasis Rev* 2006; 25(4): 695-705.
92. Cortijo J, Mata M, Milara J, Donet E, Gavalda A, Miralpeix M, Morcillo EJ. Acridinium inhibits cholinergic and tobacco smoke-induced MUC5AC in human airways. *Eur Respir J* 2011; 37(2): 244-254.
93. Postma D, Anzueto A, Calverley P, Jenkins C, Make BJ, Sciurba FC, Similowski T, van der Molen T, Eriksson G. A new perspective on optimal care for patients with COPD. *Prim Care Respir J* 2011; 20(2): 205-209.
94. Dougherty JA, Didur BL, Aboussouan LS. Long-acting inhaled beta 2-agonists for stable COPD. *Ann Pharmacother* 2003; 37(9): 1247-1255.
95. Stockley RA, Whitehead PJ, Williams MK. Improved outcomes in patients with chronic obstructive pulmonary disease treated with salmeterol compared with placebo/usual therapy: results of a meta-analysis. *Respir Res* 2006; 7: 147.
96. Aalbers R, Ayres J, Backer V, Decramer M, Lier PA, Magyar P, Malolepszy J, Ruffin R, Sybrecht GW. Formoterol in patients with chronic obstructive pulmonary disease: a randomized, controlled, 3-month trial. *Eur Respir J* 2002; 19(5): 936-943.
97. Tashkin DP, Celli B, Senn S, Burkhart D, Kesten S, Menjoge S, Decramer M. A 4-year trial of tiotropium in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2008; 359(15): 1543-1554.
98. Beier J, Beeh KM. Long-acting beta-adrenoceptor agonists in the management of COPD: focus on indacaterol. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 2011; 6: 237-243.
99. Brusasco V, Hodder R, Miravittles M, Korducki L, Towse L, Kesten S. Health outcomes following treatment for six months with once daily tiotropium compared with twice daily salmeterol in patients with COPD. *Thorax* 2003; 58(5): 399-404.
100. Appleton S, Jones T, Poole P, Pilotto L, Adams R, Lasserson TJ, Smith B, Muhammad J. Ipratropium bromide versus short acting beta-2 agonists for stable chronic obstructive pulmonary disease. *Cochrane Database Syst Rev* 2006(2): CD001387.
101. Udem BJ, Kollarik M. The role of vagal afferent nerves in chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* 2005; 2(4): 355-360; discussion 371-352.
102. Campbell SC. Clinical aspects of inhaled anticholinergic therapy. *Respir Care* 2000; 45(7): 864-867.
103. Jin QH, Shi YF, He HY, Ng KK, Jiang H, Yang L, Jiang ZQ, Zhang XJ. Isolation of acetylcholinesterase from apoptotic human lung fibroblast cells by antibody affinity chromatography. *Biotechniques* 2002; Suppl: 92-94, 96-97.
104. Zhou Y, Wang X, Zeng X, Qiu R, Xie J, Liu S, Zheng J, Zhong N, Ran P. 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): 603-610.
105. Ram FS, Jardin JR, Atallah A, Castro AA, Mazzini R, Goldstein R, Lacasse Y, Cendon S. Efficacy of theophylline in people with stable chronic obstructive pulmonary disease: a systematic review and meta-analysis. *Respir Med* 2005; 99(2): 135-144.

7. Referencias bibliográficas

106. Birru RL, Di YP. Pathogenic mechanism of second hand smoke induced inflammation and COPD. *Front Physiol* 2012; 3: 348.
107. Rennard SI, Calverley PM, Goehring UM, Bredenbroker D, Martinez FJ. Reduction of exacerbations by the PDE4 inhibitor roflumilast--the importance of defining different subsets of patients with COPD. *Respir Res* 2011; 12: 18.
108. Fabbri LM, Calverley PM, Izquierdo-Alonso JL, Bundschuh DS, Brose M, Martinez FJ, Rabe KF. Roflumilast in moderate-to-severe chronic obstructive pulmonary disease treated with longacting bronchodilators: two randomised clinical trials. *Lancet* 2009; 374(9691): 695-703.
109. 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): 778-784.
110. 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): 497-508.
111. 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): 68-76.
112. 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): 189-195.
113. 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): 567-572.
114. 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): 645-659.
115. 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): 265-269.
116. 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): 174-180.
117. Guyatt GH, Townsend M, Kazim F, Newhouse MT. A controlled trial of ambroxol in chronic bronchitis. *Chest* 1987; 92(4): 618-620.
118. 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): 1398-1420.
119. 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): 531-535.

7. Referencias bibliográficas

120. 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): 133S-181S.
121. Burgel PR, Bourdin A, Chanez P, Chabot F, Chaouat A, Chinet T, de Blic J, Devillier P, Deschildre A, Didier A, Garcia G, Jebrak G, Laurent F, Morel H, Perez T, Pilette C, Roche N, Tillie-Leblond I, Verbanck S, Dusser D. Update on the roles of distal airways in COPD. *Eur Respir Rev* 2011; 20(119): 7-22.
122. Jain R, Shaul PW, Borok Z, Willis BC. Endothelin-1 induces alveolar epithelial-mesenchymal transition through endothelin type A receptor-mediated production of TGF-beta1. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2007; 37(1): 38-47.
123. Ortiz JL, Milara J, Juan G, Montesinos JL, Mata M, Ramon M, Morcillo E, Cortijo J. Direct effect of cigarette smoke on human pulmonary artery tension. *Pulm Pharmacol Ther* 2009; 23(3): 222-228.
124. Milara J, Ortiz JL, Juan G, Guijarro R, Almudever P, Martorell M, Morcillo EJ, Cortijo J. Cigarette smoke exposure up-regulates endothelin receptor B in human pulmonary artery endothelial cells: molecular and functional consequences. *Br J Pharmacol* 2010; 161(7): 1599-1615.
125. Liu Y, Gao W, Zhang D. Effects of cigarette smoke extract on A549 cells and human lung fibroblasts treated with transforming growth factor-beta1 in a coculture system. *Clin Exp Med* 2009; 10(3): 159-167.
126. Mata M, Sarria B, Buenestado A, Cortijo J, Cerda M, Morcillo EJ. Phosphodiesterase 4 inhibition decreases MUC5AC expression induced by epidermal growth factor in human airway epithelial cells. *Thorax* 2005; 60(2): 144-152.
127. Widdop S, Daykin K, Hall IP. Expression of muscarinic M2 receptors in cultured human airway smooth muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1993; 9(5): 541-546.
128. Thullberty MD, Cox HD, Schule T, Thompson CM, George KM. Differential localization of acetylcholinesterase in neuronal and non-neuronal cells. *J Cell Biochem* 2005; 96(3): 599-610.
129. Haag S, Matthiesen S, Juergens UR, Racke K. Muscarinic receptors mediate stimulation of collagen synthesis in human lung fibroblasts. *Eur Respir J* 2008; 32(3): 555-562.
130. Baglole CJ, Bushinsky SM, Garcia TM, Kode A, Rahman I, Sime PJ, Phipps RP. Differential induction of apoptosis by cigarette smoke extract in primary human lung fibroblast strains: implications for emphysema. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006; 291(1): L19-29.
131. Orosz Z, Csiszar A, Labinsky N, Smith K, Kaminski PM, Ferdinandy P, Wolin MS, Rivera A, Ungvari Z. Cigarette smoke-induced proinflammatory alterations in the endothelial phenotype: role of NAD(P)H oxidase activation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; 292(1): H130-139.
132. van der Vliet A. NADPH oxidases in lung biology and pathology: host defense enzymes, and more. *Free Radic Biol Med* 2008; 44(6): 938-955.

7. Referencias bibliográficas

133. Petry A, Weitnauer M, Gorchach A. Receptor activation of NADPH oxidases. *Antioxid Redox Signal* 2010; 13(4): 467-487.
134. Huang S, Wettlaufer SH, Hogaboam C, Aronoff DM, Peters-Golden M. Prostaglandin E(2) inhibits collagen expression and proliferation in patient-derived normal lung fibroblasts via E prostanoid 2 receptor and cAMP signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007; 292(2): L405-413.
135. Matthiesen S, Bahulayan A, Holz O, Racke K. MAPK pathway mediates muscarinic receptor-induced human lung fibroblast proliferation. *Life Sci* 2007; 80(24-25): 2259-2262.
136. Kelly MM, O'Connor TM, Leigh R, Otis J, Gwozd C, Gauvreau GM, Gauldie J, O'Byrne PM. Effects of budesonide and formoterol on allergen-induced airway responses, inflammation, and airway remodeling in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 125(2): 349-356 e313.
137. Tan J, Deng ZH, Liu SZ, Wang JT, Huang C. TGF-beta2 in human retinal pigment epithelial cells: expression and secretion regulated by cholinergic signals in vitro. *Curr Eye Res* 2010; 35(1): 37-44.
138. Thangjam GS, Agarwal P, Balapure AK, Rao SG, Kondaiah P. Regulation of extracellular matrix genes by arecoline in primary gingival fibroblasts requires epithelial factors. *J Periodontal Res* 2009; 44(6): 736-743.
139. Haddad EB, Rousell J, Mak JC, Barnes PJ. Transforming growth factor-beta 1 induces transcriptional down-regulation of m2 muscarinic receptor gene expression. *Mol Pharmacol* 1996; 49(5): 781-787.
140. Akiho H, Khan WI, Al-Kaabi A, Blennerhassett P, Deng Y, Collins SM. Cytokine modulation of muscarinic receptors in the murine intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007; 293(1): G250-255.
141. Ortiz JL, Milara J, Juan G, Montesinos JL, Mata M, Ramon M, Morcillo E, Cortijo J. Direct effect of cigarette smoke on human pulmonary artery tension. *Pulm Pharmacol Ther* 2010; 23(3): 222-228.
142. Su Y, Han W, Giraldo C, De Li Y, Block ER. Effect of cigarette smoke extract on nitric oxide synthase in pulmonary artery endothelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998; 19(5): 819-825.
143. Dasari V, Gallup M, Lemjabbar H, Maltseva I, McNamara N. Epithelial-mesenchymal transition in lung cancer: is tobacco the "smoking gun"? *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006; 35(1): 3-9.
144. Dhaunsi GS, Paintlia MK, Kaur J, Turner RB. NADPH oxidase in human lung fibroblasts. *J Biomed Sci* 2004; 11(5): 617-622.
145. Hecker L, Vittal R, Jones T, Jagirdar R, Luckhardt TR, Horowitz JC, Pennathur S, Martinez FJ, Thannickal VJ. NADPH oxidase-4 mediates myofibroblast activation and fibrogenic responses to lung injury. *Nat Med* 2009; 15(9): 1077-1081.
146. Milara J, Cortijo J. Tobacco, Inflammation, and Respiratory Tract Cancer. *Curr Pharm Des* 2012.
147. Krimmer DI, Burgess JK, Wooi TK, Black JL, Oliver BG. Matrix proteins from smoke-exposed fibroblasts are pro-proliferative. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2012; 46(1): 34-39.

7. Referencias bibliográficas

148. Liu Y, Gao W, Zhang D. Effects of cigarette smoke extract on A549 cells and human lung fibroblasts treated with transforming growth factor-beta1 in a coculture system. *Clin Exp Med* 2010; 10(3): 159-167.
149. Wang Q, Fan J, Liu S. [Effects of cigarette smoke solution and chrysotile on proliferation activity of human embryo lung cells]. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi* 1999; 33(4): 231-233.
150. Milara J, Serrano A, Peiro T, Gavalda A, Miralpeix M, Morcillo EJ, Cortijo J. Acridinium inhibits human lung fibroblast to myofibroblast transition. *Thorax* 2012; 67(3): 229-237.
151. Huang SK, Wettlaufer SH, Chung J, Peters-Golden M. Prostaglandin E2 inhibits specific lung fibroblast functions via selective actions of PKA and Epac-1. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2008; 39(4): 482-489.
152. Kolosionek E, Savai R, Ghofrani HA, Weissmann N, Guenther A, Grimminger F, Seeger W, Banat GA, Schermuly RT, Pullamsetti SS. Expression and activity of phosphodiesterase isoforms during epithelial mesenchymal transition: the role of phosphodiesterase 4. *Mol Biol Cell* 2009; 20(22): 4751-4765.
153. Hill EV, Sheppard CL, Cheung YF, Gall I, Krause E, Houslay MD. Oxidative stress employs phosphatidyl inositol 3-kinase and ERK signalling pathways to activate cAMP phosphodiesterase-4D3 (PDE4D3) through multi-site phosphorylation at Ser239 and Ser579. *Cell Signal* 2006; 18(11): 2056-2069.
154. Caraci F, Gili E, Calafiore M, Failla M, La Rosa C, Crimi N, Sortino MA, Nicoletti F, Copani A, Vancheri C. TGF-beta1 targets the GSK-3beta/beta-catenin pathway via ERK activation in the transition of human lung fibroblasts into myofibroblasts. *Pharmacol Res* 2008; 57(4): 274-282.
155. Caulfield MP, Birdsall NJ. International Union of Pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmacol Rev* 1998; 50(2): 279-290.



8. Índice de abreviaturas:

8. Índice de abreviaturas

AAT: α 1-antitripsina

AC: adenilato ciclasa

Ach: Acetilcolina

AChE: Acetilcolinesterasa

ACL: Bromuro de aclidinio

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

ADNc: Ácido Desoxirribonucleico complementario

AMPc: Adenosín monofosfato cíclico

APO: Apocinina

ARN: Ácido Ribonucleico

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

BrDU: 5-bromo-2'-deoxiuridina

CCh: Carbacol

ChAT: Colina acetil transferasa

CHMP: Comité para Medicamentos de Uso Humano

COL1A: Colágeno tipo I

CTGF: Factor de crecimiento de tejido conectivo

CVF: Capacidad vital forzada

dbcAMP: N6, 2'-O-Dibutililadenosina 3',5'-cíclica monofosfato

DCFDA: Dicolorofluoresceína diacetato

EGFR: Factor de crecimiento epidermoide

EHT: Extracto de humo de tabaco

8. Índice de abreviaturas

ELISA: Ensayo inmunosorbente ligado a enzima (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay)

EPOC: Enfermedad pulmonar obstructiva crónica

ERK1/2: Quinasa regulada por señales extracelulares. (Extracellular signal-regulated kinases)

ERO: Especies reactivas del oxígeno

IL – 6: Interleucina 6

IL – 8: Interleucina 8

IL-13: Interleucina 13

IL-1 β : Interleucina 1 β

ISO: Isoprenalina

LABA: Agonista β 2 de acción larga (long-acting beta-agonists)

LAMA: Antagonistas colinérgico de acción larga (long-acting muscarinic antagonist)

M1: Receptor Colinérgico Muscarínico 1

M2: Receptor Colinérgico Muscarínico 2

M3: Receptor Colinérgico Muscarínico 3

MAPK: Protein-quinasas activadas por mitógeno

NAC: N- Acetil cisteína

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleotido fosfato: forma reducida

pFHHSid: P-fluoro-hexahydro siladifenidol

PI3K: Fosfatidil inositol 3-quinasa

Proteína Gi: Proteína G inhibidora

Proteína Gq: Proteína G quinasa

8. Índice de abreviaturas

RhoA: Miembro A de la familia de genes homólogos a Ras GTPasa

RT: Retrotranscripción

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real

SABA: Agonista β_2 de acción corta (short-acting beta-agonists)

SAMA: Antagonista colinérgico de acción corta (short-acting muscarinic antagonist)

siARN : Ácido ribonucleico de silenciamiento o de interferencia.

TCh1: Transportadores de colina de alta afinidad.

TEM: Transición epitelial-mesenquimal

TGF- β_1 : Factor de crecimiento transformante- β_1 (Transforming grown factor β_1)

TNF- α : Factor de necrosis tumoral alpha

TVACH: Transportador vesicular de ACh.

VEF1: Volumen Espiratorio Forzado

α -SMA: α - actina de musculo liso (alpha-smooth muscle actin)



9. Anexo:

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

APROBACIÓN PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Valencia, 17 de febrero de 2011

Esta Comisión tras evaluar en su reunión de 08 de febrero de 2011 el Proyecto de Investigación:

Título:	"Modificación farmacológica del remodelado y la EPOC inducidos por el humo del tabaco: visión en modelos animales y humanos"		
I.P.:	Dr. Julio Cortijo	Servicio/Unidad	Fundación

Acuerda respecto a esta documentación:

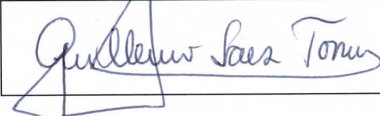
- Que el Proyecto de Investigación presentado a la VI plan nacional de investigación científica, desarrollo e innovación tecnológica 2008-2011 reúnen las condiciones de necesidad, oportunidad y viabilidad de las tareas de investigación propuestas, el plan de recepción e integración del candidato y el valor añadido para este centro, así como de aplicabilidad al Sistema Nacional de Salud exigidas por esta Comisión, por tanto se decide su APROBACIÓN.

