

VNIVERSITAT E VALÈNCIA

PROGRAMA DE DOCTORADO
FARMACOLOGÍA



**EFFECTO DE LOS ANTAGONISTAS DE LOS RECEPTORES DE
ENDOTELINA SOBRE EL REMODELADO Y REACTIVIDAD DE
LA ARTERIA PULMONAR EN PACIENTES EPOC: ESTUDIO
FUNCIONAL Y MECANÍSTICO**

TESIS DOCTORAL
PRESENTADA POR:

ELENA GABARDA MARTÍNEZ

DIRIGIDA POR:

DR.D. ESTEBAN J. MORCILLO SÁNCHEZ
DR. D. JAVIER MILARA PAYÁ
DR. D. JULIO CORTIJO GIMENO

VALENCIA, 2015



Dr. D. ESTEBAN J. MORCILLO SÁNCHEZ, Rector de la Universidad de Valencia, Catedrático Numerario de Universidad, Departamento de Farmacología de la Universidad de Valencia,
Dr. D. JULIO CORTIJO GIMENO, Catedrático Numerario de Universidad, Departamento de Farmacología de la Universidad de Valencia, y
Dr. D. JAVIER MILARA PAYÁ, Doctor por la Universidad de Valencia, Farmacéutico Adjunto en el Hospital General Universitario de Valencia.

Certifican:

Que la Tesis Doctoral presentada por Dña. Elena Gabarda Martínez, con el título:

“EFECTO DE LOS ANTAGONISTAS DE LOS RECEPTORES DE ENDOTELINA SOBRE EL REMODELADO Y REACTIVIDAD DE LA ARTERIA PULMONAR EN PACIENTES EPOC: ESTUDIO FUNCIONAL Y MECANÍSTICO”

ha sido realizado bajo nuestra dirección y reúne los requisitos necesarios para su juicio y calificación.

Y para que así conste a los efectos oportunos, se firma el presente certificado en Valencia a 2 de Octubre del 2015.

Fdo. Dr. E.J. Morcillo Sánchez

Fdo. Dr. J. Cortijo Gimeno

Fdo. Dr. J. Milara Payá

Al finalizar este trabajo de Tesis Doctoral plagado de dificultades que nos vamos encontrando en el camino, me doy cuenta de que tengo que agradecer que este proyecto haya sido posible a muchas personas e instituciones. Cada una de ellas a su manera lo han hecho realidad.

A mis tres Directores de Tesis Doctoral, a todo el personal del Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina, al Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico Universitario de Valencia, al Servicio de Cirugía Torácica del Hospital Clínico Universitario de Valencia, a la Fundación de Investigación del Hospital General Universitario de Valencia y al Ministerio de Educación, Cultura y Deporte.

A mis padres y hermano

A Juan

A mis hijos

LISTADO DE ABREVIATURAS

α -SMA	α -actina de músculo liso
ABC	Área bajo la curva
ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNc	ácido desoxirribonucleico complementario
ADP	Adenosina difosfato
AMPc	Monofosfato de adenosina cíclico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATP	Adenosin trifosfato
AVAD	Año de Vida Ajustado por Discapacidad
AVAD _s	Años de Vida Ajustados por Discapacidad
BOS	Bosentan
BSA	Albúmina sérica bovina (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
CAT	<i>COPD Assessment Test</i>
CEAPHs	Células endoteliales de arteria pulmonar humana
CEIC	Comité Ético de Investigaciones Clínicas
CHGUV	Consortio Hospital General Universitario de Valencia
CML	Células de músculo liso
CMLAPHs	Células de músculo liso de arteria pulmonar humana

CPT	Capacidad Pulmonar Total
CRP	Proteína C-reactiva (<i>C-reactive protein</i>)
CVF	Capacidad vital forzada
DALY	<i>Disability Adjusted Life Year</i>
DAPI	<i>4',6- Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride</i>
DCF	2',7'-diclorofluoresceína
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidad óptica
DPI	Inhalador en polvo seco (<i>dry powder inhaler</i>)
EC ₅₀	Concentración eficaz 50%
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético (<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
EEM	Error estándar de la media
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (<i>Enzyme-linked immun-osorbent assay</i>)
Emax	Efecto máximo del fármaco
eNOS	Óxido nítrico sintasa endotelial
EGM	<i>Endothelial Cell Growth Medium</i>
EPOC	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
ERKS	<i>Extracellular-signal-regulated kinases</i>
ERO	Especies reactivas del oxígeno
ET	Endotelina

ET-1	Endotelina-1
ET-2	Endotelina-2
ET-3	Endotelina-3
ET _A	Receptor de endotelina A
ET _B	Receptor de endotelina B
ETRs	Receptores de endotelina
FCEV	Factor de crecimiento endotelial vascular
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GAPDH	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
GBD	<i>Global Burden of Diseases, Injuries, and Risk Factors Study</i>
GMPC	Guanosín monofosfato cíclico
GPCR	Receptor acoplado a proteína G (<i>G protein-coupled receptor</i>)
GOLD	Iniciativa Global para la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (<i>Global Obstructive Lung Disease</i>)
h	hora
H ₂ DCF-DA	2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazino etanosulfónico
HBSS	Solución salina de Hank, Buffer de corte (<i>Hank's balanced salt solution</i>)
HCUV	Hospital Clínico Universitario de Valencia
HP	Hipertensión pulmonar

HPA	Hipertensión pulmonar arterial
HPPN	Hipertensión Pulmonar Persistente Neonatal
HRP	Enzima peroxidasa de rábano (<i>Horseradish peroxidase</i>)
HTA	Humo de tabaco ambiental
Hz	Hercio
JNK	c-Jun N-terminal quinasa
IL-1 β	Interleuquina-1 beta
IL-6	Interleuquina-6
IL-8	Interleuquina-8
kD	kiloDalton
LDH	Lactato deshidrogenasa
LTB ₄	Leucotrieno B ₄
M	Molar (mol/litro)
MAP	Proteína activada por mitógenos (<i>Mitogen-Activated Protein</i>)
MAPK	Protein quinasas activadas por mitógenos
MDI	Inhalador (aerosol) dosificador presurizados (<i>metered-dose inhaler</i>)
mEPHX1	Hidrolasa epóxido microsomal 1
mg	miligramo
ml	mililitro
MLC	Cadena ligera de miosina

MLCK	Quinasa de las cadenas ligeras de miosina (<i>Myosin light chain kinase</i>)
MLCP	Fosfatasa de las cadenas ligeras de miosina (<i>Myosin light chain phosphatase</i>)
mmHg	milímetros de mercurio
MMPs	Metaloproteinasas de matriz (<i>Matrix metalloproteinases</i>)
MMP-8	Metaloproteinasa de matriz- 8
MMP-9	Metaloproteinasa de matriz-9
MMP-12	Metaloproteinasas de matriz-12
mMRC	<i>Medical Research Council</i> británico modificado
MOD	Medida óptica de densidad
NAC	N-acetil-L-cisteína
NF-κB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
NO	Óxido nítrico (<i>nitric oxide</i>)
OMS	Organización mundial de la salud
PaO ₂	Presión parcial de oxígeno en sangre arterial
PAPM	Presión arterial pulmonar media
PBS	Tampón salino fosfato
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PDE5	Fosfodiesterasa 5
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas (<i>platelet-derived growth factor</i>)

PDGF-BB	Factor de crecimiento de plaquetas tipo B
p.e.	Por ejemplo
PGI ₂	Prostaciclina (prostaglandina I ₂)
PGI ₂ S	Prostaciclina (prostaglandina I ₂) sintasa
pO ₂	Presión parcial de oxígeno
PPA	Presión Pulmonar Arterial
Q	Perfusión
RFCE	Receptor de factor de crecimiento epidérmico
RFU	Unidad de fluorescencia relativa
ROCK	<i>Rho-associated coiled coil forming protein serine/threonine kinase</i>
s	Segundo (unidad de tiempo)
SaO ₂	Saturación de oxígeno
SDS	Dodecilsulfato sódico
SFB	Suero fetal bovino
SMI	Inhalador de niebla fina (<i>soft Mist inhaler</i>)
TEM	Transición epithelial-mesenquimal
TGF-β1	Factor de crecimiento transformante beta 1
TIMP	Inhibidor tisular de la metaloproteinasa (<i>Tissue inhibitor of metalloproteinase</i>)
TNFα	Factor alfa de necrosis tumoral
TRITC	Isotiocianato de tetrametilrodamina
TXA ₂	Tromboxano A ₂

UFR	Unidad de fluorescencia relativa
V	Voltios
V _A	Ventilación alveolar
VEMS	Volumen de aire espirado máximo durante el primer segundo de una espiración forzada
VPH	Vasoconstricción pulmonar hipóxica
vs.	<i>versus</i> (frente a, contra)