Los miembros que evaluaron esta documentación:

		Presente
Presidente	Dr. Guillermo Sáez	X
Vocales	Dr. Carlos Camps	X
	Dr. D. Julio Cortijo	
	Dr. Carlos Fuster	X
	Dra. Empar Lurbe	
	Dr. Juan Carlos Ferrer	X
	Dr. Francisco Ridocci	X
Secretario	Dr. Federico Palomar	X

Lo que comunico a efectos oportunos:

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



APROBACIÓN PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN

- ANEXO 11 -

Este CEIC tras evaluar en su reunión de 17 de Febrero de 2011 el Proyecto de Investigación:

Título:	"Modificación farmacológica del remodelado y la EPOC inducidos por el humo del tabaco: visión en modelos animales y humanos."		
I.P.:	Dr. Julio Cortijo Gimeno	Servicio/Unidad	Fundación Investigación

Acuerda respecto a esta documentación:

- Que el Proyecto de Investigación y Hoja de Información al Paciente y Consentimiento Informado presentado a VI Plan Nacional de Investigación Científica, Desarrollo e Innovación Tecnológica 2008-2011 reúne las condiciones exigidas por este CEIC, por tanto se decide su APROBACIÓN.

Los miembros que evaluaron esta documentación:

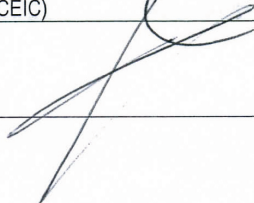
		Presente
Presidente	Dr. Severiano Marin	X
Vocales	D. Ernesto Bataller	X
	D. Alejandro Moner	
	D. Germán García	
	Dr. D. José Manuel Iranzo	
	Dr. D. Miguel Armengot	
	Dr. D. Julio Cortijo	
	Dra. Dña. Elena Rubio	
	Dr. D. Gustavo Juan	X
	Dra. Pilar Blasco	
	Dña. M ^a Teresa Jareño	X
	Dra. M ^a José Safont	X
	Dr. José Luis Fayos	X
	Dr. Agustín Herrera	
	Dra. Ana Blasco	
	Dr. Antonio Martorell	
	Dr. Aurelio Quesada	X
	Dr. Guillermo Sáez	X
Dr. Fco. Javier Cervera	X	
Dr. José Vte. Roig Vila	X	

Consorcio Hospital General Universitario de Valencia

Comité Ético de Investigación Clínica

	Dr. Rafael Poveda	
	Dra. Inmaculada Sáez	X
	Dr. Alberto Berenguer	X
	Dra. Amparo Perez	
	Dña. Encarna Domingo	X
	Dra. Paloma Escobar	
	Dña. M ^a Dolores Navarro	
	Dra. Lucia Ciaccotti	
Secretario	Dra. Ana Minguez	X

Lo que comunico a efectos oportunos:

Fdo. Dr. Severiano Marín (Presidente CEIC)


**9.2 PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS
DOCTORAL:**

ORIGINAL ARTICLE

Acclidinium inhibits human lung fibroblast to myofibroblast transition

Javier Milara,^{1,2,3} Adela Serrano,¹ Teresa Peiró,¹ Amadeu Gavalda,⁴ Montserrat Miralpeix,⁴ Esteban Jesús Morcillo,^{2,3,5} Julio Cortijo^{1,2,5}

► Additional material is published online only. To view this file please visit the journal online (<http://thorax.bmj.com/content/67/3.toc>).

¹Research Unit, University General Hospital Consortium, Valencia, Spain

²CIBERES, Health Institute Carlos III, Valencia, Spain

³Clinical Pharmacology Unit, University Clinic Hospital, Valencia, Spain

⁴Almirall, R&D Centre, Barcelona, Spain

⁵Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, University of Valencia, Spain

Correspondence to

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

JM and AS contributed equally to this work.

Accepted 8 September 2011
Published Online First
28 September 2011



This paper is freely available online under the BMJ Journals unlocked scheme, see <http://thorax.bmj.com/site/about/unlocked.xhtml>

ABSTRACT

Background Fibroblast to myofibroblast transition is believed to contribute to airway remodelling in lung diseases such as asthma and chronic obstructive pulmonary disease. This study examines the role of acclidinium, a new long-acting muscarinic antagonist, on human fibroblast to myofibroblast transition.

Methods Human bronchial fibroblasts were stimulated with carbachol (10^{-8} to 10^{-5} M) or transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1; 2 ng/ml) in the presence or absence of acclidinium (10^{-9} to 10^{-7} M) or different drug modulators for 48 h. Characterisation of myofibroblasts was performed by analysis of collagen type I and α -smooth muscle actin (α -SMA) mRNA and protein expression as well as α -SMA microfilament immunofluorescence. ERK1/2 phosphorylation, RhoA-GTP and muscarinic receptors (M) 1, 2 and 3 protein expression were determined by western blot analysis and adenosine 3'-5' cyclic monophosphate levels were determined by ELISA. Proliferation and migration of fibroblasts were also assessed.

Results Collagen type I and α -SMA mRNA and protein expression, as well as percentage α -SMA microfilament-positive cells, were upregulated in a similar way by carbachol and TGF- β 1, and acclidinium reversed these effects. Carbachol-induced myofibroblast transition was mediated by an increase in ERK1/2 phosphorylation, RhoA-GTP activation and cyclic monophosphate downregulation as well as by the autocrine TGF- β 1 release, which were effectively reduced by acclidinium. TGF- β 1 activated the non-neuronal cholinergic system. Suppression of M1, M2 or M3 partially prevented carbachol- and TGF- β 1-induced myofibroblast transition. Acclidinium dose-dependently reduced fibroblast proliferation and migration.

Conclusion Acclidinium inhibits human lung fibroblast to myofibroblast transition.

INTRODUCTION

Remodelling is a pathological feature observed in the airways of patients with asthma and chronic obstructive pulmonary disease (COPD), and the extent and progression of these structural alterations correlate with disease severity.^{1,2} Fibrotic alterations as part of these structural changes are also observed in both asthma and COPD, although their nature, localisation and extent are different. Under chronic inflammatory conditions, resident lung fibroblasts are activated and transformed into a more contractile, proliferative and secretory-active myofibroblast phenotype characterised by an

Key messages

What is the key question?

► Does acclidinium, an anticholinergic agent, affect human fibroblast to myofibroblast transition?

What is the bottom line?

► Acclidinium dose-dependently inhibits human lung fibroblast to myofibroblast transition induced by carbachol and TGF- β 1 stimulation.

Why read on?

► This is the first report of the mechanistic and functional involvement of a non-neuronal cholinergic system in the transition of human lung fibroblasts to myofibroblasts. We provide evidence that the use of anticholinergic agents such as acclidinium for the treatment of lung disease may play a role in regulatory fibrotic remodelling.

increased expression of extracellular matrix components and α -smooth muscle actin (α -SMA), which contribute to the increase in lung remodelling progression and airway bronchoconstrictor responsiveness.³

Parasympathetic activity is increased in airway inflammation, which is the basis for the use of anticholinergic therapy in asthma and COPD.⁴ Anticholinergics constitute a particularly important bronchodilator therapy in COPD and certain forms of asthma.⁵ Furthermore, anticholinergics have shown potential anti-inflammatory and anti-remodelling effects in animal models,⁶ which may be of added value to their classical bronchodilator effects. Recent evidence indicates that acetylcholine production in the airways is not restricted to the parasympathetic nervous system but can also be released from non-neuronal origins.⁷ Dysfunction of the non-neuronal cholinergic system appears to be involved in the pathophysiology of asthma and COPD.⁸ In this regard, it has been suggested that fibroblasts are endowed with this system and could represent a previously unappreciated regulatory pathway in pulmonary remodelling.⁹ Muscarinic receptor stimulation has been shown to induce profound proliferation and collagen secretion of human lung fibroblasts.^{10,11} However, the role of the cholinergic system in fibroblast to myofibroblast transition, as well as the mechanisms that underlie fibroblast activation, remain unclear.

Acclidinium bromide (Almirall, Barcelona, Spain) is a novel long-acting muscarinic antagonist that has reached phase III clinical development for COPD treatment.¹² In preclinical studies, acclidinium demonstrated potent muscarinic antagonist activity comparable to ipratropium and tiotropium, with a long duration of action.¹³ The aim of the present study was to investigate the effect of acclidinium on regulating carbachol-induced human lung fibroblast to myofibroblast transition as well as the mechanism involved in this process. In addition, since transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) is the main known factor responsible for myofibroblast formation and progression,¹⁴ we examined the effects of acclidinium on TGF- β 1-induced fibroblast to myofibroblast transition and the possible link between cholinergic and TGF- β 1 pathways.

METHODS

Isolation and cultivation of human fibroblasts

Human lung fibroblasts were dissected from lobar or main bronchus tissue obtained from patients undergoing surgery for lung carcinoma, as previously described.¹⁰ Data presented throughout the study were from human bronchial fibroblasts obtained from patients who smoked. For comparison, bronchial fibroblasts were also isolated from patients with COPD and only used to explore the effect of acclidinium on carbachol- or TGF- β 1-induced myofibroblast markers. Cultivation and characterisation of fibroblasts were performed as described elsewhere^{10 11} (for details and clinical data of patients see online supplement).

Stimulation of human fibroblasts

Before stimulation, subconfluent cell monolayers were deprived of serum for 24 h. Human bronchial fibroblasts were stimulated with carbachol (Sigma, Madrid, Spain: catalogue no. C4382) or human TGF- β 1 (2 ng/ml; Sigma: catalogue no. T7039) for the indicated times, replacing culture medium and stimulus every 24 h. Acclidinium, human acetylcholinesterase (10 U/ml; AChE; Sigma: catalogue no. C1682), dibutyl adenosine 3'-5' cyclic monophosphate sodium salt (1 mM; dbcAMP; Sigma: catalogue no. D0260), PD98050 (10 μ M; Sigma: catalogue no. P215), Y27632 (10 μ M; Sigma: catalogue no. Y0503), pirenzepine (described as M1 antagonist, 1 μ M; Sigma: catalogue no. P7412), methoctramine (described as M2 antagonist, 1 μ M; Sigma: catalogue no. M105) and p-fluoro-hexahydro siladifenidol (pFHHSid) (described as M3 antagonist, 1 μ M; Sigma: catalogue

no. H127) were added 30 min before stimulus. Monoclonal anti-human TGF- β 1 monoclonal antibody (4 μ g/ml; anti-TGF- β 1; R&D Systems, Madrid, Spain; catalogue no. AB-246-NA) was added 30 min before stimulus to block the culture supernatant active form of TGF- β 1, as previously outlined.¹⁵

Real-time RT-PCR

Total RNA isolation and specific cDNA amplification for muscarinic acetylcholine receptors M1, M2, M3, α 1(I)-collagen (col type I), α -SMA and TGF- β 1 were referenced to glyceraldehyde phosphate dehydrogenase as an endogenous control and normalised to the control group, as previously described^{16 17} (see online supplement for details).

Transfection of siRNAs

Small interfering RNA (siRNA) experiments for M1, M2 and M3 were performed in lung fibroblasts as previously outlined^{16 17} using lipofectamine-2000 (Invitrogen, Paisley, UK) 2 μ l/ml as transfection reagent (see online supplement for details).

Western blotting

Western blot analysis was used to detect changes in col type I (138 kD), α -SMA, TGF- β 1 (40–60 kD), p-ERK1/2 (42–44 kD), RhoA-GTP (22 kD), M1 (52 kD), M2 (70 kD), M3 (75 kD) and choline acetyltransferase (ChAT; 65 kD) (see online supplement for details).

Immunofluorescence

Fibroblasts were fixed, permeabilised and immunostained with anti- α -SMA (1:200) antibody, followed by secondary anti-FITC, as previously outlined¹⁷ (see online supplement for details).

Enzyme-linked immunosorbent assays

Quantitative ELISAs for TGF- β 1 and acetylcholine (ACh) were performed with supernatants of subconfluent human lung fibroblasts on a six-well plate following 48 h of stimulation with Quantikine human TGF- β 1 immunoassay (R&D Systems; catalogue no. 891124) and ACh assay kit (Abcam, UK; catalogue no. ab65345), respectively.

The cell content of cAMP was measured as previously described.¹⁸ Cells were placed in Dulbecco's modified Eagle medium with 1% fetal calf serum (FCS) for 24 h before measurements to arrest growth. The experimental protocol

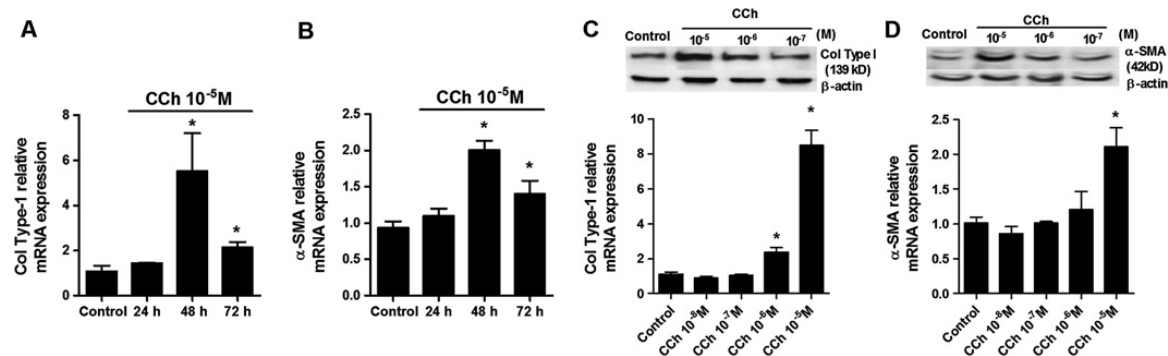


Figure 1 Carbachol (CCh) time- and dose-dependently increases collagen type I (col type I) and α -smooth muscle actin (α -SMA) in human lung fibroblasts. Human lung fibroblasts were stimulated with CCh at the indicated times (A, B) or for 48 h at the indicated concentrations (C, D). (A–D) After incubation, RNA was extracted and subjected to RT-PCR with col type I and α -SMA-specific primers and probes. (C, D) After incubation, total protein was extracted and western blot analysis was performed with specific antibodies for col type I and α -SMA. Each graph represents the mean of four individual experiments. One-way repeated measures analysis of variance (ANOVA): $p < 0.001$ (A–D). $*p < 0.05$ compared with solvent controls.

consisted of incubation of cells with acridinium for 30 min followed by addition of carbachol (10^{-5} M) for 10 min and isoprenaline (10^{-6} M) for another 10 min. These concentrations and times of incubation were selected from the literature.¹⁹ Total cAMP content was determined using a commercially available biotrack enzyme immunoassay kit (reference RPN2251; Amersham, Bucks, UK) (see online supplement for details).

Cell proliferation assay and cell migration

Human bronchial fibroblast proliferation and migration were measured by colorimetric immunoassay based on BrdU

incorporation and wound closure assay, as previously outlined²⁰ (for details see online supplement).

Analysis of results

Results are expressed as mean (SEM). Comparisons over time or across different stimulations on matched fibroblast samples of one subject for *n* independent subjects were analysed by one-way repeated measures analysis of variance (ANOVA) with 95% CIs. For separate comparisons of each stimulation, post hoc Bonferroni-Holm tests were performed. A *p* value <0.05 was considered statistically significant.