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	25
1. Sistema Endotelina en la circulación pulmonar	27
1.1. Receptores de Endotelina	27
1.2. Localización	29
1.3. Síntesis	29
1.4. Efecto de la Endotelina en los Pulmones	31
1.5. Antagonistas del Receptor de la Endotelina	33
1.6. Evidencias de que la Endotelina-1 contribuye a la Hipertensión Pulmonar y estudios pre-clínicos	34
2. Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica	36
2.1. Definición	36
2.2. Limitación del Flujo Aéreo en la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica	36
2.3. Epidemiología	38
2.3.1. Morbilidad	38
2.3.2. Mortalidad	40
2.4. Carga Económica y Social de la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica	43
2.4.1. Carga Económica	43
2.4.2. Carga Social	46
2.5. Factores de riesgo de la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica	47
2.5.1. Genes	49
2.5.2. Exposición a partículas por inhalación	50
2.5.2.1. Humo de Tabaco	51
2.5.3. El Estrés Oxidativo	53
2.6. Patología, Patogénesis y Patofisiología	54
2.6.1. Patología	54
2.6.2. Patogénesis	55
2.6.2.1. Mediadores inflamatorios	57
2.6.2.2. Estrés oxidativo	57
2.6.2.3. Balance proteasa-antiproteasa	58
2.6.3. Patofisiología	59
2.6.3.1. Limitación de Flujo de aire y Atrapamiento de aire	60

2.6.3.2. Alteraciones del Intercambio de gases	60
2.6.3.3. La Hipersecreción de Moco	61
2.6.3.4. Hipertensión Pulmonar	62
2.6.3.5. Características sistémicas	62
2.6.4. Exacerbaciones	63
2.7. Tratamiento farmacológico de la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica	64
2.7.1. Opciones terapéuticas	67
2.7.1.1. Tratamiento no farmacológico	67
2.7.1.2. Preparados farmacológicos para la EPOC estable	68
2.7.1.3. Tratamiento de las exacerbaciones	74
2.8. El Remodelado de la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica	76
2.8.1. Remodelado de los bronquiolos: Fibrosis Pulmonar	79
2.9. Hipertensión Pulmonar asociada a la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica	83
2.9.1. Impacto	84
2.9.1.1. Patobiología	87
2.9.2. Remodelado vascular pulmonar	90
2.9.2.1. Cambios inflamatorios	91
2.9.3. Disfunción endotelial	92
2.9.4. Patobiología de los cambios vasculares pulmonares	95
2.9.5. Tratamiento de la Hipertensión Pulmonar Arterial asociada a la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica	98
2.9.5.1. Limitación de las terapias actuales. Búsqueda de los fármacos idóneos	100
 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	 105
 MATERIAL Y MÉTODOS	 111
 MATERIAL	 113

1. PACIENTES	113
2. FÁRMACOS UTILIZADOS	114
3. ANTICUERPOS Y SONDAS DE PCR	119
3.1. ANTICUERPOS	119
3.2. SONDAS	120
4. KITS Y REACTIVOS	121
5. MEDIOS DE CULTIVO	123
6. APARATOS	124
 MÉTODOS	 127
1. Aislamiento y cultivo de Células Endoteliales y Musculares de Arteria Pulmonar Humana	127
1.1. Aislamiento	127
1.2. Cultivo	128
2. Estudio de la expresión génica mediante PCR a tiempo real	131
2.1. Extracción de ARN a partir de Células de Músculo Liso de Arteria Pulmonar Humana	132
2.2. Retrotranscripción Inversa	133
2.3. RT-PCR a tiempo real	134
3. Transfección de siARN	139
4. Estudio de la Expresión Proteica mediante Western blot	140
5. Preparación de las soluciones de Extracto de Humo de Tabaco	143
6. Cálculo de la Concentración Intracelular de Calcio con un microscopio de Epifluorescencia Nikon Eclipse TE-200	145
6.1. Preparación microscópica de las Células de Músculo Liso y las Células Endoteliales de Arteria Pulmonar Humana	147
6.2. Medida y calibración de las señales de Calcio Intracelular	148
7. Contracción Celular	153
8. Ensayo de Proliferación Celular	155
9. Medida de la actividad Rho	155
10. Ensayo de Endotelina	156
11. Óxido Nítrico y producción de TxA ₂	156
12. Medición por dcfd de la fluorescencia de las Especies Reactivas del Oxígeno	157
13. Inmunofluorescencia	158

13.1. Estudio 1	158
13.2. Estudio 2	159
14. Preparación de cortes pulmonares de precisión a partir de resecciones de pulmón humano	159
15. Tinción de actina	163
 RESULTADOS	 165
 E S T U D I O I	
La exposición al Humo de Tabaco provoca la sobre-expresión del receptor de Endotelina B en Células Endoteliales de Arteria Pulmonar Humana: consecuencias moleculares y funcionales	167
1. Bosentan inhibe la expresión de los Receptores de Endotelina B inducida por el Humo de Tabaco en Células Endoteliales de Arteria Pulmonar Humana	169
2. La sobre-expresión de Receptores de Endotelina B inducida por el Extracto de Humo de Tabaco está parcialmente mediada por la activación de Receptores de Endotelina B, Rho quinasa y por las Especies Reactivas del Oxígeno	172
3. La exposición de las Células Endoteliales de Arteria Pulmonar Humana al Extracto de Humo de Tabaco aumenta la sensibilidad del $[Ca^{2+}]_i$ al estímulo ET-1	175
4. La Endotelina-1 aumenta la contracción celular y el desequilibrio F/G-actina en Células Endoteliales de Arteria Pulmonar Humana pretratadas con Extracto de Humo de Tabaco	177
5. La Endotelina-1 reduce la liberación de óxido nítrico e incrementa TxA_2 en Células Endoteliales de Arteria Pulmonar Humana pretratadas con Extracto de Humo de Tabaco	182
6. La Endotelina-1 incrementa la producción de Especies Reactivas de Oxígeno intracelular en Células Endoteliales de Arteria Pulmonar Humana pretratadas con Extracto de Humo de Tabaco	184

ESTUDIO II	
Bosentan inhibe la expresión del receptor de endotelina en arterias pulmonares inducida por el humo de tabaco	189
1. La sobre-expresión de receptores de Endotelina A y B inducida por la Exposición al Humo de Tabaco es atenuada por bosentan	191
2. La expresión de receptores de Endotelina A y B inducida por el Extracto de Humo de Tabaco está parcialmente mediada por ERK1/2, RhoA-GTP y Especies Reactivas de Oxígeno, así como por un mecanismo de retroalimentación positiva mediado por Endotelina-1	193
3. Bosentan inhibe las Especies Reactivas de Oxígeno intracelulares, la fosforilación de ERK1/2 y la activación Rho-GTP inducidas por el Extracto de Humo de Tabaco	195
4. Bosentan impide la proliferación de Células de Músculo Liso de Arteria Pulmonar Humana inducida por el Extracto de Humo de Tabaco	197
5. La exposición de las Células de Músculo Liso de Arteria Pulmonar Humana al Extracto de Humo de Tabaco aumenta la $[Ca^{2+}]_i$ inducida por Endotelina-1 y la contracción celular	199
6. La exposición al Extracto de Humo de Tabaco incrementa la contracción inducida por Endotelina-1 de las arterias intrapulmonares humanas pequeñas, la cual es impedida por bosentan	201
DISCUSIÓN	205
ESTUDIO I	207
ESTUDIO II	214
CONCLUSIONES	223
BIBLIOGRAFÍA	229

ANEXOS	259
ANEXO I	261
ANEXO II	265

INTRODUCCIÓN

1. SISTEMA ENDOTELINA EN LA CIRCULACIÓN PULMONAR

La endotelina (ET) es un péptido de 21 aminoácidos descubierta en 1988 [1].

Hay tres isoformas de la ET, denominadas ET-1, ET-2 y ET-3 [2], las cuales están codificadas por 3 genes diferentes. ET-1 es considerada como la isoforma patofisiológica predominante y más importante.

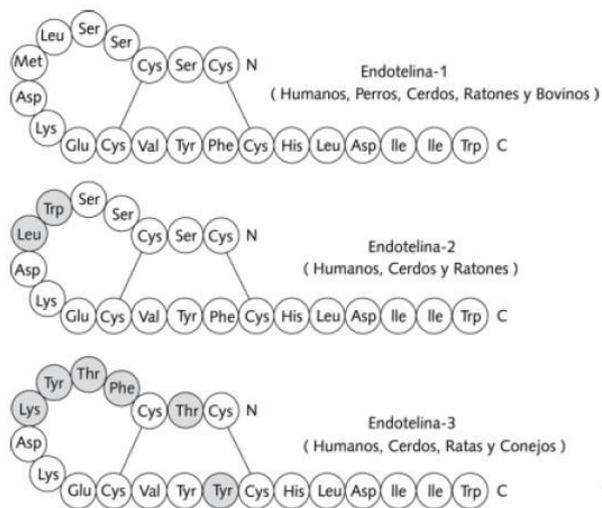


Figura 1. Estructura y homología de las endotelinas (ET), cadenas ceptídicas de 21 aminoácidos ET-1, ET-2 y ET-3 (Figura extraída y modificada de Masaki, T. et al. [3]).