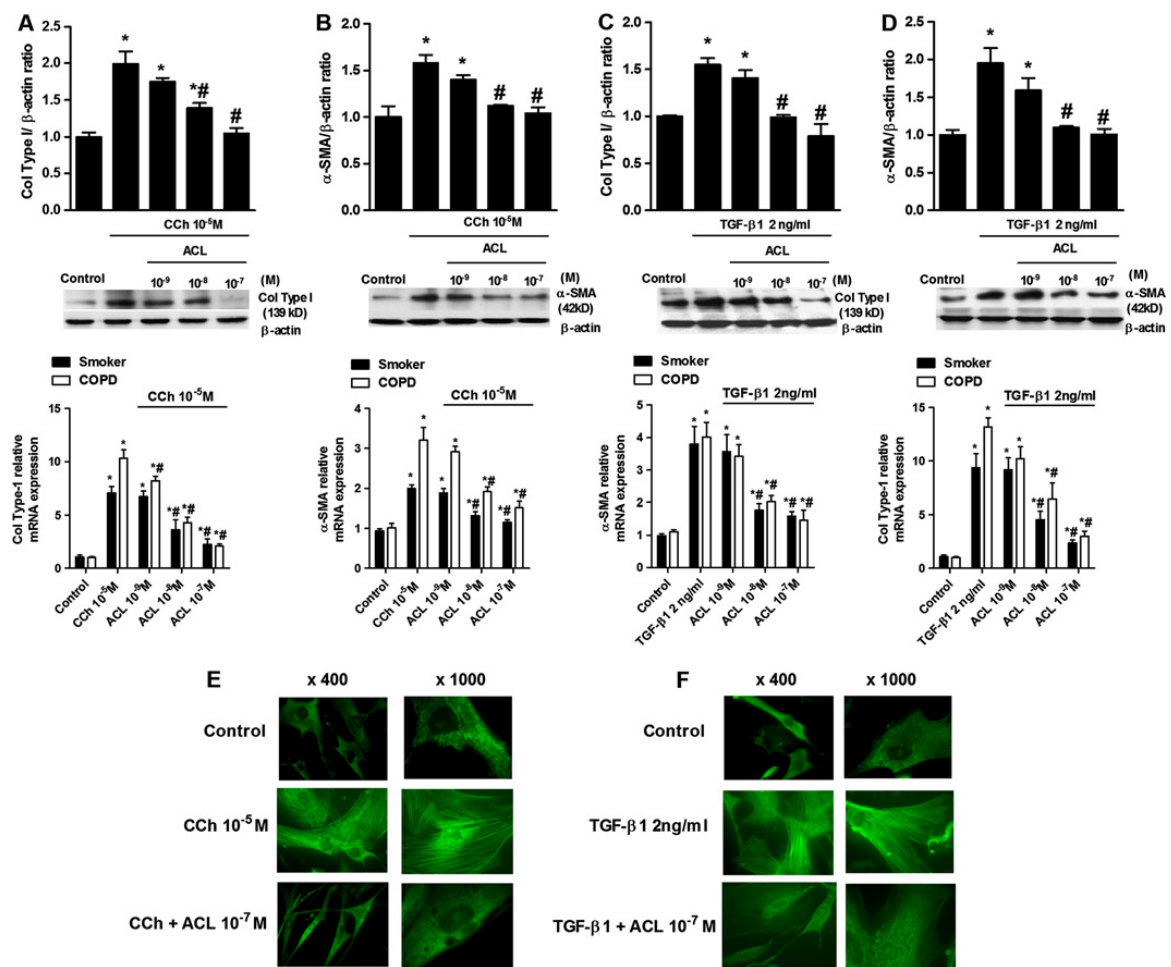


Figure 2 Carbachol (CCh) and transforming growth factor β 1 (TGF- β 1)-induced collagen type I (col type I) and α -smooth muscle actin (α -SMA) expression is inhibited by acridinium (ACL). Human lung fibroblasts from smokers (black bars) or patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) (white bars) were stimulated with CCh (A, B) or TGF- β 1 (C, D) for 48 h. Acridinium was added to the medium at the indicated concentrations 30 min before CCh (A, B) or TGF- β 1 stimulation (C, D). Total protein and RNA were extracted after the incubation period. The top graphs represent values of densitometry of col type I (A, C) or α -SMA (B, D) protein expression relative to β -actin and normalised to solvent controls. Representative western blots of col type I (A, C) or α -SMA (B, D) are shown. The bottom graphs show RT-PCR for col type I (A, C) or α -SMA (B, D). (E, F) Fibroblasts were seeded into 12-well plates, each containing a glass coverslip and incubated with CCh (E) or TGF- β 1 (F) in the presence or absence of acridinium. Cells were then fixed, permeabilised and immunostained with anti- α -SMA followed by secondary anti-FITC. Fluorescence images are representative of three independent experiments per condition at $\times 400$ and $\times 1000$ magnification. Each graph represents the mean of three experiments for western blots and eight experiments for RNA experiments. One-way repeated measures analysis of variance (ANOVA): $p < 0.001$ (A–D). Post hoc Bonferroni-Holm tests: * $p < 0.05$ compared with solvent controls; # $p < 0.05$ compared with stimulus.

RESULTS

Acidinium inhibits carbachol- and TGF- β 1-induced collagen type I and α -SMA expression in human lung fibroblasts

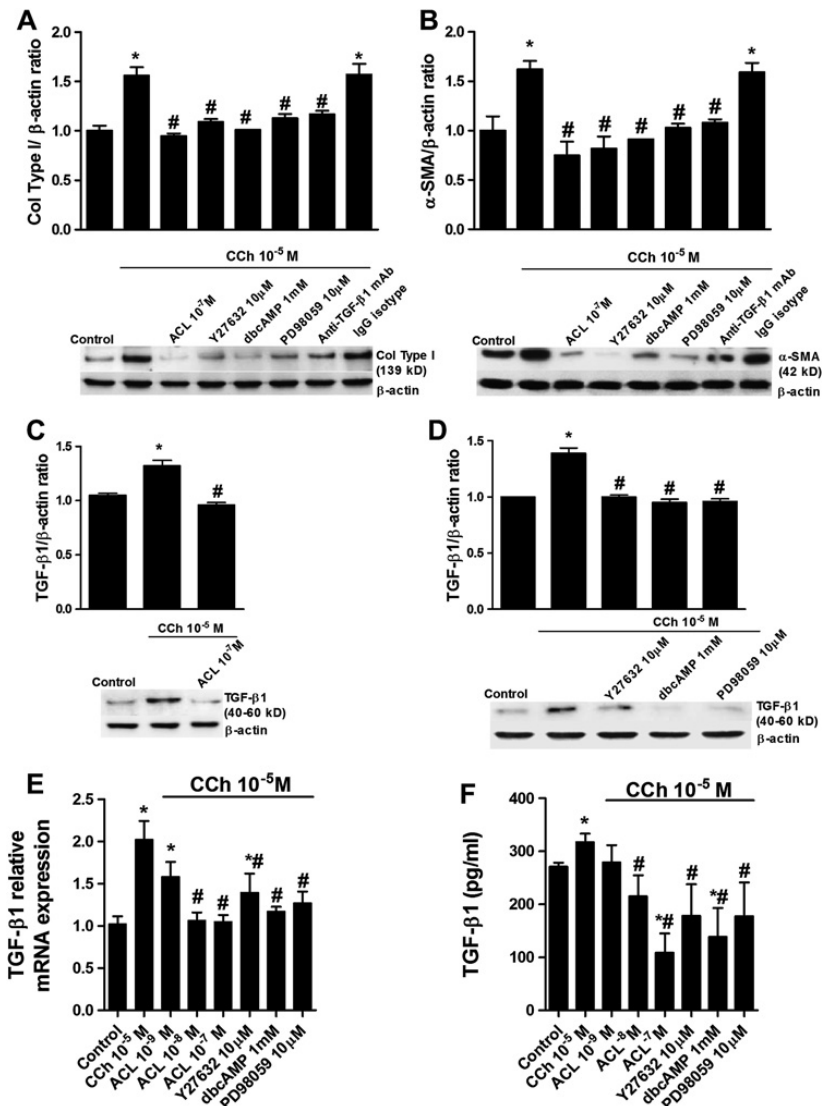
Carbachol (10^{-5} M) augmented collagen type I and α -SMA mRNA expression, reaching peak values at 48 h after carbachol exposure (figure 1A,B). Furthermore, carbachol dose-dependently increased collagen type I and α -SMA protein and mRNA expression reaching significant values at 10^{-5} M (figure 1C,D). We therefore selected this carbachol concentration for the rest of the experiments.

Acidinium dose-dependently reduced carbachol-induced collagen type I and α -SMA protein and mRNA expression, reaching a maximal inhibitory value at 10^{-7} M (figure 2A,B; black bars) in bronchial fibroblasts from smokers. In other experiments, TGF- β 1 caused a pronounced increase in collagen type I and α -SMA protein and mRNA expression which was almost completely blocked by acidinium 10^{-7} M (figure 2C,D; black bars) in bronchial fibroblasts from smokers. For comparison,

bronchial fibroblasts from patients with COPD were stimulated with carbachol or TGF- β 1, reaching slightly higher levels of collagen type I and α -SMA mRNA transcripts than those observed in fibroblasts from smokers (figure 2A–D; white bars). Acidinium dose-dependently reduced carbachol- and TGF- β 1-induced collagen type I and α -SMA mRNA in a similar fashion to that in fibroblasts from smokers (figure 2A–D; white bars).

Immunofluorescence of α -SMA in response to carbachol showed a distinct appearance of numerous bundles of actin microfilaments comparable to the response with TGF- β 1 (figure 2E,F). Control fibroblasts showed diffuse irregular cytoplasmic α -SMA staining with no filamentous pattern. The percentage of cells expressing α -SMA microfilaments following carbachol or TGF- β 1 exposure was 36 (5%) and 60 (10%), respectively. Acidinium 10^{-7} M significantly reduced carbachol- and TGF- β 1-induced α -SMA microfilament formation to 5 (2%) and 15 (3%), respectively.

Figure 3 Carbachol (CCh)-induced expression of collagen type I (col type I) and α -smooth muscle actin (α -SMA) is partially mediated by transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1). Human lung fibroblasts were stimulated with CCh for 48 h. (A, B) Acidinium (ACL), Rho kinase inhibitor (Y27632), dibutyryl cyclic AMP analogue (dbcAMP), ERK1/2 inhibitor (PD98059), anti-TGF- β 1 antibody (4 μ g/ml) or their IgG isotypes were added to the medium 30 min before CCh stimulation. After incubation, total protein was extracted and western blots were performed for col type I (A) and α -SMA (B). Graphs from (A) and (B) represent values of densitometry of col type I (A) and α -SMA (B) protein expression relative to β -actin and normalised to solvent controls. Representative western blots show col type I (A) and α -SMA (B) protein expression. In other experiments, cells were stimulated with CCh in the presence or absence of ACL (C, E, F), Y27632 (D, E, F), PD98059 (D, E, F) or dbcAMP (D, E, F). After incubation, total protein (C, D), RNA (E) or cell culture supernatants were collected and TGF- β 1 protein (C, D), mRNA (E) as well as the active form of TGF- β 1 present in the culture medium (F) were quantified by western blot, RT-PCR and ELISA, respectively. Each graph represents the mean of three (A–D) or six (E, F) experiments. One-way repeated measures analysis of variance (ANOVA): $p < 0.001$ (A–F). Post hoc Bonferroni-Holm tests: * $p < 0.05$ compared with solvent controls; # $p < 0.05$ compared with stimulus.



Carbachol increases myofibroblast markers by a TGF- β 1 common mechanism

Carbachol-induced collagen type I and α -SMA protein expression was suppressed when cells were pretreated with acridinium, the Rho kinase inhibitor Y27632, the cAMP analogue dbcAMP or the ERK1/2 inhibitor PD98059 (figure 3A,B). Western blot analysis showed that carbachol-induced collagen type I and α -SMA expression was almost completely suppressed by an anti-TGF- β 1 antibody (4 μ g/ml) (figure 3A,B). Furthermore, carbachol increased TGF- β 1 cellular protein and mRNA expression (figure 3C–E) and increased a small but significant amount of extracellular TGF- β 1 (figure 3F). Pretreatment of cells with acridinium or with Y27632, dbcAMP or PD98059 effectively suppressed TGF- β 1 protein and mRNA expression as well as TGF- β 1 extracellular secretion, even below control levels.

We next explored whether TGF- β 1 activates the non-neuronal cholinergic system. The enzyme AChE (10 U/ml) was used to remove any extracellular ACh during the 48-hour period of TGF- β 1 stimulation. AChE reduced the increase in collagen type I and α -SMA expression induced by TGF- β 1 (figure 4A,B). However, the analysis of ACh supernatant levels revealed no differences between the control group and cells treated with TGF- β 1 or acridinium (figure 4C), probably due to the rapid ACh degradation by extracellular cholinesterases present on fibroblasts.^{21 22} In other experiments we observed that TGF- β 1 is able to upregulate ChAT expression in human lung fibroblasts and that this effect is reversed by acridinium (figure 4D). All these results

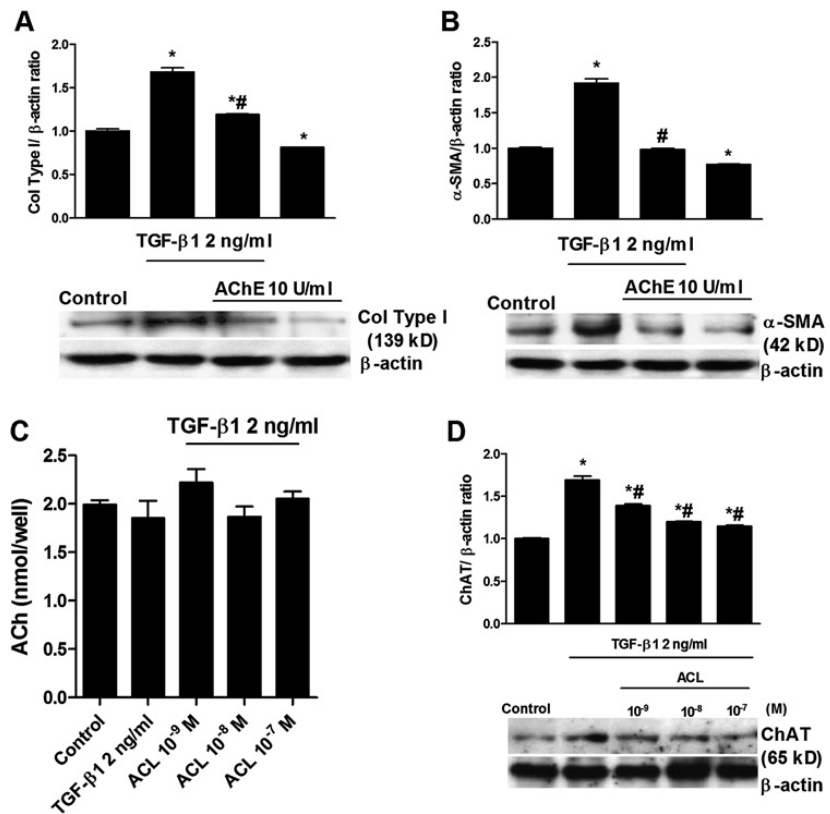
suggest that muscarinic receptor activation may share common downstream pathways with TGF- β 1. This hypothesis is supported by the inhibition of both carbachol- and TGF- β 1-induced increases in ERK1/2 phosphorylation and RhoA-GTP formation by acridinium (figure 5A,B). Acridinium also prevented the inhibition of isoprenaline-induced intracellular cAMP levels by carbachol (figure 5C).

Carbachol and TGF- β 1 modify muscarinic receptor expression

Human lung fibroblasts showed high levels of mRNA for M2 transcripts and, to a lesser extent, for M1 and M3 transcripts, respectively (data not shown), while M4 and M5 transcripts were not detected, consistent with previous reports in primary human lung fibroblasts.¹⁰ Setting the protein expression level of M1 at 1, the amount of M2 protein expression in human lung fibroblasts under basal conditions was approximately 2.6-fold and 2.4-fold higher than that of M1 and M3, respectively (figure 6A–C). When cells were incubated with TGF- β 1 or carbachol for 48 h, protein expression of M1 and M3 receptors was upregulated while M2 expression was downregulated (figure 6A,B). Acridinium pretreatment prevented the upregulation of M1 and M3, but not M2 downregulation induced by carbachol or TGF- β 1 (figure 6A,B). In parallel experiments, Y27632, dbcAMP or PD98059 reduced the carbachol-induced M1 and M3 upregulation but did not modify M2 expression (figure 6C).

To better understand which muscarinic receptor is involved in myofibroblast transition, fibroblasts were preincubated with the

Figure 4 Transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1)-induced expression of collagen type I (col type I) and α -smooth muscle actin (α -SMA) is partially mediated by the non-neuronal acetylcholine system. Human lung fibroblasts were stimulated with TGF- β 1 for 48 h. (A, B) Acetylcholinesterase was added to the medium 30 min before TGF- β 1 stimulation. After incubation, total protein was extracted and western blots were performed for col type I and α -SMA. The graphs in (A) and (B) represent values of densitometry of col type I and α -SMA protein expression relative to β -actin and normalised to solvent controls, respectively. Representative western blots show col type I (A) and α -SMA (B) protein expression. In other experiments (C, D), cells were stimulated with TGF- β 1 for 48 h in the presence or absence of acridinium (ACL). After incubation, cell culture supernatants (C) and total protein (D) were collected. Acetylcholine (ACh) supernatant levels were measured by ELISA (C), and choline acetyltransferase (ChAT) expression (D) was quantified by western blot analysis, related to β -actin and normalised to solvent controls. Each graph represents the mean of three (A–D) individual experiments. One-way repeated measures analysis of variance (ANOVA): $p < 0.001$ (A–D). Post hoc Bonferroni-Holm tests: * $p < 0.05$ compared with solvent controls; # $p < 0.05$ compared with stimulus.



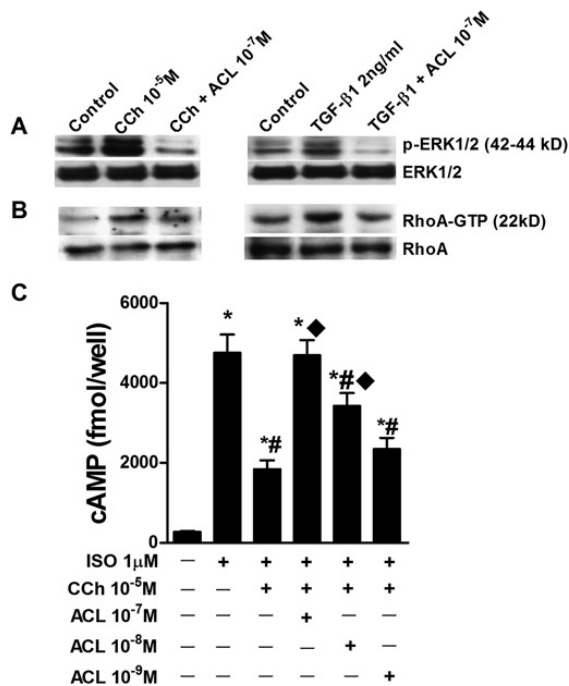


Figure 5 Carbachol (CCh)-induced ERK1/2 phosphorylation, RhoA-GTP expression and cAMP inhibition are prevented by acclidinium (ACL). Human lung fibroblasts were stimulated with CCh or transforming growth factor-β1 (TGF-β1) for 48 h (A, B). ACL was added to the medium 30 min before CCh or TGF-β1 stimulation (A, B). After incubation, total protein was extracted and western blots for pERK1/2, total ERK1/2 (A) and RhoA-GTP, RhoA (B) were performed. (C) ACL was incubated for 30 min followed by the addition of CCh for 10 min and isoprenaline (ISO) (10⁻⁶ M) for another 10 min. Total cAMP content was determined using biotrack enzyme immunoassay kit and absorbance was read at 450 nm. The Western blots (A, B) are representative of three independent experiments. (C) represents the mean of three individual experiments. One-way repeated measures analysis of variance (ANOVA): p<0.001 (C). Post hoc Bonferroni-Holm tests: *p<0.05 compared with solvent controls; #p<0.05 compared with ISO; ◆p<0.05 related to CCh plus ISO.

M1 antagonist pirenzepine, M2 antagonist methoctramine or M3 antagonist pFHHSid. Both collagen type I and α-SMA expression increased by carbachol or TGF-β1 were prevented by M1, M2 and M3 antagonists, although the M2 antagonist methoctramine was less effective at inhibiting α-SMA expression (figure 6D,E). In other experiments in which M1, M2 and M3 receptors were selectively silenced by transfecting cells with siRNA-M1, siRNA-M2 and siRNA-M3, carbachol-induced collagen type I and α-SMA were totally suppressed (figure 6F).

Acclidinium inhibits common phenotypic alterations of myofibroblasts

Subconfluent cells were exposed to TGF-β1 or carbachol for 48 h in the presence or absence of acclidinium (10⁻⁹ to 10⁻⁷ M). Both TGF-β1 and carbachol increased cell proliferation by approximately 2.25- and 1.75-fold, respectively (figure 7A-C). Acclidinium dose-dependently inhibited the TGF-β1 and carbachol-induced cell proliferation with statistical significance at 10⁻⁸ M and 10⁻⁷ M (figure 7A,B). Furthermore, Y27632, dbcAMP and PD98059 preincubation effectively reduced cell

proliferation induced by carbachol (figure 7C). In other experiments, human bronchial fibroblast closure studies were performed to analyse cell migration. Acclidinium (figure 7D,E) and Y27632, dbcAMP and PD98059 (figure 7F) dose-dependently inhibited cell migration and wound closure.

DISCUSSION

This study describes for the first time the mechanistic and functional involvement of a non-neuronal cholinergic system in the lung fibroblast to myofibroblast transition and provides evidence for the use of anticholinergic agents in lung diseases in which lung remodelling occurs. The relevance of these findings was highlighted by the finding that acclidinium effectively attenuated carbachol- and TGF-β1-induced myofibroblast transition in bronchial fibroblasts from smokers and patients with COPD. These observations suggest that acclidinium may have anti-remodelling properties in addition to its sustained bronchodilation and positive safety profile for anticholinergic adverse events observed in clinical trials.²³

Myofibroblasts are characterised by secretion of extracellular matrix components such as collagen type I (a characteristic shared with fibroblasts) and by formation of contractile apparatus such as α-SMA microfilaments (a characteristic shared with airway smooth muscle cells). Furthermore, myofibroblasts show a high proliferative and migratory activity under inflammatory conditions.³ In this respect, recent human in vivo evidence has shown that muscarinic agonist (methacholine) inhalation promotes myofibroblast expansion and airway smooth muscle dedifferentiation into myofibroblasts that migrate to the submucosal level.²⁴ These data, together with the capacity of ACh to promote fibroblast proliferation and collagen secretion, suggest that the cholinergic system may be involved in the process of fibroblast to myofibroblast transition and contribute to the increased pool of myofibroblasts that has been observed in the lungs of patients with asthma and COPD.

Until now, available data of muscarinic agonist effects on lung fibroblasts have been restricted to fibroblast proliferation and collagen synthesis.^{10 11 25} In this study we show for the first time that collagen type I and α-SMA microfilaments are up-regulated following carbachol exposure. Furthermore, we demonstrate a link between the cholinergic and TGF-β1 systems. Previous reports showed that cholinergic receptor stimulation may increase the expression and release of TGF-β in different cell types.²⁶⁻²⁸ Recently it was observed that lung fibroblasts stimulated with interleukin 1β (IL-1β), tumour necrosis factor α (TNFα) or cigarette smoke extract increase ChAT expression, suggesting the presence of a non-neuronal ACh system in lung fibroblasts.⁹ In our study, carbachol increased TGF-β1 expression and secretion, which may account for the induction of collagen type I and α-SMA which was inhibited by an anti-TGF-β1 antibody. Furthermore, acclidinium was able to significantly reduce the TGF-β1 expression and secretion induced by carbachol, which indicates that muscarinic receptors are also involved in this process. Similar to what occurs under inflammatory conditions, TGF-β1 was able to increase ChAT expression and, more interestingly, the addition of AChE suppressed the TGF-β1-induced increase in collagen type I and α-SMA. These results suggest that TGF-β1 activates a non-neuronal cholinergic system.

Since carbachol and TGF-β1 may alter cell markers to induce fibroblast to myofibroblast transition, changes in the expression of M receptors may also be expected. The pattern of M receptor expression on lung fibroblasts has recently been studied in

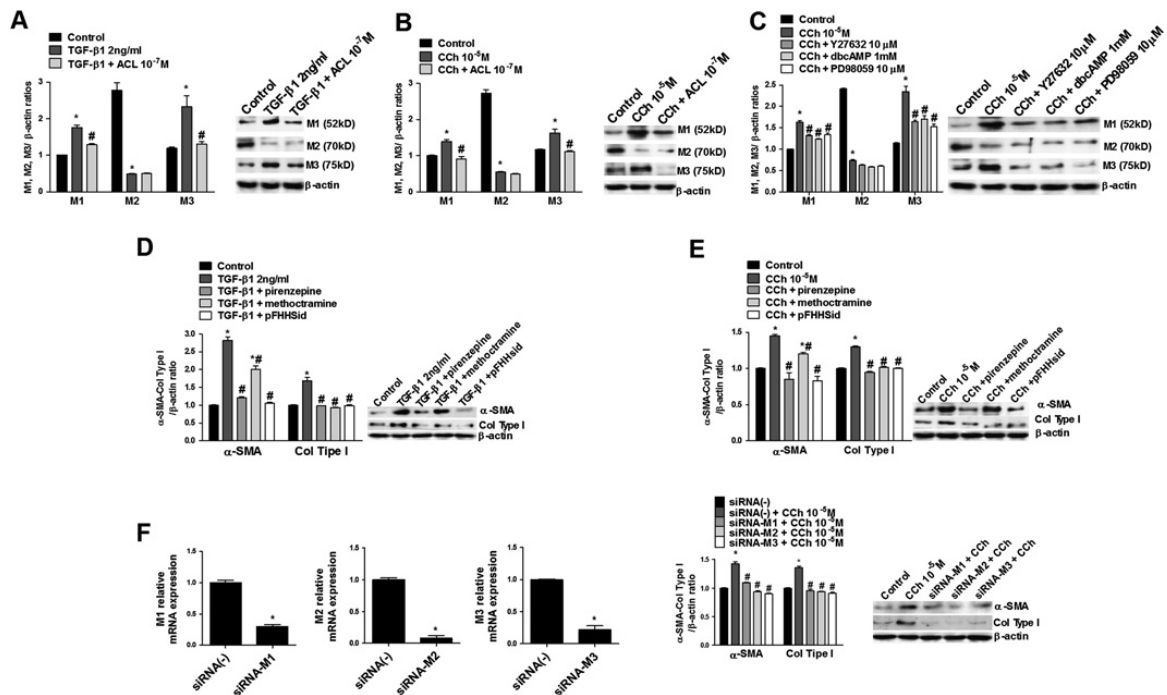


Figure 6 Carbachol (CCh) and transforming growth factor $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) alter muscarinic receptor (M) expression and induce fibroblast to myofibroblast transition via M1, M2 and M3. Human lung fibroblasts were stimulated with TGF- $\beta 1$ (A) or CCh (B, C) for 48 h. (A, B) acclidinium (ACL), (C) Rho kinase inhibitor (Y27632), (C) dibutyryl cyclic AMP analogue (dbcAMP) or ERK1/2 inhibitor (PD98059) were added to the medium 30 min before stimulation. After incubation, total protein was extracted and western blots were performed for M1, M2 and M3. The graphs (A, B, C) represent values of densitometry of M1, M2 or M3 protein expression relative to β -actin and normalised to solvent controls; representative western blots are also shown for M1, M2 and M3. In other experiments, cells were stimulated with TGF- $\beta 1$ (D) or CCh (E) in the presence or absence of M1 antagonist pirenzepine, M2 antagonist methoctramine or M3 antagonist p-fluoro-hexahydro siladifenidol (pFHHSid) for 48 h. After incubation, total protein was extracted and western blots were performed for collagen type I (col type I) and α -smooth muscle actin (α -SMA). The graphs (D, E) represent values of densitometry of col type I and α -SMA protein expression relative to β -actin and normalised to solvent controls; representative western blots are shown for col type I and α -SMA. (F) Left black graphs show M1, M2 and M3 mRNA expression after 48 h of treatment with siRNA-M1, M2 and M3. Right graph (F) shows cells selectively transfected with siRNA-M1, M2 and M3 that were stimulated with CCh for 48 h. After incubation, total protein was extracted and col type I and α -SMA protein expression were expressed relative to β -actin and normalised to solvent controls. Representative western blots are shown for col type I and α -SMA. Each graph represents the mean of three (A–F) individual experiments. One-way repeated measures analysis of variance (ANOVA): $p < 0.001$ (A–F). Post hoc Bonferroni-Holm tests: * $p < 0.05$ compared with solvent controls; # $p < 0.05$ compared with stimulus.

detail,²⁹ but data on the expression of myofibroblast M receptors are scarce. It has been reported that human lung fibroblasts express high amounts of M2 mRNA transcripts and protein followed by M1 and, to a lesser extent, M3,^{9, 29} which is in agreement with our results (figure 6). Interestingly, both carbachol and TGF- $\beta 1$ increased M1 and M3 protein expression and reduced M2 expression after 48 h of exposure. Similar findings were also shown in lung fibroblasts following exposure to IL-1 β , TNF α or cigarette smoke extract.⁹ Furthermore, lung fibroblasts from patients with COPD showed an upregulation of M1 and M3 and downregulation of M2 with respect to control subjects.⁹ Previous reports also showed that TGF- $\beta 1$ downregulates M2 expression in human embryonic lung fibroblasts³⁰ and may increase M3 expression in smooth muscle cells.³¹ Since the myofibroblast phenotype possesses morphological and biochemical features intermediate between fibroblasts and smooth muscle cells, the M1 and M3 upregulation found after myofibroblast transition could be related to their high contractile cellular capacity, as shown previously.³² These results are consistent with the in vivo conditions where M3 and, to a lesser extent, M1 are coupled to G_q protein and therefore contribute to

bronchial and tracheal smooth muscle contraction.⁸ We also found that the antimuscarinic acclidinium attenuates M1 and M3 upregulation induced by carbachol and TGF- $\beta 1$, which in turn correlates with the inhibitory effect of acclidinium on fibroblast to myofibroblast transition.

It remains unclear whether there is a specific muscarinic receptor involved in fibroblast to myofibroblast transition. Until now, M2 was considered to be the main receptor subtype responsible for fibroblast proliferation and collagen synthesis. These data were based on the high M2 expression and by the action of the G_{i/o} protein inhibitor pertussis toxin and M-subtype antagonists with a limited selective action.^{10, 11} Results from lung fibroblasts recently showed that all muscarinic receptors are involved in fibroblast proliferation.⁹ In the present study we further evaluate this thesis by using pharmacological intervention (M1, M2 and M3 antagonists) as well as genetic techniques that allow specific silencing of each receptor (siRNAs of M1, M2 and M3). We demonstrated that collagen type I and α -SMA upregulation—and therefore myofibroblast transition—is mediated by these three types of muscarinic receptors.

Figure 7 Acridinium inhibits fibroblast proliferation and migration.

Semiconfluent fibroblasts were grown in 96-well plates in the presence or absence of transforming growth factor β 1 (TGF- β 1) (A) or carbachol (CCh) (B) for 48 h. (A, B) Acridinium (ACL), (C) Rho kinase inhibitor (Y27632), dibutyryl cyclic AMP analogue (dbcAMP) or ERK1/2 inhibitor (PD98059) were added to the medium 30 min before stimulation. After incubation, cell proliferation was assessed by colorimetric BrdU assay. In panels (D–F), fibroblasts were stimulated for 48 h with CCh or vehicle (control) in the presence or absence of ACL (D, E), Y27632 (F), dbcAMP (F) or PD98059 (F). After stimulation, a circular wound edge was created in the centre of the well by removing a p-200 pipette tip. The cells were washed and re-exposed to the same conditions and wound closure was monitored for 24 h and 48 h. (D) Circular wound closure image at $\times 50$ final augmentation (scale bar 60 μ m). Each graph represents the mean of three individual experiments. One-way repeated measures analysis of variance (ANOVA): $p < 0.001$ (A–F). Post hoc Bonferroni-Holm tests: * $p < 0.05$ compared with solvent controls; # $p < 0.05$ compared with stimulus.