1.1. RECEPTORES DE ENDOTELINA

Podemos distinguir dos receptores de endotelina (ETRs) diferentes, denominados receptor de endotelina-A (ET_A) y receptor de endotelina-B (ET_B), ambos distribuidos ampliamente en varios tipos celulares. Éstos

fueron descritos por primera vez en el tejido pulmonar [4]. Son parte de la familia del receptor acoplado a proteína G (GPCR, de su traducción en inglés *G protein-coupled receptor*) y poseen 7 dominios transmembrana. Tanto ET_A como ET_B se expresan simultáneamente en todos los tipos celulares estudiados, pero con una notable excepción; en células endoteliales sólo se expresa el ET_B [5]. Esta particular y única distribución de ET_B endotelial se encuentra asociada a distintos efectos pre-clínicos y ha generado algunos debates sobre los acercamientos farmacológicos óptimos del bloqueo del sistema ET. Aunque el ET_A expone igual afinidad por todas las isoformas de ET, el ET_B es más sensible a los efectos de ET-3 [6].

La biología y farmacología de los ETRs es bastante compleja y sigue sin comprenderse por completo. Se puede obtener una amplia variedad de acciones a través de la estimulación de ETR mediante la activación de numerosas señales intracelulares. Además, algunos estudios funcionales apoyan la existencia de una transactivación entre ETRs en varios tipos celulares [7-9].

Como en el caso de muchos otros GPCRs, hay evidencias de que ET_A y ET_B pueden formar heterodímeros funcionales y de que esto debe tener alguna importancia farmacológica [8, 10-12]. Añadir también que, tras la estimulación con ET-1 se han podido demostrar numerosas modificaciones post-traslacionales de ET_A y ET_B, y esto debe también modular la actividad del receptor [13].

Por este motivo, todavía sería necesario un estudio pre-clínico sustancial para clarificar este asunto, su relevancia en la enfermedad humana y su

impacto sobre su óptima aproximación al bloqueo farmacológico del sistema ET.

Debido a que existen perfiles farmacológicos diferentes con varias selectividades para el ET_A y ET_B, hay que ser prudentes en la evaluación clínica de esta nueva clase de fármacos, y tener en cuenta que, eventualmente, ensayos comparativos directos de antagonistas de ETR deben ser justificados con el fin de evaluar de forma clínica distintos agentes farmacológicamente.

1.2. LOCALIZACIÓN

La ET se encuentra ubicada y se produce, predominantemente, en el endotelio vascular y, en menor proporción, en otros tipos celulares, incluyendo células de músculo liso de arteria pulmonar [14] y fibroblastos pulmonares [15].

En vías aéreas periféricas, el ratio ET_A:ET_B es ~30:70 [16]. Este ratio varía bastante entre especies, y los receptores se encuentran abundantemente en células de músculo liso y en pared alveolar [17]. En arterias pulmonares humanas, el ET_A es predominante en grandes vasos, con un incremento de la proporción de ET_B en muchas arterias pulmonares distales, llegando a una proporción de ~40% [18].

1.3. SÍNTESIS

La biosíntesis de ET puede ser estimulada por varios promotores, incluyendo hipoxia, factores de crecimiento, citoquinas, trombina y

angiotensina II entre otros. Es interesante conocer que dicha biosíntesis es inhibida por el óxido nítrico (NO, de sus siglas en inglés *nitric oxide*) [19] y la prostaciclina, dos factores cuya disminución contribuye a la patofisiología de la hipertensión pulmonar arterial (HPA).

La pro-ET, precursor inactivo de 39 aminoácidos al cual nos referimos más comúnmente como *big ET*, es hidrolizada a ET madura por medio de la acción de numerosos enzimas convertidoras de ET que encontramos abundantemente expresadas en pulmón [20].

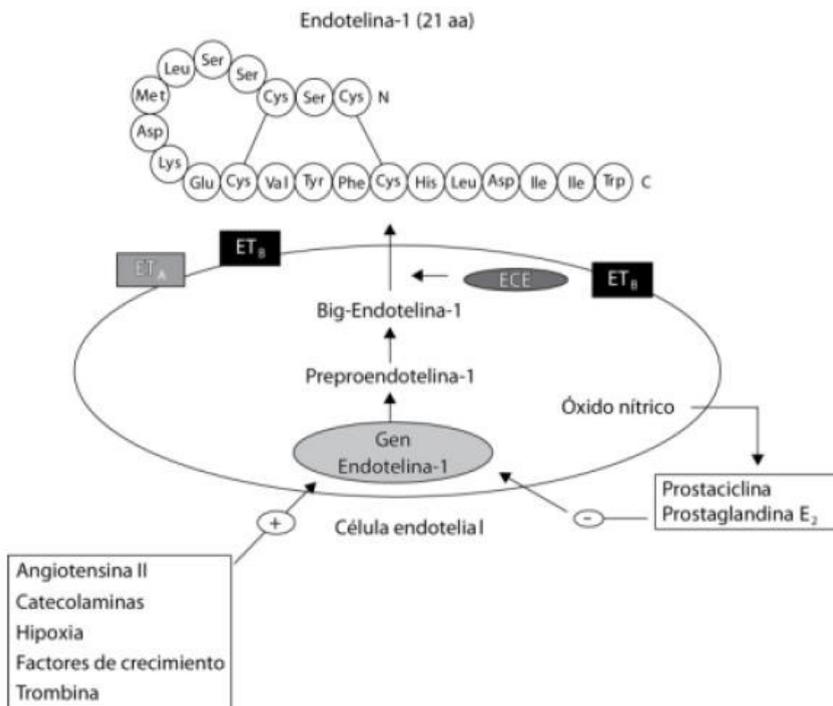


Figura 2. Célula endotelial: Síntesis de endotelina-1. Factores de estimulación e inhibición. (Figura extraída y modificada de Levin, ER. Et al. 1995 [21]).

La ET está considerada como mediador paracrino, puesto que la mayor parte de su producción es liberada hacia el espacio intersticial subyacente,

con una cantidad medible liberada más pequeña en la circulación. En este aspecto, niveles elevados de ET circulante son generalmente aceptados como representativos de la activación del sistema ET del tejido.

Estudios pre-clínicos sugieren que los pulmones son el lugar de principal producción de ET, ya que los pulmones de rata muestran los mayores niveles de ET inmunoreactiva [22], con niveles de expresión de ARNm cinco veces mayor que en cualquier otro órgano estudiado [2]. El pulmón no sólo produce si no que también aclara la ET plasmática de la circulación, en un ~47% de extracción en un solo paso sistémico por pulmones [23, 24]. Sin embargo, en sujetos normales no hay un gradiente arteriovenoso de ET significativo alrededor de la circulación pulmonar ya que la evacuación y secreción al plasma están equilibradas [24].

1.4. EFECTO DE LA ENDOTELINA EN LOS PULMONES

La ET es un potente vasoconstrictor pulmonar. Éste efecto está mediado por sus receptores ET_A y ET_B [9]. En pequeñas arterias pulmonares aisladas de humano y pulmones y arterias pulmonares de resistencia de rata es necesario el bloqueo combinado de ET_A y ET_B con el fin de alcanzar la inhibición óptima de la vasoconstricción [8, 9, 25-28]. También existe evidencia de cooperación o acción cruzada entre los receptores, puesto que el bloqueo combinado de ambos da como resultado una mejor inhibición de la vasoconstricción pulmonar frente al bloqueo de cualquiera de los receptores por separado [8, 9].

Por otra parte, la ET puede comportarse como un débil vasodilatador pulmonar. La estimulación del ET_B endotelial puede liberar vasodilatadores como el óxido nítrico y prostaciclina (prostaglandina I₂) [29, 30]. En condiciones normales, ET_B endotelial no parece contribuir significativamente en el tono vascular pulmonar [9, 31], y la eliminación del endotelio no afecta a la vasoreactividad pulmonar arterial inducida por ET-1 [9]. Sin embargo, bajo condiciones de hipertensión pulmonar, cuando la línea basal del tono vascular pulmonar está incrementada, el papel vasodilatador del ET_B puede estar desenmascarado por estimulación selectiva ET_B usando una pequeña concentración de ET-1 o por bloqueo selectivo de ET_B [9, 31, 32]. Con concentraciones de agonista superiores, el papel vasodilatador suave del ET_B está perdido y superado por una potente y sostenida vasoconstricción [9].

La ET fomenta la remodelación vascular e intersticial (Figura 3), estimula la proliferación de las células de músculo liso de arteria pulmonar humana a través de ET_A y ET_B [18] y estimula la proliferación de células endoteliales humanas a través de la activación de ET_B [33]. Además, provoca la activación de fibroblastos pulmonares y la proliferación [7, 15], con la deposición de la matriz extracelular y la contracción. Un dato interesante es que ratones transgénicos que sobre-expresan ET-1 en el pulmón no desarrollan hipertensión pulmonar, pero muestran evidencias de inflamación pulmonar con algún grado de fibrosis [34].