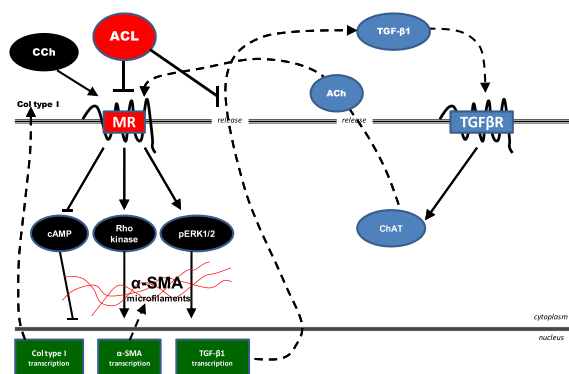
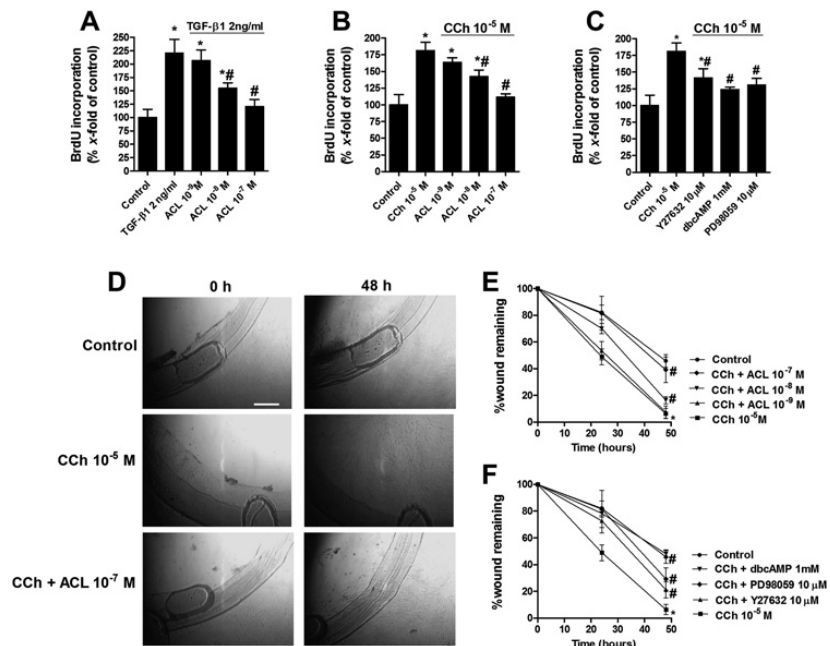


Figure 8 Model to explain the transforming growth factor β 1 (TGF- β 1)-induced non-neuronal cholinergic system on bronchial fibroblast to myofibroblast transition as well as the inhibitory effect of acridinium (ACL). The muscarinic receptor agonist carbachol (CCh) increases the myofibroblast markers collagen type I (Col type I) and α smooth muscle actin (α -SMA) through the phosphorylation of extracellular signal-regulated protein kinase (ERK)-1/2 and activation of Rho kinase. Depletion of intracellular cyclic AMP (cAMP) induced by CCh also contributes to Col type I and α -SMA upregulation. CCh activates the expression and secretion of TGF- β 1 which activates the choline acetyltransferase (ChAT) expression and activity in an autocrine fashion. ChAT increases the synthesis and secretion of acetylcholine (ACh) which activates the muscarinic receptors and promotes fibroblast to myofibroblast transition in an autocrine fashion. The antimuscarinic acridinium (ACL) inhibits the effects of CCh and ACh on fibroblast to myofibroblast transition. Thus, ACL inhibits ERK1/2 phosphorylation, Rho kinase activation, cAMP downregulation and Col type I and α -SMA expression. Furthermore, ACL inhibits TGF- β 1 expression and secretion as well as the non-neuronal cholinergic activation of fibroblast to myofibroblast transition.

There is also evidence of ERK1/2 involvement on the muscarinic agonist-induced fibroblast proliferation and collagen synthesis.^{9 10 25} In the present study we found that carbachol and TGF- β 1 induce ERK1/2 phosphorylation, and that this effect was effectively blocked by acridinium. Furthermore, PD98059, the specific inhibitor of ERK1/2, attenuates carbachol-induced collagen type I and α -SMA upregulation, cell proliferation and migration, as well as TGF- β 1 expression and secretion. Similar results were observed for RhoA activation and cAMP downregulation induced by carbachol. It is known that muscarinic receptors and TGF- β 1 activate ERK1/2 and RhoA-GTP.^{6 28} RhoA activation has been implicated in fibroblast proliferation and migration,³³ and increased intracellular cAMP levels act as a potent inhibitor of the fibroblast to myofibroblast transition.³⁴ In this study, acridinium was shown to inhibit RhoA-GTP formation and prevent carbachol-induced cAMP downregulation. Interestingly, the inhibitors of Rho kinase (Y27632 and dbcAMP) were able to inhibit fibroblast to myofibroblast transition as well as cell proliferation and migration. These data support ERK1/2, RhoA-GTP and cAMP as intracellular messengers that contribute to carbachol-induced fibroblast to myofibroblast transition (figure 8). Furthermore, the muscarinic antagonist acridinium inhibits the activation of ERK1/2 and RhoA-GTP by carbachol and TGF- β 1, and prevents the decrease of cAMP levels, which in turn inhibits the myofibroblast transition (figure 8).

In addition to the pathways explored in this work, numerous previous studies have shown that TGF- β 1 induces myofibroblast differentiation including collagen and α -SMA expression via Smad-mediated pathways. It has recently been shown that the anticholinergic tiotropium may suppress TGF- β 1-induced Smad2/4 activation in lung fibroblasts suggesting a crosstalk between TGF- β 1 and muscarinic signalling.³⁵

In summary, we have shown that activation of muscarinic receptors induces fibroblast to myofibroblast transition through an increase in ERK1/2 phosphorylation, RhoA-GTP formation and downregulation of cAMP levels and provide evidence that cholinergic and TGF- β 1 pathways interact to induce myofibroblast transition. The muscarinic antagonist acclidinium was a potent inhibitor of the fibroblast to myofibroblast transition following carbachol or TGF- β 1 exposure. We therefore conclude that, in addition to its bronchodilatory activity, acclidinium may play a role in regulating fibrotic remodelling in chronic inflammatory diseases such as asthma and COPD.

Acknowledgements We are grateful for the valuable help of Professors M Guijarro and M Juan of the Medicine Department of the Valencia University General Hospital for access to, and isolation of, human fibroblasts. We thank Clare Smith from Complete Medical Communications who provided editing assistance funded by Almirall SA, Barcelona, Spain.

Funding This work was supported by Almirall SA, Barcelona, Spain and in part by grants SAF2008-03113 (JC), SAF2009-08913 (EJM), CIBERES (CB06/06/0027) and research grants from Regional Government (Prometeo/2008/045, 'Generalitat Valenciana'; Emerging Groups GE-029/10, 'Generalitat Valenciana' (to JM)). Support from the CENIT programme (Spanish government) and Almirall (Barcelona, Spain) was obtained. Almirall SA was not involved in the study design, collection, analysis or interpretation of data, writing of the report or the decision to submit the paper for publication. TP received a research grant from Conselleria de Educaci3n, Generalitat Valenciana ACIF/2010/114.

Competing interests EJM and JC received a research grant from Almirall. AG and MM are employees of Almirall.

Patient consent Obtained.

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

Provenance and peer review Not commissioned; externally peer reviewed

REFERENCES

1. Benayoun L, Druihe A, Dombret MC, et al. Airway structural alterations selectively associated with severe asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;**167**:1360–8.
2. Hogg JC, Chu F, Utokaparch S, et al. The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2004;**350**:2645–53.
3. Singh SR, Hall IP. Airway myofibroblasts and their relationship with airway myocytes and fibroblasts. *Proc Am Thorac Soc* 2008;**5**:127–32.
4. Undem BJ, Kollarik M. The role of vagal afferent nerves in chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* 2005;**2**:355–60.
5. Gross NJ. Anticholinergic agents in asthma and COPD. *Eur J Pharmacol* 2006;**533**:36–9.
6. Bos IS, Gosens R, Zuidhof AB, et al. Inhibition of allergen-induced airway remodelling by tiotropium and budesonide: a comparison. *Eur Respir J* 2007;**30**:653–61.
7. Kawashima K, Fujii T. Basic and clinical aspects of non-neuronal acetylcholine: overview of non-neuronal cholinergic systems and their biological significance. *J Pharmacol Sci* 2008;**106**:167–73.
8. Gosens R, Zaagsma J, Meurs H, et al. Muscarinic receptor signaling in the pathophysiology of asthma and COPD. *Respir Res* 2006;**7**:73.
9. Profita M, Bonanno A, Siena L, et al. Smoke, choline acetyltransferase, muscarinic receptors, and fibroblast proliferation in chronic obstructive pulmonary disease. *J Pharmacol Exp Ther* 2009;**329**:753–63.
10. Haag S, Matthiesen S, Juergens UR, et al. Muscarinic receptors mediate stimulation of collagen synthesis in human lung fibroblasts. *Eur Respir J* 2008;**32**:555–62.
11. Matthiesen S, Bahulayan A, Kempkens S, et al. Muscarinic receptors mediate stimulation of human lung fibroblast proliferation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006;**35**:621–7.
12. Cazzola M, Matera MG. Novel long-acting bronchodilators for COPD and asthma. *Br J Pharmacol* 2008;**155**:291–9.
13. Gavalda A, Miralpeix M, Ramos I, et al. Characterization of acclidinium bromide, a novel inhaled muscarinic antagonist, with long duration of action and a favorable pharmacological profile. *J Pharmacol Exp Ther* 2009;**331**:740–51.
14. Scotton CJ, Chambers RC. Molecular targets in pulmonary fibrosis: the myofibroblast in focus. *Chest* 2007;**132**:1311–21.
15. Jain R, Shaul PW, Borok Z, et al. Endothelin-1 induces alveolar epithelial-mesenchymal transition through endothelin type A receptor-mediated production of TGF-beta1. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2007;**37**:38–47.
16. Cortijo J, Mata M, Milara J, et al. Acclidinium inhibits cholinergic and tobacco smoke-induced MUC5AC in human airways. *Eur Respir J* 2011;**37**:244–54.
17. Milara J, Ortiz JL, Juan G, et al. Cigarette smoke exposure up-regulates endothelin receptor B in human pulmonary artery endothelial cells: molecular and functional consequences. *Br J Pharmacol* 2010;**161**:1599–615.
18. Mata M, Sarria B, Buenestado A, et al. Phosphodiesterase 4 inhibition decreases MUC5AC expression induced by epidermal growth factor in human airway epithelial cells. *Thorax* 2005;**60**:144–52.
19. Widdop S, Daykin K, Hall IP. Expression of muscarinic M2 receptors in cultured human airway smooth muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1993;**9**:541–6.
20. Milara J, Mata M, Serrano A, et al. Extracellular calcium-sensing receptor mediates human bronchial epithelial wound repair. *Biochem Pharmacol* 2010;**80**:236–46.
21. Jin QH, Shi YF, He HY, et al. Isolation of acetylcholinesterase from apoptotic human lung fibroblast cells by antibody affinity chromatography. *Biotechniques* 2002; (Suppl):92–4, 96–7.
22. Thullbery MD, Cox HD, Schule T, et al. Differential localization of acetylcholinesterase in neuronal and non-neuronal cells. *J Cell Biochem* 2005;**96**:599–610.
23. Alagha K, Bourdin A, Turmino C, et al. An update on the efficacy and safety of acclidinium bromide in patients with COPD. *Ther Adv Respir Dis* 2011;**5**:19–28.
24. Kelly MM, O'Connor TM, Leigh R, et al. Effects of budesonide and formoterol on allergen-induced airway responses, inflammation, and airway remodeling in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2010;**125**:349–56.
25. Matthiesen S, Bahulayan A, Holz O, et al. MAPK pathway mediates muscarinic receptor-induced human lung fibroblast proliferation. *Life Sci* 2007;**80**:2259–62.
26. Lacmann A, Hess D, Gohla G, et al. Activity-dependent release of transforming growth factor-beta in a neuronal network in vitro. *Neuroscience* 2007;**150**:647–57.
27. Tan J, Deng ZH, Liu SZ, et al. TGF-beta2 in human retinal pigment epithelial cells: expression and secretion regulated by cholinergic signals in vitro. *Curr Eye Res* 2010;**35**:37–44.
28. Thangjam GS, Agarwal P, Balapure AK, et al. Regulation of extracellular matrix genes by arecoline in primary gingival fibroblasts requires epithelial factors. *J Periodontol Res* 2009;**44**:736–43.
29. Racke K, Haag S, Bahulayan A, et al. Pulmonary fibroblasts, an emerging target for anti-obstructive drugs. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2008;**378**:193–201.
30. Haddad EB, Rouseil J, Mak JC, et al. Transforming growth factor-beta 1 induces transcriptional down-regulation of m2 muscarinic receptor gene expression. *Mol Pharmacol* 1996;**49**:781–7.
31. Akiho H, Khan WI, Al-Kaabi A, et al. Cytokine modulation of muscarinic receptors in the murine intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007;**293**:G250–5.
32. Bogatkevich GS, Tourkina E, Abrams CS, et al. Contractile activity and smooth muscle alpha-actin organization in thrombin-induced human lung myofibroblasts. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003;**285**:L334–43.
33. Croft DR, Olson MF. The Rho GTPase effector ROCK regulates cyclin A, cyclin D1, and p27Kip1 levels by distinct mechanisms. *Mol Cell Biol* 2006;**26**:4612–27.
34. Kolodtsick JE, Peters-Golden M, Larios J, et al. Prostaglandin E2 inhibits fibroblast to myofibroblast transition via E. Prostanoid receptor 2 signaling and cyclic adenosine monophosphate elevation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003;**29**:537–44.
35. Asano K, Shikama Y, Shoji N, et al. Tiotropium bromide inhibits TGF-beta-induced MMP production from lung fibroblasts by interfering with Smad and MAPK pathways in vitro. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 2010;**5**:277–86.

**ACLIDINIUM INHIBITS CIGARETTE SMOKE-INDUCED LUNG FIBROBLAST
TO MYOFIBROBLAST TRANSITION**

J. Milara^{1,2,3*}, A. Serrano^{1*}, T. Peiró¹, E. Artigues⁴, A. Gavalda⁵, M. Miralpeix⁵, E. J. Morcillo^{2,6}, J. Cortijo^{1,2,6}

¹Research Unit, University General Hospital Consortium, Valencia, Spain; ²CIBERES, Health Institute Carlos III, Valencia, Spain; ³Department of Biotechnology, Universidad Politécnica de Valencia, Spain; ⁴ Department of Surgery, General University Hospital of Valencia, Valencia, Spain; ⁵Almirall, R&D Centre, Barcelona, Spain; ⁶Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, University of Valencia, Spain

*Both authors contributed equally to this work

Corresponding author: Javier Milara, Ph.D., Fundación de Investigación, Consorcio, Hospital General Universitario, Avenida tres cruces s/n, E-46014 Valencia, Spain;
Tel: +0034 620231549, Fax: +0034 961972145 E-mail: xmilara@hotmail.com¹

Running title: Acridinium bromide mitigates myofibroblast markers

ABSTRACT

Cigarette smoking, contributes to lung remodeling in chronic obstructive pulmonary disease (COPD). As part of remodeling, peribronchiolar fibrosis is observed in small airways of COPD patients and contributes to airway obstruction. Fibroblast to myofibroblast transition is a key step of the peribronchiolar fibrosis formation. This *in vitro* study examines the effect of cigarette smoke on bronchial fibroblast to myofibroblast transition, and whether acclidinium bromide inhibits this process. Human bronchial fibroblasts were incubated with acclidinium bromide (10^{-9} M- 10^{-7} M) and exposed to cigarette smoke extract. Collagen type I and alpha-smooth muscle actin expression were measured by real-time PCR and Western blotting as myofibroblast markers. Intracellular reactive oxygen species, cAMP, ERK 1/2 and choline acetyltransferase were measured as intracellular signaling mediators. Cigarette-smoke-induced collagen type I and alpha-smooth muscle actin was mediated by the production of reactive oxygen species, the depletion of intracellular cAMP and the increase of ERK1/2 phosphorylation and choline acetyltransferase. These effects could be reversed by treatment with the anticholinergic acclidinium bromide, by silencing mRNA at muscarinic receptors M1, M2 or M3, or by the depletion of extracellular acetylcholine by treatment with acetylcholinesterase. Non-neuronal cholinergic system is implicated in cigarette smoke-induced bronchial fibroblast to myofibroblast transition which is inhibited by acclidinium bromide.

Keywords: Anticholinergic, cigarette smoke, COPD, Non-neuronal cholinergic system.

INTRODUCTION

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is characterized by airflow limitation that is progressive and not fully reversible. Cigarette smoking is the main risk factor for COPD and contributes to structural changes in airways during COPD progression [1]. Structural changes in COPD patients are characterized by loss of alveolar wall (emphysema), vascular remodeling with pulmonary hypertension, mucus hypersecretion or peribronchiolar fibrosis [1]. As part of fibrotic alterations in COPD, structural changes are seen primarily in small airways. The severity of the disease appears to correlate with thickening of the wall of small airways caused by fibrosis and infiltration of inflammatory cells, which contributes to airflow obstruction [2]. Accumulation and persistence of myofibroblasts is believed to contribute to development of small airway fibrosis. In this respect, under chronic inflammatory conditions, resident lung fibroblasts are activated and transformed into a more contractile, proliferative and secretory-active myofibroblast phenotype, characterized by increased expression of extracellular matrix components and alpha-smooth muscle actin (α -SMA), which contribute to the increase of lung remodeling progression and airway bronchoconstrictor responsiveness [3].

Parasympathetic activity is increased in the airways of COPD patients and is the basis for the use of anticholinergic therapy [4]. Anticholinergics constitute a particularly important bronchodilator therapy in COPD and certain forms of asthma [5]. Furthermore, anticholinergics in animal models have shown potential anti-inflammatory and anti-remodeling effects [6], which may be of additional value to their classical bronchodilator effects.

Recently, it has been proposed that acetylcholine in the airways may be released by non-neuronal cell types, such as airway epithelial cells and lung fibroblasts. Therefore, a

dysfunction of a non-neuronal cholinergic system may contribute to the pathophysiology of asthma and COPD [7]. It has been shown that anticholinergic treatment inhibits cigarette smoke-induced mucin hypersecretion in human bronchial epithelial cells [8], as well as cigarette smoke-induced lung fibroblast proliferation [9]. Furthermore, choline acetyltransferase (ChAT), the intracellular enzyme responsible for acetylcholine production, is upregulated in both lung fibroblasts from COPD patients and fibroblasts stimulated with cigarette smoke [9]. However, no data exist concerning the role of cigarette smoke on fibroblast to myofibroblast transition, as well as the potential inhibitory effect of anticholinergics.