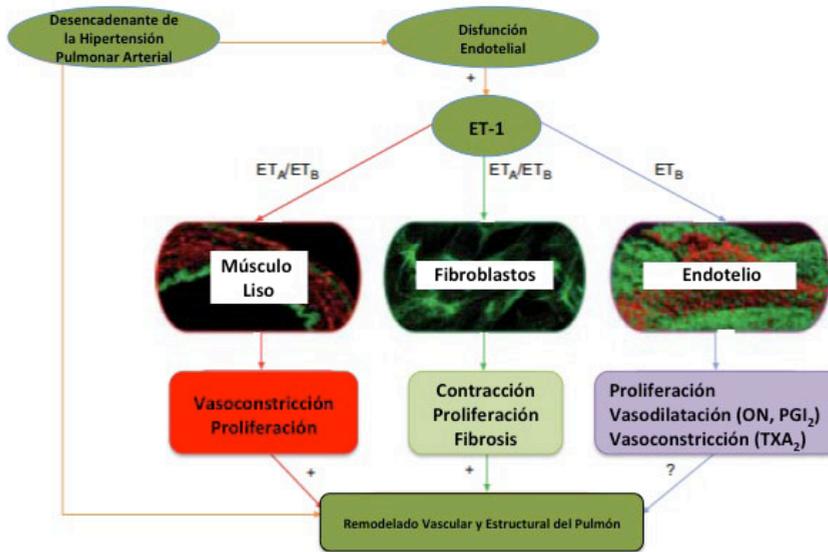


Figura 3. Endotelina (ET-1) en Hipertensión Pulmonar Arterial. NO: Óxido Nítrico, PGI₂: Prostaciclina, TXA₂: tromboxano A₂, ?: Efecto desconocido (Figura extraída y modificada de Dupuis, J. et al. [35])

1.5. ANTAGONISTAS DEL RECEPTOR DE LA ENDOTELINA

Han sido desarrollados numerosos antagonistas de ETR [36]. Se distinguen farmacológicamente basándonos en sus diferentes afinidades por el ET_A y ET_B, tal y como está determinado por estudios vinculantes en cultivo celular. Actualmente hay tres antagonistas de ETR que han sido aprobados para la terapia de HPA en varios países. Éstos son:

- Bosentan (Tracleer™; Actelion Pharmaceuticals, Allschwil, Switzerland), el primer antagonista de ETR, aprobado en 2001, muestra igual afinidad por ambos receptores, con un ratio de

afinidad $ET_A:ET_B$ de $\sim 40:1$. Por este motivo comúnmente nos referimos al Bosentan como el bloqueador dual de ETR.

- Sitaxsentan (ThelinTM; Encysive Pharmaceuticals, Houston, TX, USA), aprobado en 2006 en países europeos, expone un ratio de afinidad $ET_A:ET_B$ de 6,000:1 y es por tanto considerado y presentado como un antagonista selectivo de ET_A .

- Ambrisentan (LetairisTM; Gilead Sciences, Foster City, CA, USA, en USA; VolibrisTM; GlaxoSmithKline, London, UK, en otras partes del mundo). Aprobado en USA en Junio del 2007. Este fármaco está también presentado como bloqueador selectivo de ET_A , aunque muchos de sus ratios de afinidad $ET_A:ET_B$ publicados muestran una selectividad $ET_A:ET_B$ de alrededor de un logaritmo, ligeramente superior que el bosentan [37].

Basado en datos pre-clínicos y a causa de la aparente compleja farmacología de los ETRs, podría haber significativas diferencias clínicas en el perfil eficacia/seguridad de estos agentes, los cuales requerirían en última instancia una cuidadosa evaluación clínica en ensayos aleatorios.

1.6. EVIDENCIAS DE QUE LA ENDOTELINA-1 CONTRIBUYE A LA HIPERTENSIÓN PULMONAR Y ESTUDIOS PRE-CLÍNICOS

Existe una clara evidencia de la activación del sistema ET en prácticamente todos los modelos pre-clínicos de HP, de la misma manera que en todas las categorías de HP humana [38]. En HP la expresión de ET-1 en plasma y pulmón se encuentra incrementada, estando correlacionada con la

severidad de la enfermedad, incluyendo el grado de remodelado pulmonar, medida mediante ecografía intravascular [39-41]. Aunque se ha hecho evidente y se ha demostrado por los ensayos clínicos que la ET-1 contribuye a la HP, la ET-1 probablemente es activada de forma secundaria y no es causa primaria de HP. La infusión crónica de ET-1 causa una reducción en la reactividad vascular pulmonar al NO en ratas, pero no da lugar a HP [5]. Además, la sobre-expresión de ET-1 sola no provoca HP en animales transgénicos [34], otros mecanismos deben operar de forma concomitante. El tejido pulmonar y las arterias pulmonares de pacientes con HP exponen un aumento de liberación de ET-1 [18]. La capacidad, en modelos animales *in vivo* y tejido humano para eliminar ET-1 de la circulación está, no obstante, reducida en varios tipos de HPA, sugiriendo que se produce una reducción de la actividad endotelial de ET_B en HPA [31, 42-44]. Se está a la espera de saber cómo se ven afectadas la proporción de ET_A y ET_B en diferentes condiciones patológicas y cómo se ve modificada la cooperación entre receptores. A pesar de esta destacada cuestión, los antagonistas de ETR han demostrado claramente su efectividad en modelos pre-clínicos de HP [38, 45-47]. Los antagonistas de ETR pueden mejorar la hemodinámica, hipertrofia ventricular derecha y la supervivencia. Han demostrado su capacidad para provocar un remodelado beneficioso de arterias pulmonares, reducir fibrosis pulmonar y mejorar la función endotelial de vasos pulmonares. Estos efectos han sido obtenidos con dos antagonistas ET_A altamente selectivos y agentes que exponen una pequeña selectividad diferencial y considerados bloqueadores duales de ET_A/ET_B. Ha habido muy

pocas comparaciones pre-clínicas directas sobre la diferente selectividad ETR para permitir cualquier conclusión firme de superioridad entre ellos.

2. ENFERMEDAD PULMONAR OBSTRUCTIVA CRÓNICA

2.1. DEFINICIÓN

La Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC) es una enfermedad prevenible y tratable que conlleva algunos efectos extra-pulmonares significativos que pueden contribuir a la gravedad de los pacientes. Su componente pulmonar se caracteriza por una limitación al flujo aéreo que no es completamente reversible, la cual es generalmente progresiva y está asociada a una respuesta inflamatoria anormal de los pulmones a partículas nocivas o gases.

El tabaquismo es el factor de riesgo más común de la EPOC, aunque en muchos países, la contaminación del aire resultante de la quema de leña y otros combustibles fósiles también ha sido identificado como un factor de riesgo de dicha enfermedad.

2.2. LIMITACIÓN DEL FLUJO AÉREO EN LA ENFERMEDAD PULMONAR OBSTRUCTIVA CRÓNICA

La característica limitación crónica al flujo aéreo de la EPOC está causada por una mezcla de la enfermedad de las vías aéreas pequeñas (bronquiolitis obstructiva) y la destrucción del parénquima (enfisema), las contribuciones relativas de los cuales varían de una persona a otra (Figura 4).

La inflamación crónica causa cambios estructurales como el estrechamiento de las vías aéreas pequeñas. La destrucción del parénquima pulmonar, también por procesos inflamatorios, conduce a la pérdida de la unión alveolar de las vías aéreas pequeñas y disminuye la retracción elástica del pulmón. A su vez, estos cambios disminuyen la capacidad para que las vías respiratorias permanezcan abiertas durante la espiración.

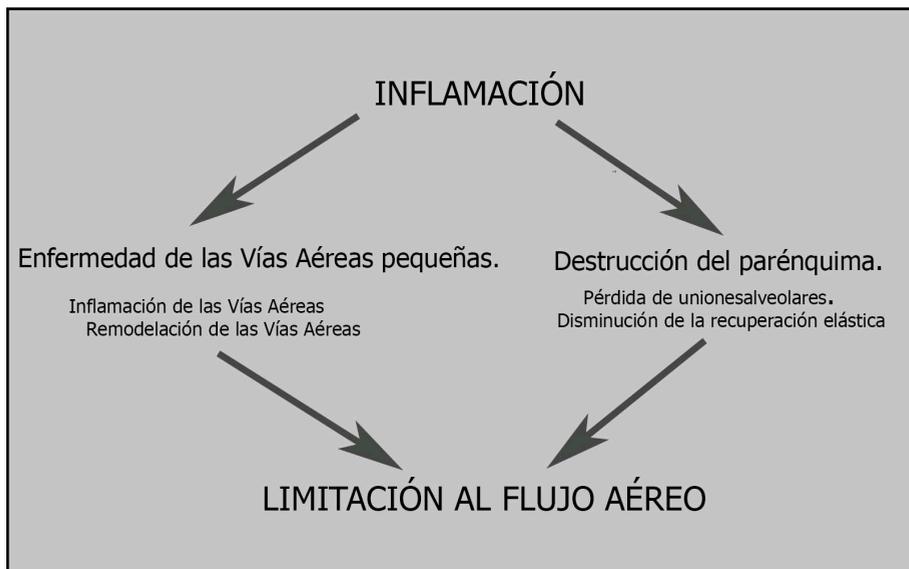


Figura 4. Mecanismos que subyacen la limitación al flujo aéreo en la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). (Figura extraída y modificada de Rabe, KF. Et al. 2007 [48])

Definiciones anteriores de la EPOC han hecho hincapié en los términos "enfisema" y "bronquitis crónica". Enfisema, o destrucción de la superficie de intercambio de gases de los pulmones (alvéolos), es un término patológico que a menudo (aunque erróneamente) se ha utilizado en clínica

y en él se describe sólo una de las varias alteraciones estructurales presentes en los pacientes con EPOC. La bronquitis crónica, o la presencia de la de la producción de tos y expectoración durante al menos 3 meses en el periodo de dos años consecutivos, sigue siendo un término clínicamente y epidemiológicamente útil. Sin embargo, no refleja el impacto de la limitación del flujo aéreo en la morbilidad y la mortalidad en pacientes con EPOC. También es importante reconocer que la tos y la expectoración pueden preceder al desarrollo de la limitación al flujo aéreo. Por el contrario, algunos pacientes desarrollan limitación al flujo aéreo significativa, sin tos crónica ni producción de esputo.

2.3. EPIDEMIOLOGÍA

2.3.1. MORBILIDAD

Las medidas de morbilidad tradicionalmente incluyen las visitas al médico, a emergencias y hospitalizaciones. A pesar de que las bases de datos de EPOC para estos parámetros son menos accesibles que los datos de mortalidad, los pocos datos disponibles indican que la morbilidad debida a EPOC aumenta con la edad y es mayor en hombres que en mujeres [49, 50]. En este conjunto de datos, sin embargo, la EPOC en sus estadios iniciales normalmente no es reconocida, diagnosticada o tratada, y por lo tanto no puede incluirse como un diagnóstico en la historia clínica del paciente.

La morbilidad de la EPOC puede verse afectada por otras condiciones crónicas de comorbilidad [51] que no están directamente relacionadas con

la EPOC pero que sin embargo pueden tener un impacto en el estado de salud del paciente o puede interferir negativamente con el tratamiento de la EPOC.

Los datos de morbilidad se ven afectados en gran manera por la disponibilidad de medios (p.e. los ratios de hospitalización son altamente dependientes de la disponibilidad de camas en el hospital) y estos tienen que ser interpretados con precaución y con un entendimiento claro de los posibles prejuicios inherentes en los datos. A pesar de estas limitaciones, el European White Book¹ proporciona buenos datos sobre el número medio de consultas por enfermedades respiratorias mayores de 19 países de la Comunidad Económica Europea. En muchas ciudades las consultas por EPOC sobrepasaron en gran número las consultas por asma, neumonía, cáncer de tráquea y pulmón y tuberculosis. En los Estados Unidos, en el año 2000 hubo 8 millones de visitas de pacientes ambulatorios a hospitales o consultas médicas, 1.5 millones de visitas a urgencias y 673.000 hospitalizaciones.

Otra vía para calcular la morbilidad de la enfermedad es calcular los años de vida con discapacidad.

¹*Publicado por la European Respiratory Society, el Libro Blanco Europeo de pulmón se basa en los últimos datos de la Organización Mundial de la Salud y el Centro Europeo de Prevención y Control de Enfermedades, y las aportaciones de expertos en todo el continente para presentar un examen riguroso de la salud pulmonar y la enfermedad en Europa en su forma actual y un análisis informado de las tendencias futuras. Cubriendo los factores de riesgo, las principales enfermedades, el desarrollo de los diversos campos de la medicina respiratoria y la formación y el crecimiento de las organizaciones de apoyo a los pacientes, el*

libro expone una serie de recomendaciones de política para asegurar un mejor futuro para la salud respiratoria. Es una herramienta de fuente de datos y la promoción de vital importancia para los profesionales sanitarios, políticos, defensores de los pacientes y de los medios de comunicación.

2.3.2. MORTALIDAD

La OMS publica anualmente estadísticas de mortalidad para determinadas causas de muerte. Estos datos deben ser interpretados con precaución porque el término de EPOC no ha estado bien definido siempre. Previamente a 1968 y a la 8ª revisión de la Clasificación Internacional de Enfermedades, los términos “bronquitis crónica” y “enfisema” fueron extensamente utilizados. A lo largo de los años 70 el término EPOC fue reemplazando a esos términos en algunos países pero no en otros, haciendo que las comparaciones de mortalidad por EPOC entre diferentes países fueran muy difíciles. Sin embargo la situación ha mejorado con las 9ª y 10ª revisiones de la Clasificación Internacional de Enfermedades, en las cuales las muertes por EPOC o por obstrucción crónica de las vías aéreas están incluidas en la amplia categoría de “EPOC y condiciones asociadas”.

De esta forma, el problema del etiquetado ha sido parcialmente resuelto, pero la falta de reconocimiento y de diagnóstico de la EPOC aún afecta a la precisión de los datos de mortalidad. Aunque la EPOC es a menudo una causa primaria de muerte, es más probable que sea incluida como algo que contribuya a la muerte u omitido totalmente del certificado de defunción, y ser atribuida la muerte a cualquier otra causa como una enfermedad cardiovascular.

A pesar de los problemas con la precisión de los datos de mortalidad de la EPOC, está claro que es una de las causas más importantes de mortalidad en la mayoría de países. El *Global Burden of Disease Study*² predijo que la EPOC, que ocupó el sexto lugar como causa de muerte en 1990, alcanzará a ser la tercera causa de muerte a nivel mundial en el 2020. Este aumento de la mortalidad será debido a la expansión epidémica de la inhalación de tabaco y cambios demográficos en la mayoría de los países, con más población viviendo durante más tiempo. De estas dos causas, la demográfica es la más fuerte.

² *The Global Burden of Diseases, Injuries, and Risk Factors Study (GBD) es el esfuerzo más grande y más completo hasta la fecha para medir los niveles epidemiológicos y las tendencias en todo el mundo. Más de 1.000 colaboradores GBD de 108 países participan en la actualización más reciente.*

Las tendencias en las tasas de mortalidad, con el tiempo, proporcionan información importante pero, otra vez, estas estadísticas se ven muy afectadas por la terminología, la conciencia de la enfermedad, y el potencial sesgo de género en el diagnóstico. Las propensión de mortalidad de la EPOC en general implica un seguimiento de varias décadas de la costumbre de fumar. Esta predisposición en la tasa de mortalidad estandarizada por edad dentro de las seis principales causas de muerte en los Estados Unidos entre 1970 y 2002 indica que mientras que la mortalidad de varias de estas condiciones crónicas se redujo en ese período, la mortalidad por EPOC aumentó (Figura 5). Los ratios de fallecimiento por EPOC en Canadá, tanto en hombres como en mujeres, ha aumentado desde 1997. En Europa, sin

embargo, la tendencia es diferente, se observa un descenso de la mortalidad en algunos países. No existe una razón obvia para la diferencia que existe de ésta entre Norte América y Europa, aunque se supone que factores tales como la sensibilización, el cambio de terminología, y el sesgo de diagnóstico contribuyen a estas diferencias.

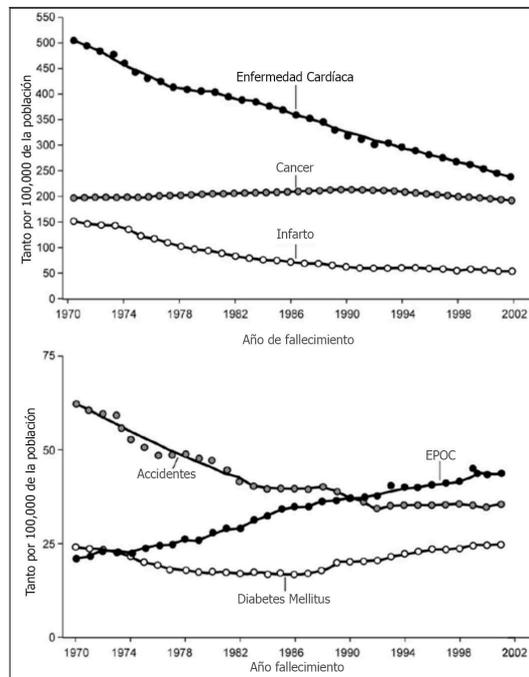


Figura 5. Tendencias de las tasas de mortalidad estandarizadas por edad para las 6 causas principales de muerte en los Estados Unidos 1970-2002. (Figura extraída y modificada de Jemal, A. et al. 2005 [52]).

La propensión a la mortalidad por EPOC ha sido particularmente sorprendente para las mujeres . En Canadá, la tasa de mortalidad por EPOC entre las mujeres se aceleró en la década de 1990 y se espera que pronto supere la tasa de los hombres. En los Estados Unidos,

las muertes por EPOC entre las mujeres se han incrementado abruptamente desde la década de 1970. En el 2000, el número de muertes por EPOC en los Estados Unidos fue mayor entre las mujeres que los hombres (59,936 vs. 59,118), aunque las tasas de mortalidad para las mujeres siguen siendo algo más baja que para los hombres.

Es probable que el aumento de muertes por EPOC a nivel mundial continúe.