Aclidinium bromide is a novel, inhaled long-acting muscarinic antagonist compound with low systemic activity that has completed phase III clinical development for COPD treatment [10]. In preclinical studies, aclidinium bromide demonstrated potent muscarinic-antagonist activity, comparable to ipratropium bromide and tiotropium bromide, and long duration of action [11]. In clinical trials, aclidinium bromide has provided sustained bronchodilation, similar to that observed with tiotropium bromide, a good safety profile and low incidence of anticholinergic adverse events [10].

In this study, we investigated the role of aclidinium bromide on the increase of myofibroblast markers collagen type I and α -SMA elicited by chronic cigarette smoke exposure in human bronchial fibroblast, as well as the intracellular pathways involved in this process.

METHODS

See the online supplement for further details of the methods used.

Isolation and cultivation of human fibroblasts

Human bronchial fibroblasts were obtained from patients undergoing surgery for lung carcinoma who gave informed consent, as previously described [12]. Cultivation and characterization of fibroblasts were performed as described elsewhere [12]. Protocol for obtaining human tissue was approved by the local ethical review board for human studies (General Hospital of Valencia, Spain). *See* online supplement for details.

Preparation of cigarette-smoke extract and incubations

Cigarette-smoke extract (CSE) solutions were prepared as previously described [13]. Briefly, the smoke of a research cigarette (2R4F, Tobacco Health Research, University of Kentucky) was bubbled into a flask containing 25 ml of pre-warmed (37°C) Dulbecco's Modified Eagle Medium. The resulting solution was defined as CSE at 100%. CSE at 10% reportedly corresponds to exposure associated with smoking approximately 1–2 packs/d [14]. Before stimulation, subconfluent cell monolayers were deprived of serum for 24 h. Human bronchial fibroblasts were stimulated with CSE (0–10%) for different periods of time (0–72 h) replacing culture medium and stimulus every 24 h. Different drug modulators were added 30 minutes before stimulus. *See* online supplement for details.

Real-time RT-PCR

Total RNA was isolated from cultured human bronchial fibroblasts by using TriPure[®] (Roche, Indianapolis, IN) and reversely transcribed and amplified with specific primers. Relative quantification of these different transcripts was determined with the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method

using glyceraldehyde phosphate dehydrogenase as endogenous control (Applied Biosystems) and normalized to control group. *See* online supplement for details.

Transfection of siRNAs

Small interfering RNA (siRNA) for M1, M2 and M3 receptors and the scrambled siRNA control were purchased from Ambion (Huntingdon, Cambridge, UK). The transfection reagent used was lipofectamine-2000 (Invitrogen, Paisley, UK) at a final concentration of $2 \mu\text{l ml}^{-1}$. *See* online supplement for details.

Western blotting

Western blot analysis was used to detect changes in collagen type I (138 kD), α -SMA, p-ERK1/2 (42–44 kD), M1 (52 kD), M2 (70 kD), M3 (75 kD), p67phox (67 kD), NOX4 (67 kD) and ChAT (65 kD) from bronchial fibroblast lysates. *See* online data supplement for details of Western blot analyses and antibodies used.

DCF fluorescence measurement of reactive oxygen species

2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H₂DCF-DA, Molecular Probes, Nottingham UK) was used to monitor the intracellular reactive oxygen species (ROS) in bronchial fibroblasts. *See* online supplement for details.

cAMP assay

Human lung fibroblasts were cultured in 96-well plates until ~95% of confluence. Following different treatments, cells were lysed and intracellular cAMP content was

determined with cAMP Biotrak enzyme immunoassay according to manufacturer's instructions (Amersham, UK). Results were expressed as fmol/well.

Analysis of results

Data presented as mean \pm standard error of mean (SEM) of n experiments. Statistical analysis of data was performed by analysis of variance followed by Bonferroni test (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). Significance was accepted when $P < 0.05$.

RESULTS

Acidinium bromide attenuates CSE-induced myofibroblast markers in human bronchial fibroblast cultures

CSE, at 2.5% concentration, upregulated collagen type I and α -SMA in a time-dependent manner, reaching peak values following 48 h of CSE 2.5% exposure (Figures 1A, 1B). Furthermore, CSE dose-dependently increased collagen type I and α -SMA mRNA and protein expression reaching statistical significance at 2.5% concentration following 48 h of exposure (Figure 1C-F). Thus, we selected this CSE concentration to evaluate myofibroblast markers expression in future experiments.

In other experiments, acidinium bromide was added 30 minutes before CSE 2.5% and further incubated for 48 hours. Acidinium bromide dose-dependently reduced the CSE-induced collagen type I and α -SMA mRNA and protein expression, reaching maximal inhibitory value at 10^{-7} M (Figure 2A-C), Similar results were observed for atropine, reaching significant inhibition of both myofibroblast markers at 1μ M, suggesting the participation of cholinergic pathway in this process (Figure 2D-F). Both, acidinium or

atropine by themselves did not show any effect on myofibroblast markers (Figure E1 and E2, online supplement).

Acridinium bromide reduces intracellular ROS elevated by CSE in human bronchial fibroblasts

In our experiments on human primary lung fibroblasts, CSE (2.5 to 10%) dose-dependently increased intracellular ROS generation, reaching a significant value after 2 h of stimulation that was sustained for 24 h (Figure 3A). Pretreatment of bronchial fibroblasts with acridinium bromide dose-dependently reduced the CSE-induced ROS by nearly 50% at 10^{-7} M after 24 h of CSE 2.5% stimulation (Figures 3B, 3C). In parallel experiments, quenching of ROS by apocynin (100 μ M) or NAC (1 mM), as well as increasing cAMP with its analog dbcAMP suppressed CSE 2.5%-triggered intracellular ROS production (Figure 3C).

NADPH oxidase complex is constituted by several cytosolic and plasmatic membrane subunits [15]. Among the NADPH oxidase subunits analyzed, we found that the cytosolic p67phox and the plasmatic membrane unit NOX4 were the most expressed in bronchial fibroblasts under basal conditions (Figure 4A). Following 24-hour exposure, CSE 2.5% upregulated both mRNA transcripts and protein expression of p67phox and NOX4, which were dose-dependently reverted to near control values by exposure to acridinium bromide 10^{-7} M (Figure 4B–4D).

CSE Activation of Non-Neuronal Cholinergic System is Inhibited by Acridinium

Bromide

Previous reports indicated that CSE activates a non-neuronal cholinergic system in lung fibroblast, but the mechanism remains unclear. Since ChAT is the intracellular enzyme responsible for acetylcholine synthesis, we next explored the effect of CSE on ChAT expression. In this regard, CSE 2.5% increased ChAT expression, which was dose-dependently inhibited by acridinium bromide and by the antioxidants apocynin 100 μ M and NAC 1 mM (Figure 5A).

Intracellular levels of cAMP and phosphorylation of ERK1/2 have been related to the activation of human lung fibroblast [12, 16]. In this work we observed that CSE 2.5% reduced intracellular cAMP levels and increased the ERK1/2 phosphorylation following 24 h of exposure (Figure 5B-5D). Acridinium bromide pretreatment dose-dependently reduced the cAMP downregulation, as well as the increase of ERK1/2 phosphorylation (Figure 5B, 5C). Furthermore, the antioxidant treatment with apocynin 100 μ M or NAC 1 mM also reversed the CSE-induced cAMP downregulation and ERK1/2 phosphorylation (Figure 5B, 5D). Since CSE may activate a non-neuronal cholinergic system, we added the enzyme AChE (10 U/ml) to remove any extracellular acetylcholine during the 24-h period of CSE 2.5% stimulation. AChE partially reversed cAMP downregulation and ERK1/2 phosphorylation induced by CSE (Figure 5B, 5D).

The antioxidants N-acetyl-L-cysteine (NAC) 1 mM and apocynin 100 μ M, as well as the cAMP analog dbcAMP and the ERK1/2 inhibitor PD98059 10 μ M partially suppressed the CSE-induced collagen type I and α -SMA mRNA and protein expression (Figure 6A-6B). Moreover, both acridinium bromide 10^{-7} M and AChE 10 U/ml were also able to suppress

the CSE-induced collagen type I and α -SMA mRNA and protein expression in human bronchial fibroblasts, which implicates a non-neuronal cholinergic system in the upregulation of myofibroblast markers (Figure 6A–6B). To further study the role of non-neuronal cholinergic system in the myofibroblast transformation, lung fibroblast were incubated with the inhibitor of choline uptake transporter hemicholinium-3 at 50 μ M, or with the acetylcholinesterase inhibitor neostigmine 10 μ M before CSE 2.5% exposure. Hemicholinium-3 significantly inhibited the CSE-induced collagen type I and α -SMA mRNA and protein expression, while neostigmine significantly increased the CSE-induced collagen type I and α -SMA mRNA and protein expression (Figure 6C-6D). In absence of CSE, the different drugs assayed did not show any effect on mRNA or protein expression of collagen type I and α -SMA (Figure E3 and E4, online supplementary data).

CSE Upregulation of Myofibroblast Markers is Partially Mediated by M1, M2 and M3 Receptors

Human bronchial fibroblasts transfected with siRNA for M1, M2 or M3 selectively suppressed specific M receptors without affecting other M receptors (Figure 7A-7B). In this line, siRNA for all three M receptors showed suppression of CSE-induced myofibroblast markers collagen type I and α -SMA (Figure 7C), indicating that all three M receptors may be involved in mediating the induction of the myofibroblast markers.

DISCUSSION

The main and novel results of this study are that (1) CSE increased the myofibroblast markers collagen type I and α -SMA in human bronchial fibroblast through a mechanism mediated by increase of intracellular ROS, depletion of cAMP, and phosphorylation of

ERK1/2; (2) CSE activated a non-neuronal cholinergic system by means of over-expression of ChAT, mediating increase of myofibroblast markers; (3) the anticholinergic acridinium bromide was able to attenuate the CSE-induced myofibroblast markers through inhibition of ROS generation, cAMP depletion, ERK1/2 phosphorylation, and ChAT over-expression induced by CSE. These new findings provide *in vitro* evidence of the anti-remodeling effect of acridinium bromide on human bronchial fibroblasts in those cigarette smoke exposure situations that may contribute to the amelioration of the peribronchiolar fibrosis observed in smokers with COPD.

It is known that airflow limitation in COPD patients occurs in distal airways considered as non-cartilaginous-conducting airways with an internal diameter <2 mm. In this work we carefully dissected small bronchi of ~2 mm to obtain bronchial fibroblasts, which may represent the place where peribronchiolar fibrosis occurs [17]. Bronchiolar fibroblast transformation into myofibroblast is considered a key step in the process of increased thickness of the small airways, reducing airways radius and enhancing airflow limitation. Myofibroblasts share phenotypic characteristics with fibroblasts and airway smooth muscle cells. In this regard, myofibroblasts are characterized by secretion of extracellular matrix components, such as collagen type I, a characteristic that is shared with fibroblasts but not with smooth muscle cells, and by formation of contractile apparatus such as α -SMA, a characteristic that is shared with airway smooth muscle cells but not with fibroblasts [3]. Therefore, we selected both of these molecular markers to analyze the myofibroblast-like phenotype. Several growth factors and proinflammatory mediators such as TGF β 1, IL-13 or CTGF have been described as inducers of myofibroblast transition [18]; however, no data were available on cigarette smoke, the main risk factor for COPD. In this work, we prepared CSE as we and others have described previously [13, 14], which approximately

corresponds to exposures associated with smoking slightly fewer than 0.5 packs/d to slightly fewer than 2 packs/d of cigarettes for CSE 2.5% and 10%, respectively. Currently, several *in vitro* studies have been focused on effect of CSE on lung fibroblasts; however, no data are available on effect of CSE on bronchial fibroblast to myofibroblast transition. In this work, we observed that CSE promoted myofibroblast markers over-expression, which is compatible with the myofibroblast-like phenotype [3]. Furthermore, the CSE-induced expression of myofibroblast markers was mediated by intracellular ROS production, which was significantly increased after 2 h of exposure and remained at least until 24 h. The ROS increase preceded the collagen type I and α -SMA over-expression (after 48 h), suggesting a role of intracellular ROS as second messenger. Similar time-response of ROS production has previously been reported in human primary lung fibroblasts [19]. Intracellular ROS production in response to CSE is mediated by direct activation of the NADPH complex [20]. The NADPH complex is constituted by several cytosolic and plasmatic membrane units, which vary depending on the cell type. Thus, in human lung fibroblasts, the NADPH oxidase components p47phox, p67phox, p22phox and NOX4 have been observed [21]. In this work, we found that the NADPH units p67phox and NOX4 were the most expressed in bronchial fibroblasts. The cytosolic p67phox unit is mobilized under certain conditions to activate the membrane plasmatic units NOX1, NOX2 or NOX3 to produce $O^{\cdot -}$ and/or H_2O_2 . In contrast, the plasmatic membrane unit NOX4 does not require interaction and activation by cytosolic regulatory subunits, so its activation is directly related with its expression [15]. In this regard, we found that CSE induced the upregulation of both p67phox and NOX4 NADPH oxidase units after 24 h of stimulation, which was in accordance with the increase of intracellular ROS.

Recent reports have related expression of NOX4 as a key factor of fibroblast progression and fibroblast to myofibroblast transition [22]. Therefore, a treatment diminishing NOX4, and in turn, intracellular ROS, may prevent myofibroblast transition. We found that 24-h exposure to either the antioxidant NAC or the NADPH oxidase inhibitor apocynin inhibited the CSE-induced p67phox and NOX4 upregulation. These antioxidant modulators were also able to reduce myofibroblast markers induced by CSE, establishing a link between oxidative stress and myofibroblast transition. The anticholinergic acridinium bromide attenuated myofibroblast markers induced by CSE and that this action was mediated in part by the inhibition of the p67phox and NOX4 expression, as well as by the consequent reduction of intracellular ROS generated by CSE. These results suggest that CSE activates a non-neuronal cholinergic system. Previous reports have suggested that cigarette smoke may activate a non-neuronal cholinergic system in different cell types, including airways and human lung fibroblasts. For example, we have recently shown that CSE promotes synthesis and release of the mucin MUC5AC in differentiated bronchial epithelial cells by a mechanism mediated by release of acetylcholine, and can be inhibited by acridinium bromide [8]. Furthermore, human lung fibroblasts from COPD patients have shown an increase of M receptors, as well as ChAT expression, an effect that was mimicked in healthy lung fibroblasts after CSE exposure [9]. In our experiments, AChE prevented the CSE-induced expression of myofibroblast markers, which is consistent with the presence of a non-neuronal cholinergic system. Other evidence to support the activation of a non-neuronal cholinergic system by cigarette smoke includes the upregulation of ChAT, the intracellular enzyme responsible of acetylcholine synthesis. We observed that CSE upregulated ChAT expression, which was prevented by the antioxidants NAC and apocynin, as well as by acridinium bromide, suggesting the participation of intracellular

ROS. Further evidence of the participation of non-neuronal cholinergic system was supported by the inhibition of myofibroblast transition blocking choline uptake with hemicholinium, and increasing myofibroblast markers inhibiting acetylcholinesterase with neostigmine.

Nowadays it is believed that cigarette smoke contains more than 6000 compounds and possibly this list will grow in line with the new analytical techniques available [23]. Taken in account this assertion, we know that cigarette smoke extract (CSE), have the advantage of containing all of the compounds inhaled by smokers. However, due to the very complexity of CSE, it is difficult to identify the specific agent mediating precise effect because differences found for particular concentrations and durations of exposure of a given agent of CSE. To that end, one can perform a dose–response and time course and make some crude calculations to suggest that exposure mimics what *might* happen *in vivo*. Thus for example, low concentrations of CSE (under 5%) have shown proliferative effects on lung fibroblasts [24-26], while higher (more than 10%) concentrations showed inhibitory effects on lung fibroblast proliferation [27], thus indicating that between the ~ 6,000 substance of cigarette smoke, there are some proliferative and other anti-proliferative compounds that may act depending of their final balance.

In the present work we have used 2.5% of CSE, which is in agreement with the low doses of CSE demonstrating proliferative effects in previous studies [24-26] which support fibroblast activation in the process of myofibroblast transition [28].

Preliminary data observed in our laboratory indicated that CSE at 2.5% concentration had a slight increase of fibroblast proliferation after 48 h of exposure (based on BrDU incorporation assay; data not shown). However, this increase was not enough to perform inhibitory experiments with acridinium bromide. This was the main reason to discard these

experiments, since the well established myofibroblast markers collagen type I and α -SMA are more reliable in mechanistic studies [3].

However, even if one could calculate exposure, experiments performed with CSE cannot mimic all of the components of the microenvironment that exist in living systems (as cell-cell interactions). Thus, despite limitations, results from these studies allow to determine the capacity of CSE to influence cellular functions while eliminating other variables.

Intracellular cAMP is a second messenger that mediates a high number of anti-inflammatory processes. In addition to its anti-inflammatory actions, cAMP also controls the inhibition of fibroblast activation, as well as the myofibroblast transition [29]. Thus, a decrease of the levels of cAMP could promote fibroblast to myofibroblast transition. This is evidenced by TGF β 1, which increases the expression and activity of phosphodiesterases, the enzymes that degraded cAMP, promoting myofibroblast transition [30]. In the case of cigarette smoke, it has been shown that hydrogen peroxide, a component of tobacco smoke, swiftly elevates the activity of phosphodiesterase 4D3 attributed to PI3K and ERK-dependent phosphorylations [31]. In this respect, we have previously observed that CSE reduces intracellular cAMP levels in human differentiated bronchial epithelial cells by means of phosphodiesterase 4B upregulation (data not shown). In this work, we observed that CSE decreases intracellular levels of cAMP and that this effect was partially reversed by the antioxidant NAC and acridinium bromide, suggesting a role of intracellular ROS. Furthermore, AChE also attenuated the CSE-reduced cAMP, which indicates the involvement of the non-neuronal cholinergic system. This may be explained by the fact that the main M receptor expressed on lung fibroblasts is the M2 [32], which is coupled to Gi protein, so stimulation of M2 by means of a non-neuronal cholinergic system could also

promote the inhibition of adenylate cyclase (AC)/cAMP pathway, and therefore, myofibroblast transition.

In line with our results, recently, it has been found that PGE₂, as a potent cAMP enhancer, may inhibit the activation of fibroblast and the transformation into myofibroblast [33, 34]. Thus, we cannot discard that one of the mechanisms of acridinium bromide mediating the increase of cAMP and consequently the inhibition of myofibroblast transition could be the increase of PGE₂ release.

Another pathway we investigated was ERK1/2 signaling. Previous studies have shown that ERK1/2 participates in fibroblast to myofibroblast transition [35] and that CSE directly phosphorylates ERK1/2 [9]. Thus, CSE-induced myofibroblast transition could be mediated in part by ERK1/2. In this work, we observed that CSE induced the phosphorylation of ERK1/2, which was reduced by acridinium bromide and by the antioxidant treatment. Moreover, AChE also attenuates the CSE-induced ERK1/2 phosphorylation, suggesting that the activation of M receptors is also implicated. Previous results support the notion that M receptor activation increases collagen expression in human lung fibroblasts by means of ERK1/2 activation [12]. Therefore, a non-neuronal cholinergic system may also be participating in the process of CSE-induced ERK1/2 phosphorylation. Thus, the role of ERK1/2 in the CSE-induced myofibroblast markers was confirmed by the inhibitory effect of the ERK1/2 antagonist PD98059.

Based on these results, we may conclude that CSE activates M receptors in human bronchial fibroblasts by a non-neuronal cholinergic system, and that this mechanism is involved in the upregulation of the myofibroblasts markers. However, the answer to which isoform of M receptors plays a significant role in this mechanism is unclear. It has been shown that the inhibition of the G_i protein with pertussis toxin reduces the fibroblast

proliferation and collagen expression observed in response to muscarinic agonists [12], suggesting a key role for the M2 receptor. However, antagonists for M1, M2 and M3 were all effective at inhibiting the fibroblast proliferation induced by acetylcholine [9], although the specific M antagonists available are not fully selective [36]. To address this issue, we selectively silenced M1, M2 and M3 genes using siRNA. Our results suggest that all M1, M2 and M3 receptors participate in CSE-induced expression of myofibroblast markers. In summary, we have demonstrated that cigarette smoke, which is the main risk factor of COPD and participates in lung remodeling, may increase myofibroblast markers collagen type I and α -SMA through the activation of a non-neuronal cholinergic system, which is attenuated by the anticholinergic acclidinium bromide. Therefore, results observed in this work support that acclidinium bromide may play a role in regulating peribronchiolar fibrotic remodeling of COPD in addition to the classical bronchodilator activity.

Acknowledgments

This work was supported by Almirall S.A., Barcelona, Spain and in part by grants SAF2011-26443 (JC), SAF2009-08913 (EJM), FIS (Miguel Servet CP11/00293(JM)), CIBERES (CB06/06/0027) and research grants from Regional Government (Prometeo/2008/045, 'Generalitat Valenciana'; Research grants from 'Generalitat Valencia' AP-178/11 [JM]). We thank Cath Bryant from Complete Medical Communications who provided copy-editing support funded by Almirall S.A., Barcelona, Spain.

Competing interests

AG and MM are employees of Almirall.

REFERENCES

1. Hogg JC, Chu F, Utokaparch S, Woods R, Elliott WM, Buzatu L, Cherniack RM, Rogers RM, Sciurba FC, Coxson HO, Pare PD. The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2004; 350(26): 2645-2653.
2. Jeffery PK. Remodeling and inflammation of bronchi in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* 2004; 1(3): 176-183.
3. Singh SR, Hall IP. Airway myofibroblasts and their relationship with airway myocytes and fibroblasts. *Proc Am Thorac Soc* 2008; 5(1): 127-132.
4. Undem BJ, Kollarik M. The role of vagal afferent nerves in chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* 2005; 2(4): 355-360; discussion 371-352.
5. Gross NJ. Anticholinergic agents in asthma and COPD. *Eur J Pharmacol* 2006; 533(1-3): 36-39.
6. Bos IS, Gosens R, Zuidhof AB, Schaafsma D, Halayko AJ, Meurs H, Zaagsma J. Inhibition of allergen-induced airway remodelling by tiotropium and budesonide: a comparison. *Eur Respir J* 2007; 30(4): 653-661.
7. Gosens R, Zaagsma J, Meurs H, Halayko AJ. Muscarinic receptor signaling in the pathophysiology of asthma and COPD. *Respir Res* 2006; 7: 73.
8. Cortijo J, Mata M, Milara J, Donet E, Gavalda A, Miralpeix M, Morcillo EJ. Aclidinium inhibits cholinergic and tobacco smoke-induced MUC5AC in human airways. *Eur Respir J* 2011; 37(2): 244-254.
9. Profita M, Bonanno A, Siena L, Bruno A, Ferraro M, Montalbano AM, Albano GD, Riccobono L, Casarosa P, Pieper MP, Gjomarkaj M. Smoke, choline acetyltransferase,

muscarinic receptors, and fibroblast proliferation in chronic obstructive pulmonary disease. *J Pharmacol Exp Ther* 2009; 329(2): 753-763.

10. Prat M, Gavalda A, Fonquerna S, Miralpeix M. Inhaled muscarinic antagonists for respiratory diseases: a review of patents and current developments (2006 - 2010). *Expert Opin Ther Pat* 2011.
11. Gavalda A, Miralpeix M, Ramos I, Otal R, Carreno C, Vinals M, Domenech T, Carcasona C, Reyes B, Vilella D, Gras J, Cortijo J, Morcillo E, Llenas J, Ryder H, Beleta J. Characterization of aclidinium bromide, a novel inhaled muscarinic antagonist, with long duration of action and a favorable pharmacological profile. *J Pharmacol Exp Ther* 2009; 331(2): 740-751.
12. Matthiesen S, Bahulayan A, Kempkens S, Haag S, Fuhrmann M, Stichnote C, Juergens UR, Racke K. Muscarinic receptors mediate stimulation of human lung fibroblast proliferation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006; 35(6): 621-627.
13. Ortiz JL, Milara J, Juan G, Montesinos JL, Mata M, Ramon M, Morcillo E, Cortijo J. Direct effect of cigarette smoke on human pulmonary artery tension. *Pulm Pharmacol Ther* 2010; 23(3): 222-228.
14. Su Y, Han W, Giraldo C, De Li Y, Block ER. Effect of cigarette smoke extract on nitric oxide synthase in pulmonary artery endothelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998; 19(5): 819-825.
15. Petry A, Weitnauer M, Gorlach A. Receptor activation of NADPH oxidases. *Antioxid Redox Signal* 2010; 13(4): 467-487.
16. Huang S, Wettlaufer SH, Hogaboam C, Aronoff DM, Peters-Golden M. Prostaglandin E(2) inhibits collagen expression and proliferation in patient-derived normal lung

fibroblasts via E prostanoid 2 receptor and cAMP signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007; 292(2): L405-413.

17. Burgel PR, Bourdin A, Chanez P, Chabot F, Chaouat A, Chinet T, de Blic J, Devillier P, Deschildre A, Didier A, Garcia G, Jebrak G, Laurent F, Morel H, Perez T, Pilette C, Roche N, Tillie-Leblond I, Verbanck S, Dusser D. Update on the roles of distal airways in COPD. *Eur Respir Rev* 2011; 20(119): 7-22.
18. Scotton CJ, Chambers RC. Molecular targets in pulmonary fibrosis: the myofibroblast in focus. *Chest* 2007; 132(4): 1311-1321.
19. Baglolle CJ, Bushinsky SM, Garcia TM, Kode A, Rahman I, Sime PJ, Phipps RP. Differential induction of apoptosis by cigarette smoke extract in primary human lung fibroblast strains: implications for emphysema. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006; 291(1): L19-29.
20. Dasari V, Gallup M, Lemjabbar H, Maltseva I, McNamara N. Epithelial-mesenchymal transition in lung cancer: is tobacco the "smoking gun"? *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006; 35(1): 3-9.
21. Dhaunsi GS, Paintlia MK, Kaur J, Turner RB. NADPH oxidase in human lung fibroblasts. *J Biomed Sci* 2004; 11(5): 617-622.
22. Hecker L, Vittal R, Jones T, Jagirdar R, Luckhardt TR, Horowitz JC, Pennathur S, Martinez FJ, Thannickal VJ. NADPH oxidase-4 mediates myofibroblast activation and fibrogenic responses to lung injury. *Nat Med* 2009; 15(9): 1077-1081.
23. Milara J, Cortijo J. Tobacco, Inflammation, and Respiratory Tract Cancer. *Curr Pharm Des* 2012.

24. Krimmer DI, Burgess JK, Wooi TK, Black JL, Oliver BG. Matrix proteins from smoke-exposed fibroblasts are pro-proliferative. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2012; 46(1): 34-39.
25. Liu Y, Gao W, Zhang D. Effects of cigarette smoke extract on A549 cells and human lung fibroblasts treated with transforming growth factor-beta1 in a coculture system. *Clin Exp Med* 2010; 10(3): 159-167.
26. Wang Q, Fan J, Liu S. [Effects of cigarette smoke solution and chrysotile on proliferation activity of human embryo lung cells]. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi* 1999; 33(4): 231-233.
27. Miglino N, Roth M, Lardinois D, Sadowski C, Tamm M, Borger P. Cigarette smoke inhibits lung fibroblast proliferation by translational mechanisms. *Eur Respir J* 2012; 39(3): 705-711.
28. Milara J, Serrano A, Peiro T, Gavalda A, Miralpeix M, Morcillo EJ, Cortijo J. Acridinium inhibits human lung fibroblast to myofibroblast transition. *Thorax* 2012; 67(3): 229-237.
29. Huang SK, Wettlaufer SH, Chung J, Peters-Golden M. Prostaglandin E2 inhibits specific lung fibroblast functions via selective actions of PKA and Epac-1. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2008; 39(4): 482-489.
30. Kolosionek E, Savai R, Ghofrani HA, Weissmann N, Guenther A, Grimminger F, Seeger W, Banat GA, Schermuly RT, Pullamsetti SS. Expression and activity of phosphodiesterase isoforms during epithelial mesenchymal transition: the role of phosphodiesterase 4. *Mol Biol Cell* 2009; 20(22): 4751-4765.
31. Hill EV, Sheppard CL, Cheung YF, Gall I, Krause E, Houslay MD. Oxidative stress employs phosphatidyl inositol 3-kinase and ERK signalling pathways to activate

- cAMP phosphodiesterase-4D3 (PDE4D3) through multi-site phosphorylation at Ser239 and Ser579. *Cell Signal* 2006; 18(11): 2056-2069.
32. Racke K, Haag S, Bahulayan A, Warnken M. Pulmonary fibroblasts, an emerging target for anti-obstructive drugs. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2008; 378(2): 193-201.
 33. Kolodsick JE, Peters-Golden M, Larios J, Toews GB, Thannickal VJ, Moore BB. Prostaglandin E2 inhibits fibroblast to myofibroblast transition via E. prostanoid receptor 2 signaling and cyclic adenosine monophosphate elevation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003; 29(5): 537-544.
 34. Thomas PE, Peters-Golden M, White ES, Thannickal VJ, Moore BB. PGE(2) inhibition of TGF-beta1-induced myofibroblast differentiation is Smad-independent but involves cell shape and adhesion-dependent signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007; 293(2): L417-428.
 35. Caraci F, Gili E, Calafiore M, Failla M, La Rosa C, Crimi N, Sortino MA, Nicoletti F, Copani A, Vancheri C. TGF-beta1 targets the GSK-3beta/beta-catenin pathway via ERK activation in the transition of human lung fibroblasts into myofibroblasts. *Pharmacol Res* 2008; 57(4): 274-282.
 36. Caulfield MP, Birdsall NJ. International Union of Pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmacol Rev* 1998; 50(2): 279-290.

Figure legends

Figure 1. CSE time- and dose-dependently increases collagen type I (Col Type I) and alpha-smooth muscle actin (α -SMA) in human bronchial fibroblasts. Human lung fibroblasts were stimulated with cigarette smoke extract (CSE) at the indicated times (A, B) or for 48 h at the indicated concentrations (C to F). (A to D) After incubation, the RNA was extracted and subjected to RT-PCR with Col type I and α -SMA-specific primers and probes. (E, F) After incubation, total protein was extracted and western blots were performed with specific antibodies for Col Type I and α -SMA. Bars from graphs E and F represent densitometries of three different western blots. Each bar represents the mean \pm SEM of 4 (A to D) or 3 (E and F) independent experiments. One-way repeated measures analysis of variance (ANOVA): $P < 0.001$ (A to F). *Post hoc* Bonferroni test: $*P < 0.05$ compared with solvent controls.

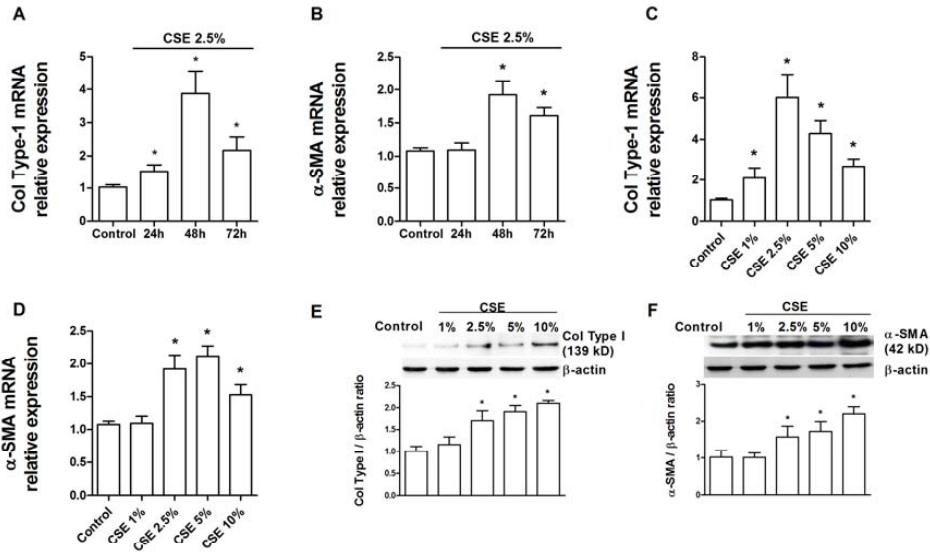


Figure 1

Figure 2. Acridinium bromide dose-dependently reduces the CSE-induced collagen type I (Col Type I) and alpha-smooth muscle actin (α -SMA) in human bronchial fibroblasts. Human lung fibroblasts were stimulated with cigarette smoke extract (CSE) for 48 hours. Acridinium bromide (ACL) or atropine (ATR) were added to the medium at the indicated concentrations 30 minutes before CSE. Total RNA (A, B and D, E) and protein (C and F) were extracted after the incubation period. A, B and D, E graphs show RT-PCR for Col Type I (A and D) or α -SMA (B and E). Graphs C and F represent values of densitometry of Col Type I or α -SMA protein expression relative to β -actin and normalized to solvent controls. Representative western blots of Col Type I and α -SMA are shown. Each graph represents the mean \pm SEM of three experiments for western blots and four independent experiments for RNA experiments. One-way repeated measures analysis of variance

(ANOVA): $P < 0.001$ (A–C). *Post hoc* Bonferroni test: $*P < 0.05$ compared with solvent controls; $\#P < 0.05$ compared with stimulus.