2.4. CARGA ECONÓMICA Y SOCIAL DE LA ENFERMEDAD PULMONAR OBSTRUCTIVA CRÓNICA

2.4.1. CARGA ECONÓMICA

La EPOC es una enfermedad muy costosa. Por una parte tenemos los costes directos (valor de los recursos de atención médica dedicada al diagnóstico y atención médica) y por otra parte los indirectos (consecuencias monetarias de la discapacidad, el trabajo perdido, la mortalidad prematura, y el cuidado o los costes de la familia como resultado de la enfermedad) [53]. En la Unión Europea el total de costes directos que provienen de las enfermedades respiratorias se estiman en alrededor de un 6% del presupuesto sanitario total, representando la EPOC el 56% (38,6 millones de euros) del total de enfermedades respiratorias consideradas. En los Estados Unidos en 2002, los costes directos de la EPOC supusieron 18 billones de dólares y ascendió, con los costes indirectos, a 14,1 billones de dólares. El gasto por paciente varían de un país a otro, ya que éstos dependen de que a éstos se les proporcione la atención

médica adecuada y de que ésta deba ser pagada por el propio paciente o por la administración.

Por todo esto no sorprende que exista una notable relación directa entre la gravedad de la EPOC y el coste de los cuidados [54], teniendo también en cuenta que la distribución de los gastos cambia a medida que la enfermedad progresa. Por ejemplo, los costes de oxígeno, la hospitalización y atención ambulatoria se elevan a medida que aumenta la gravedad de la EPOC, como se ilustra en los datos de Suecia que quedan reflejados en la siguiente figura (Figura 6).

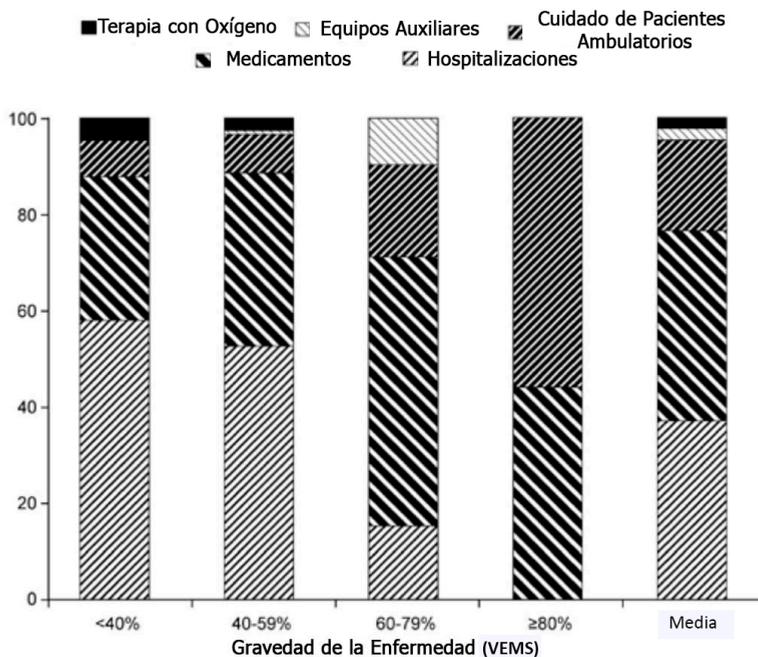


Figura 6. Distribución de los costes directos de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) según la severidad de la enfermedad. *Copyright 2002 Colegio de los Estados Unidos*

de América de Especialistas Torácicos. [54]. VEMS: Volumen de aire espirado máximo durante el primer segundo de una espiración forzada.

La presencia de EPOC aumenta en gran medida el coste total de la atención a los pacientes, especialmente cuando los gastos de hospitalización son considerados. En un estudio del coste de enfermedades relacionadas con la EPOC en los Estados Unidos, basado en la Encuesta Nacional de Gastos Médicos de 1987, los gastos *per capita* de las hospitalizaciones de pacientes con EPOC fueron de 2,7 veces el gasto para los pacientes que no padecían la enfermedad (\$5.409 vs. \$2.001) [55]. En un estudio realizado en 1992 por Medicare (programa de cobertura de seguridad social administrado por el gobierno de Estados Unidos de Norte América. Éste se encarga de proveer atención médica a personas mayores de 65 años o más jóvenes consideradas discapacitadas debido a graves problemas de salud, como cáncer, insuficiencia renal con necesidad de diálisis, etc.), el gasto *per capita* anual para las personas con EPOC (8.482 dólares) fueron casi 2,5 veces los gastos para las personas sin EPOC (3.511 dólares) [56].

Con frecuencia, las personas con EPOC reciben cuidado médico profesional en sus hogares. En algunos países, los planes de seguro nacional de salud proporcionan cobertura de tratamiento con oxígeno, visita de los servicios de enfermería, rehabilitación, e incluso ventilación mecánica en el hogar, aunque la cobertura para determinados servicios específicos varía de un país a otro [57]. Cualquier estimación de los gastos médicos directos para cuidados en el hogar no representa el verdadero coste de la atención domiciliaria, porque ignora el valor económico de la atención prestada a las

personas con EPOC por miembros de su familia. En los países en desarrollo, los costes médicos directos pueden ser menos importantes que el impacto de la EPOC en el lugar de trabajo y la productividad en su casa. Debido a que los servicios de salud no pueden proporcionar atención y cuidados a largo plazo a personas con discapacidad grave, la EPOC puede obligar a dos personas a abandonar el lugar de trabajo, a la persona afectada y un miembro de la familia que ahora debe quedarse en casa para cuidar al familiar incapacitado. Como el capital humano a menudo es el patrimonio nacional más importante para los países en desarrollo, los costes indirectos de la EPOC puede representar una seria amenaza para sus economías.

2.4.2. CARGA SOCIAL

Debido a que la mortalidad ofrece una perspectiva limitada sobre la carga social de las enfermedades, sería deseable encontrar otros tipos de medidas que sean más consistentes y medibles para así poder hacer una comparación fiable entre los diferentes países. Los autores del *Global Burden of Disease Study* (anteriormente referenciado) han diseñado un método para estimar la fracción de mortalidad y discapacidad atribuible a las principales enfermedades y lesiones utilizando una medida compuesta por la carga de cada problema de salud, la DALY (*Disability Adjusted Life Year*) [58-60] en castellano la AVAD (Años de Vida Ajustados por Discapacidad). Los AVAD representan una medida de los años de vida en relación con la pérdida de salud. Para una condición específica suman los años de vida perdidos debido a la mortalidad prematura y los años vividos

con alguna discapacidad, ajustándolos según la gravedad de la discapacidad. En 1990, la EPOC fue la doceava causa de pérdida de AVADs en el mundo, siendo responsable de un 2,1% del total. Según las previsiones, la EPOC será la séptima causa principal de pérdida de AVADs en todo el mundo en el 2030, por detrás de la cardiopatía isquémica, la depresión grave, los accidentes de tráfico, y enfermedad cerebrovascular. Este aumento sustancial en la carga global de la EPOC proyectado para los próximos años refleja, en gran parte, el alto consumo de tabaco que se seguirá teniendo en muchos países y el cambio de estructura de la población en los países en desarrollo [61].

2.5. FACTORES DE RIESGO DE LA ENFERMEDAD PULMONAR OBSTRUCTIVA CRÓNICA

La identificación de factores de riesgo es un paso importante hacia el desarrollo de estrategias para la prevención y tratamiento de cualquier enfermedad. La identificación de consumo de tabaco como el factor de riesgo más comunes de la EPOC ha llevado a la incorporación de programas para dejar de fumar como elemento clave de la prevención de esta enfermedad, así como una intervención importante para los pacientes que ya la padecen. Sin embargo, aunque el tabaquismo es el factor de riesgo mejor estudiado la EPOC, no es el único y existe una evidencia consistente de estudios epidemiológicos en la que se demuestra que los no fumadores también pueden desarrollar obstrucción crónica del flujo de aire [62, 63].

Gran parte de las pruebas relativas a los factores de riesgo de la EPOC provienen de los estudios epidemiológicos de sección transversal que

identifican las asociaciones en lugar de la relación causa-efecto. Aunque varios estudios longitudinales (que son capaces de revelar las relaciones causales) de la EPOC han seguido grupos y poblaciones de hasta 20 años de edad [64], no ha seguido la progresión de la enfermedad, o ha incluido los períodos pre y perinatal, los cuales pueden ser importantes en la determinación individual del factor de riesgo de sufrir EPOC en un futuro. Por lo tanto, la comprensión actual de los factores de riesgo para la EPOC es en muchos aspectos incompleta.

A medida de que la comprensión de la importancia de los factores de riesgo (Figura 7) de la EPOC ha aumentado, también lo ha hecho el reconocimiento de que prácticamente todos los riesgos para la EPOC son resultado de una interacción gen-medioambiente. Por lo tanto, de dos personas con el mismo historial de tabaquismo, sólo uno podría desarrollar EPOC debido a las diferencias en la predisposición genética a la enfermedad, o el tiempo que viva. Los factores de riesgo para la EPOC también puede estar relacionados de manera más compleja. Por ejemplo, el género puede influir en que una persona empiece a fumar o ciertas exposiciones ocupacionales o ambientales; el nivel socioeconómico puede estar relacionado con el peso al nacer de los niños (y sus impactos en el crecimiento pulmonar y el desarrollo); y una mayor esperanza de vida permitirá una mayor tiempo de exposición a factores de riesgo. La comprensión de las relaciones e interacciones entre los factores de riesgo requiere más investigación.