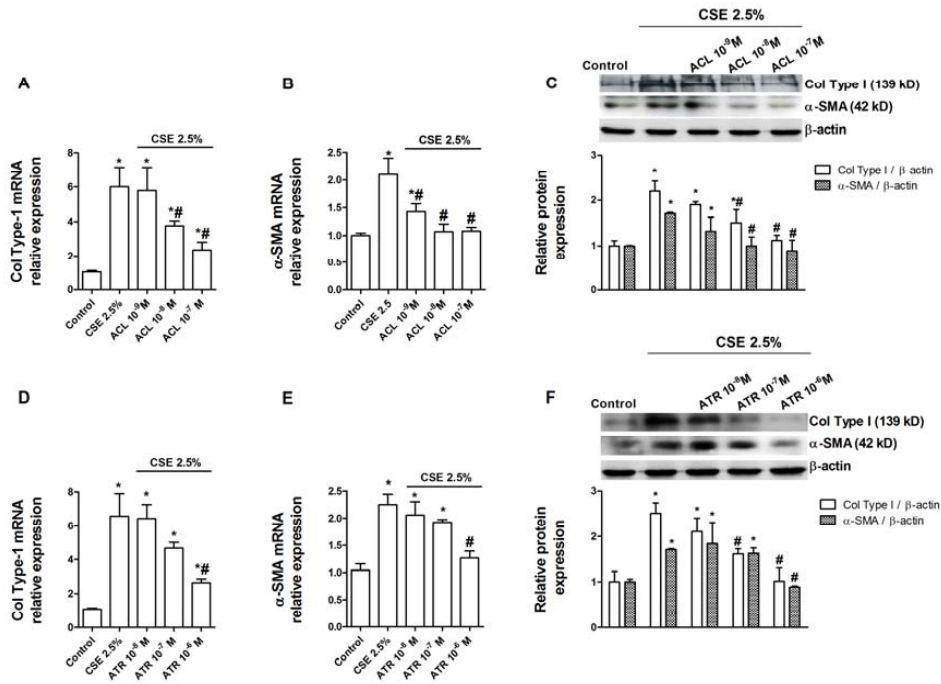


Figure 3. Acridinium bromide mitigates CSE-induced intracellular ROS generation in human bronchial fibroblasts. (A) Human bronchial fibroblasts were loaded with H₂DCF-DA 30 minutes before cigarette smoke extract (CSE) stimulation. CSE dose and time-dependently increased intracellular ROS in human bronchial fibroblasts. (B and C) Human bronchial fibroblasts were loaded with H₂DCF-DA in the presence or absence of acridinium bromide (ACL; 10^{-10} M- 10^{-7} M), apocynin (APO; 100 μ M), N-acetyl-L-cysteine (NAC; 1 mM), dbcAMP (1 mM) or vehicle for 30 minutes. Excess H₂DCF-DA was removed by

washing with PBS. ACL, APO, NAC, dbcAMP or vehicle were appropriately replenished before cells were exposed to CSE. (B) Representative DCF fluorescence images following 24 h of basal or CSE 2.5% stimulation in presence or absence of ACL. (C) ACL dose-dependently attenuated the CSE 2.5%-induced intracellular ROS after 24 h of stimulation. Similar results were found for APO, NAC and dbcAMP. Results represent the means \pm SEM of three independent experiments. One-way repeated measures analysis of variance (ANOVA): $P < 0.001$ (A and C). *Post hoc* Bonferroni test: $*P < 0.05$ compared with solvent controls; $\#P < 0.05$ compared with stimulus.

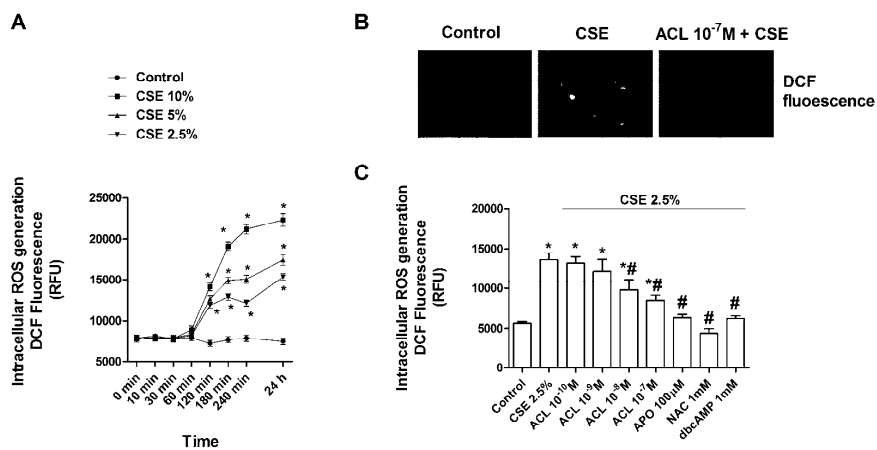


Figure 3

Figure 4. Acclidinium bromide attenuates the CSE-induced p67phox and NOX4 upregulation in human bronchial fibroblasts. (A) RNA was obtained from primary human bronchial fibroblasts and mRNA transcripts for NOX1, p67phox, p47phox and NOX4 were quantified and normalized setting p67phox as 100%. (B–D) Acclidinium bromide (ACL)

dose-dependently attenuated the cigarette smoke extract (CSE) 2.5%-induced p67phox and NOX4 mRNA (B and C) and protein (D) upregulation following 24 h of stimulation. Results represent the means \pm SEM of 3 independent experiments. One-way repeated measures analysis of variance (ANOVA); $P < 0.001$ (A–C). *Post hoc* Bonferroni test: $*P < 0.05$ compared with solvent controls; $\#P < 0.05$ compared with stimulus.

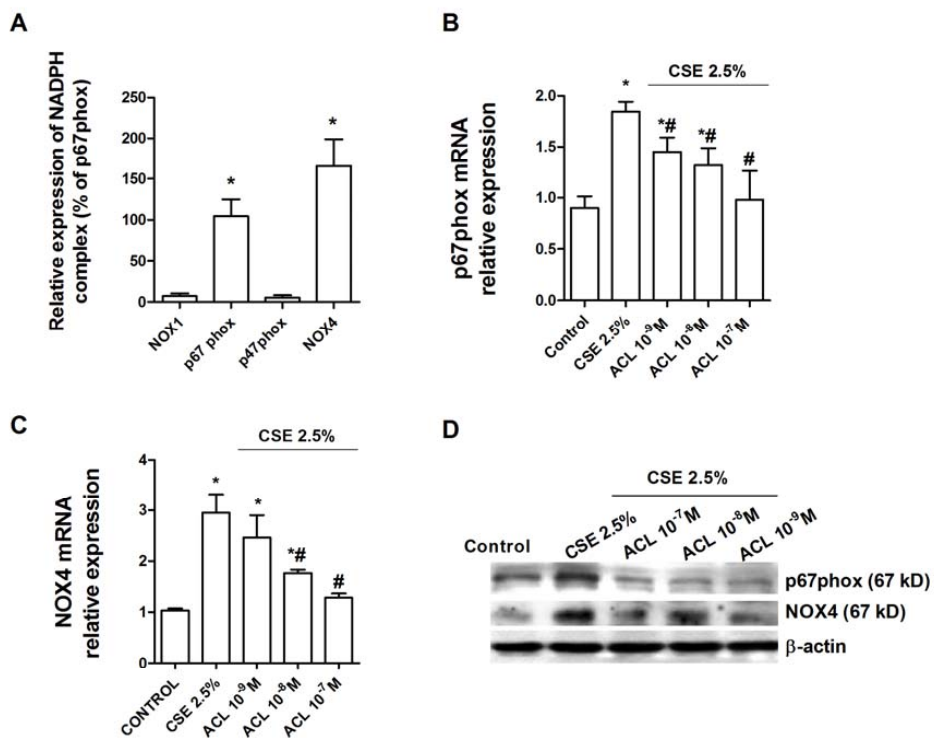


Figure 4

Figure 5. CSE activates non-neuronal cholinergic system, decreases cAMP and phosphorylates ERK1/2. Human bronchial fibroblasts were pre-incubated for 30 minutes

with (A-C) acridinium bromide (ACL: 10^{-9} M- 10^{-7} M), (A, B and D) apocynin (APO: 100 μ M), N-acetyl-L-cysteine (NAC: 1 mM) or (B, D) acetyl cholinesterase (AChE: 10 U/mL⁻¹) followed by the stimulation with CSE at 2.5% over 24 h. (A) total protein was extracted and western blots for choline acetyltransferase (ChAT) and β -actin, as internal control, were performed. Representative western blots are shown from three different experiments. (B) Cells were lysed and intracellular cAMP was quantified using cAMP Biotrak enzyme immunoassay (EIA) system. (C, D) Total protein was extracted and phosphorylated ERK1/2 and non-phosphorylated ERK1/2 (as internal control) protein expression were determined by western blots. Bars from graphs A, C and D represent densitometries of three different western blots. Results represent the means \pm SEM of 3-4 independent experiments. One-way repeated measures analysis of variance (ANOVA): $P < 0.01$. *Post hoc* Bonferroni test: * $P < 0.05$ compared with solvent controls; # $P < 0.05$ compared with stimulus.

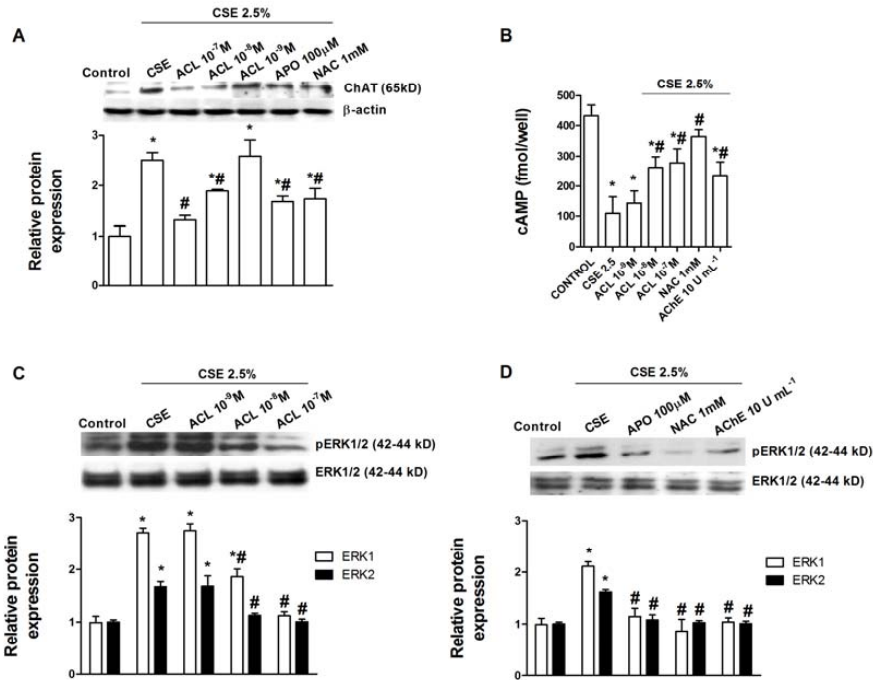


Figure 5

Figure 6. The CSE-induced collagen type I (Col Type I) and alpha-smooth muscle actin (α -SMA) are partially mediated by a non-neuronal cholinergic pathway. Human bronchial fibroblasts were pre-incubated for 30 minutes with acridinium bromide (ACL: 10^{-7} M), apocynin (APO: 100 μ M), N-acetyl-L-cysteine (NAC: 1 mM), PD98059 (10 μ M), dbcAMP (1 mM), acetyl cholinesterase (AChE: 10 U/ml), hemicholinium-3 (HC-3: 50 μ M) or neostigmine at 10 μ M followed by the stimulation with cigarette smoke extract (CSE) at 2.5% over 24 hours. Total RNA (A and C) or protein (B and D) were extracted to quantify mRNA transcripts and protein expression for Col Type I and α -SMA using appropriated primers and antibodies. Panel A and C represent values of Col Type 1 and α -SMA mRNA

expression normalized to control group using GAPDH as internal control. Panel B and D represent values of densitometry of Col Type I or α -SMA protein expression relative to β -actin and normalized to solvent controls. Representative western blots of Col Type I and α -SMA are shown. Each graph represents the mean \pm SEM of 3-4 independent experiments for western blots and for RNA experiments. One-way repeated measures analysis of variance (ANOVA): $P < 0.001$ (A and B). *Post hoc* Bonferroni test: $*P < 0.05$ compared with solvent controls; $\#P < 0.05$ compared with stimulus.

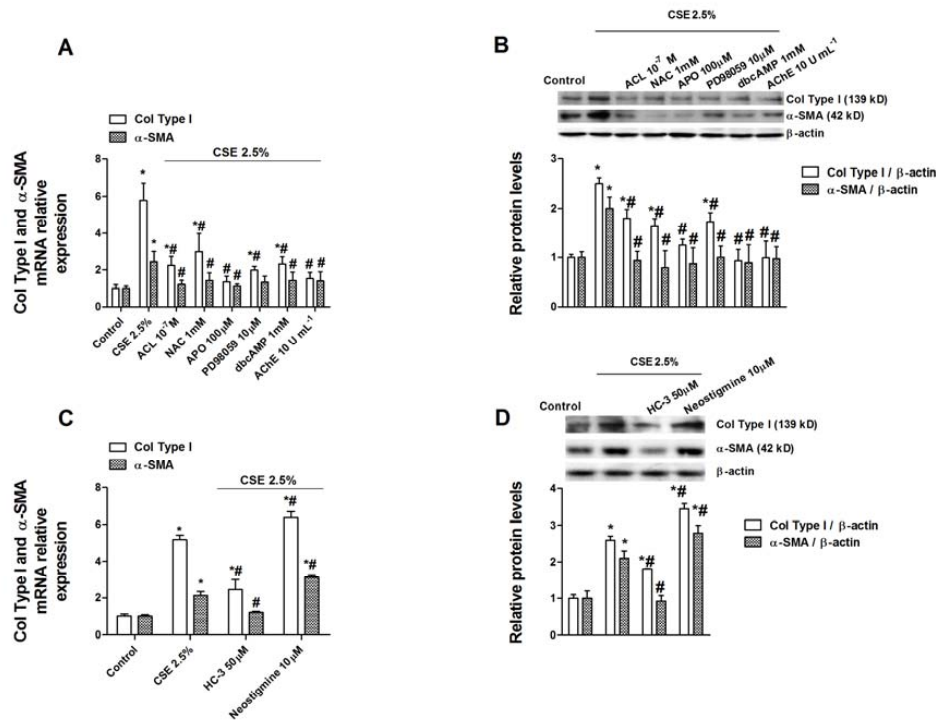


Figure 6

Figure 7. CSE increases myofibroblast markers by a non-neuronal cholinergic signaling mediated by M1, M2 and M3 receptors. Human bronchial fibroblasts were selectively transfected with silencing mRNA (siRNA: 50 nM) for M1, M2 and M3 or with the negative control siRNA(-) for 48 hours using lipofectamin at final concentration of 2 µg/ml. (A and B) All siRNA targeting M1, M2 and M3 genes were able to reduce mRNA and protein expression for M1, M2 and M3 significantly without effecting other M receptors. β-actin was assayed as positive control. Cells transfected with siRNA for M1, M2 and M3 genes attenuated the cigarette smoke (CSE) 2.5%- induced Col Type I and α-SMA protein upregulation. Results are the mean ± SEM of three independent experiments, and representative of three independent experiments per condition for western blots. One-way repeated measure analysis of variance (ANOVA): $P < 0.001$ (A). *Post hoc* Bonferroni test: $*P < 0.05$ compared with siRNA (-) controls.

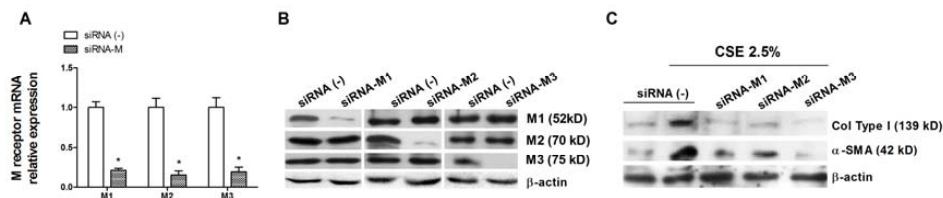


Figure 7