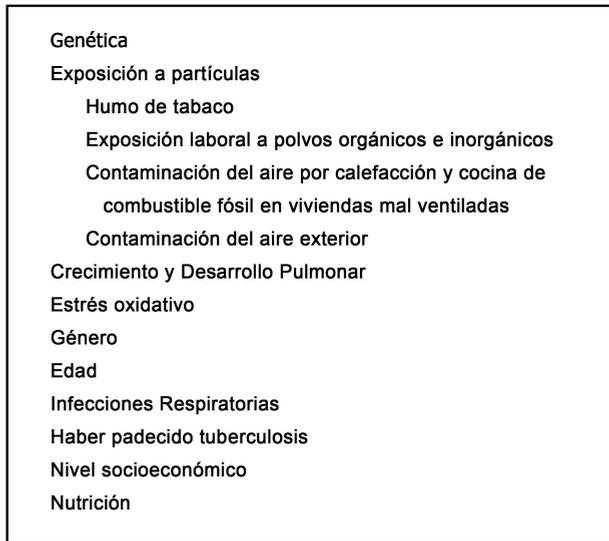


Figura 7. Factores de riesgo de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). (Figura extraída y modificada de Rabe, KF. Et al. 2007 [48] .

2.5.1. GENES

La EPOC es una enfermedad poligénica y un ejemplo clásico de interacción gen-ambiente. El factor de riesgo genético que está mejor documentado es una grave deficiencia hereditaria de la alfa-1 antitripsina [65], el mayor inhibidor en la circulación de proteasas de serina. Este rasgo recesivo extraño se padece más comúnmente en individuos del norte de Europa [66]. Se observa una aparición prematura y el desarrollo acelerado de enfisema panacinar y la disminución de la función pulmonar en fumadores y no fumadores con esta deficiencia severa, aunque el tabaquismo aumenta el riesgo considerablemente. Existe una considerable variación entre los individuos en la extensión y severidad del enfisema y la tasa de disminución

de la función pulmonar. Aunque la deficiencia de alfa-1 antitripsina es relevante sólo para una pequeña parte de la población mundial, muestra la interacción entre factores genéticos y factores ambientales que conducen a la EPOC. De esta manera, proporciona un modelo de cómo otros factores de riesgo genético se cree que contribuyen a la EPOC.

Se ha observado un riesgo familiar significativo de obstrucción al flujo aéreo en los hermanos fumadores de pacientes con EPOC severa [67], lo que sugiere que los factores genéticos podrían influir en la susceptibilidad. A través de análisis de ligamiento genético, se han identificado varias regiones del genoma que probablemente contienen genes de susceptibilidad de EPOC, incluyendo el cromosoma 2q [68]. Estudios de asociación genética han implicado una variedad de genes en la patogenia de la EPOC, incluyendo el factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF- β 1) [69], la hidrolasa epóxido microsomal 1 (mEPHX1) [70], y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) [71]. Sin embargo, los resultados de estos estudios de asociación genética han sido las variantes genéticas en gran parte incoherente y funcionales que influyen en el desarrollo de la EPOC (que no sea la alfa-1 antitripsina) que no han sido definitivamente identificados [68].

2.5.2. EXPOSICIÓN A PARTÍCULAS POR INHALACIÓN

Dado que los individuos pueden estar expuestos a una gran variedad de tipos de partículas inhaladas durante toda su vida, es útil pensar en términos de la carga total de las partículas inhaladas. Cada tipo de partícula,

en función de su tamaño y composición, puede contribuir con un peso diferente al riesgo, y el riesgo total dependerá del total de inhalaciones de estas partículas realizadas (Figura 8). De las muchas exposiciones por inhalación que se pueden realizar a lo largo de toda la vida sólo se sabe que pueden causar EPOC por sí mismas el humo de tabaco [72] y la exposición laboral a polvos y productos químicos (vapores, irritantes y gases) [73-76] . El humo del tabaco y la exposición ocupacional también parecen actuar de forma aditiva a aumentar el riesgo de desarrollar EPOC. Sin embargo, esto puede representar una base de datos inadecuada de las poblaciones que están expuestas a otros factores de riesgo, como son la fuerte exposición a la contaminación del aire en el interior de un recinto mal ventilado en el que se utiliza la biomasa para cocinar y como calefacción.

Como hemos visto en la figura 7 existen diferentes tipos de inhalación de partículas determinantes para el desarrollo de la EPOC de las que destacamos el humo de tabaco.

2.5.2.1. HUMO DE TABACO

Fumar cigarrillos es con diferencia el factor de riesgo más común de la EPOC. Los fumadores de cigarrillos tienen una mayor prevalencia de síntomas respiratorios y alteraciones de la función pulmonar, una mayor tasa anual de disminución del VEMS y una mayor tasa de mortalidad que los no fumadores con EPOC. Los fumadores de pipa y puros tienen una mayor morbilidad y mortalidad EPOC que los no fumadores, aunque sus ratios son inferiores a los fumadores de cigarrillos. El fumar tabaco de pipa de agua y

marihuana también implica factores de riesgo para la EPOC [77, 78], aunque el riesgo relativo al consumo de cigarrillos no se ha referido. El riesgo de EPOC en fumadores está relacionada con la dosis [72]. La edad en comenzar a fumar, el total de años fumando, y el grado de tabaquismo en el momento son predictivos de la mortalidad de EPOC. No todos los fumadores desarrollan EPOC clínicamente significativa, lo que sugiere que los factores genéticos modifican el riesgo de cada individuo [70].

La exposición pasiva al humo del cigarrillo (también conocido como humo de tabaco ambiental o HTA) también puede contribuir a padecer síntomas respiratorios y EPOC [79] mediante el aumento de la carga total de partículas y gases inhalados por los pulmones [80, 81]. Fumar durante el embarazo también puede representar un riesgo para el feto, al afectar el crecimiento pulmonar y el desarrollo en el útero y el posible cebado del sistema inmune [82, 83].

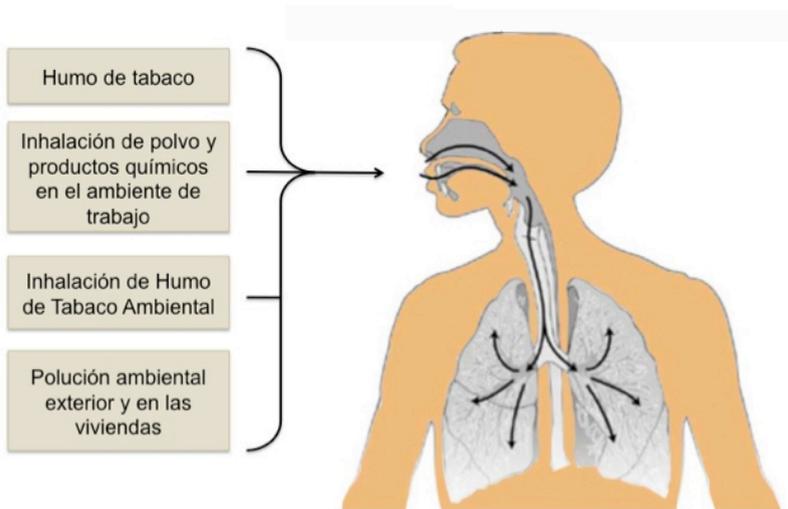


Figura 8. El riesgo de EPOC está relacionado con la exposición total de partículas inhaladas. (Figura extraída y modificada de Rabe, KF. Et al. 2007 [48])

2.5.3. EL ESTRÉS OXIDATIVO

Los pulmones están continuamente expuestos a oxidantes generados, ya sea de forma endógena, a partir de los fagocitos y otros tipos de células, o exógena, de los contaminantes del aire o el humo del cigarrillo. Además, los oxidantes intracelulares, como los derivados del transporte mitocondrial de electrones, están involucrados en numerosas vías de señalización celular. Las células pulmonares están protegidas contra este daño oxidativo por el buen desarrollo de sistemas enzimáticos y no enzimáticos. Cuando el balance entre oxidantes y antioxidantes vira a favor del primero, por ejemplo, un exceso de oxidantes y/o una disminución de antioxidantes, se

produce estrés oxidativo. El estrés oxidativo no sólo produce efectos perjudiciales directos en los pulmones sino que también activa los mecanismos moleculares que inician la inflamación pulmonar. Por lo tanto, se considera que un desequilibrio entre oxidantes y antioxidantes es importante en la patogénesis de la EPOC [84].

2.6. PATOLOGÍA, PATOGÉNESIS Y PATOFISIOLOGÍA

La inhalación del humo del cigarrillo y de otras partículas nocivas provocan la inflamación del pulmón. Esta inflamación, que se consideraría una respuesta normal, parece amplificarse en los pacientes que desarrollan EPOC, pudiendo inducir la destrucción de tejidos del parénquima (que tendrá como resultado el enfisema), y alterar los mecanismos normales de reparación y defensa (dando lugar a fibrosis de pequeñas vías respiratorias). Estos cambios patológicos llevar a la limitación del flujo aéreo progresiva y el atrapamiento de aire. A continuación se incluye una breve descripción de los cambios patológicos en la EPOC, sus mecanismos celulares y moleculares, y la base de alteraciones fisiológicas y síntomas característicos de la enfermedad [85].

2.6.1. PATOLOGÍA

Los cambios patológicos característicos de la EPOC se producen en las vías respiratorias proximales, las vías aéreas periféricas, el parénquima pulmonar y la vasculatura pulmonar [86] (Figura 9). Dichos cambios incluyen la inflamación crónica, con un mayor número de tipos específicos

de células inflamatorias en diferentes partes del pulmón, y los cambios estructurales derivados de lesiones repetidas y reparación. En general, los cambios inflamatorios y estructurales en las vías respiratorias aumenta con la gravedad de la enfermedad y persisten al dejar de fumar.

<p>Vías aéreas proximales (tráquea, bronquios > 2 mm de diámetro interno) <i>Células inflamatorias:</i> ↑ Macrófagos, ↑ CD8 + (citotóxicos) Linfocitos T, pocos Neutrófilos o Eosinófilos <i>Cambios estructurales:</i> ↑ Células Caliciformes, Agrandamiento de las Glándulas Submucosas (ambos llevando a la hipersecreción de moco), metaplasia escamosa del epitelio.</p> <p>Vías aéreas periféricas (bronquiolos <2 mm de diámetro interno) <i>Células Inflamatorias:</i> ↑ Macrófagos, ↑ Linfocitos T (CD8 +> CD4 +), Linfocitos B, Folículos linfoides, Fibroblastos, pocos Neutrófilos o Eosinófilos <i>Cambios estructurales:</i> Engrosamiento de la pared de las vías aéreas, Fibrosis peribronquial, Exudado inflamatorio luminal, Estrechamiento las vías respiratorias (bronquiolitis obstructiva). Aumento de la respuesta inflamatoria y el exudado correlacionado con la severidad de la enfermedad.</p> <p>Parénquima pulmonar (bronquiolos y alvéolos pulmonares) <i>Células Inflamatorias:</i> Macrófagos, Linfocitos T CD8+ <i>Cambios estructurales:</i> Destrucción de la pared alveolar, Apoptosis de células epiteliales y endoteliales • Enfisema centrolobular: Dilatación y destrucción de los bronquiolos; más frecuente en pacientes fumadores • Enfisema panacinar: Destrucción de los sacos alveolares y los bronquiolos; más frecuente en pacientes con deficiencia en alfa-1 antitripsina.</p> <p>Vasculatura Pulmonar <i>Células Inflamatorias:</i> ↑ Macrófagos, ↑ Linfocitos T <i>Cambios estructurales:</i> Engrosamiento de la íntima, Disfunción de las células endoteliales, ↑ músculo liso → hipertensión pulmonar.</p>
--

Figura 9. Cambios patológicos en EPOC. [87-90]

2.6.2. PATOGÉNESIS

La inflamación en el tracto respiratorio de los pacientes con EPOC parece ser una amplificación de la respuesta inflamatoria normal de las vías respiratorias a irritantes crónicos como el humo del cigarrillo. Los mecanismos de esta ampliación aún no se comprenden, pero puede estar genéticamente determinado.

Algunos pacientes desarrollan EPOC sin fumar, pero la naturaleza de la respuesta inflamatoria en estos pacientes es desconocida [91]. La inflamación de los pulmones se amplifica aún más por el estrés oxidativo y un exceso de proteasas en el pulmón. En conjunto, estos mecanismos conducen a los cambios patológicos característicos de la EPOC (Figura 10).

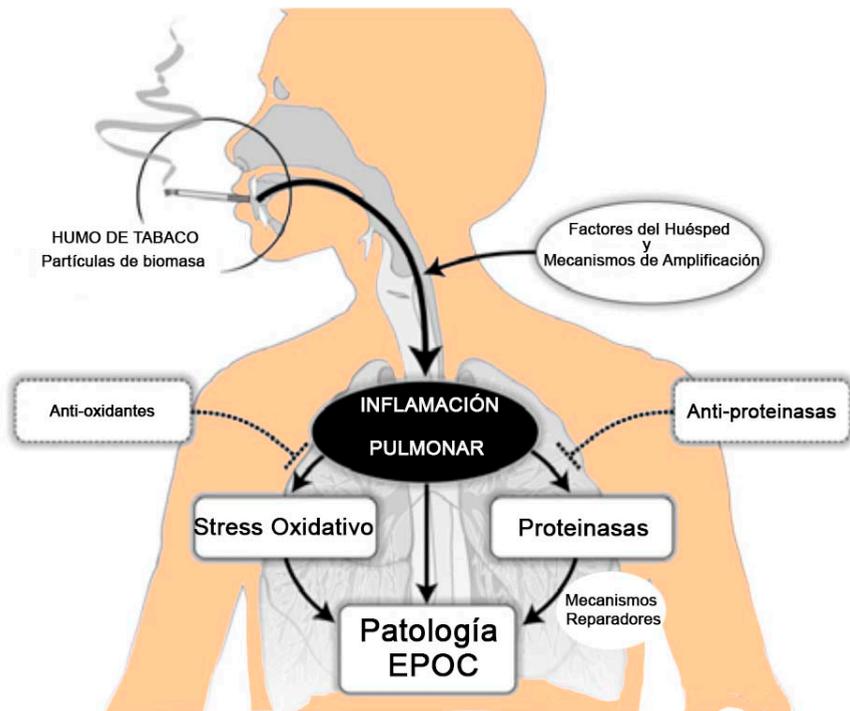


Figura 10. Patogénesis de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). (Figura extraída y modificada de Vestbo, J. et al. 2013 [92]).

2.6.2.1. MEDIADORES INFLAMATORIOS

La gran variedad de mediadores inflamatorios que han demostrado su aumento en los pacientes con EPOC [93] atraen a las células inflamatorias de la circulación (factores quimiotácticos), amplifican el proceso inflamatorio (citoquinas proinflamatorias), e inducen los cambios estructurales (factores de crecimiento). Ejemplos de cada tipo de mediador se enumeran en la siguiente figura (Figura 11).

<p>Factores quimiostáticos:</p> <ul style="list-style-type: none">- Mediadores lipídicos: p.e. Leucotrieno B₄ (LTB₄) atrae neutrófilos y linfocitos T.- Quimiocinas : p.e. Interleuquina 8 (IL-8) atrae neutrófilos y monocitos. <p>Citoquinas proinflamatorias:</p> <p>p.e. El factor de necrosis tumoral (TNF-α) , IL-1β, y la IL-6 amplifica el proceso inflamatorio y puede contribuir a algunos de los efectos sistémicos de la EPOC.</p> <p>Factores de Crecimiento:</p> <p>P.e. El factor de crecimiento transformante- β (TGF-β) puede inducir la fibrosis en pequeñas vías aéreas.</p>
--

Figura 11 . Mediadores inflamatorios implicados en la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). (Figura extraída y modificada de Vestbo, J. et al. 2013 [92]).

2.6.2.2. ESTRÉS OXIDATIVO

El estrés oxidativo puede ser un mecanismo de amplificación importante en la EPOC [94]. Biomarcadores de estrés oxidativo (por ejemplo, peróxido de hidrógeno, 8-isoprostano) se encuentran incrementados en el aire exhalado condensado, en esputo, y en la circulación sistémica de los pacientes con EPOC. El estrés oxidativo se incrementa aún más en las exacerbaciones. Los oxidantes son generados por el humo del cigarrillo y otras partículas

inhaladas, y liberado de las células inflamatorias activadas, tales como los macrófagos y neutrófilos [95]. También puede haber una reducción de los antioxidantes endógenos en pacientes con EPOC. El estrés oxidativo tiene varias consecuencias negativas en los pulmones, incluyendo la activación de los genes inflamatorios, la inactivación de antiproteasas, la estimulación de la secreción de moco, y la estimulación de la exudación de plasma aumentado. Muchos de estos efectos adversos están mediados por peroxinitrito, que se forma a través de una interacción entre los aniones superóxido y óxido nítrico. A su vez, el óxido nítrico se genera óxido nítrico sintasa inducible, que se expresa en las vías aéreas periféricas y el parénquima pulmonar de pacientes con EPOC. El estrés oxidativo también puede explicar la reducción de la actividad histona deacetilasa en el tejido pulmonar de pacientes con EPOC, lo que puede conducir a una mayor expresión de genes inflamatorios y también una reducción en la acción antiinflamatoria de los glucocorticoides [96].

2.6.2.3. BALANCE PROTEASA-ANTIPROTEASA

Existen pruebas convincentes de que existe un desequilibrio entre las proteasas que descomponen los componentes del tejido conectivo y las antiproteasas que protegen contra esto en los pulmones de pacientes con EPOC. Algunas proteasas, derivadas de las células inflamatorias y células epiteliales, se encuentran incrementadas en los pacientes con EPOC. Existen evidencias cada vez más importantes de que éstas pueden interactuar entre sí (Figura 12). La destrucción de la proteasa mediado de la

elastina, el principal componente del tejido conectivo en el parénquima pulmonar, es una característica importante de enfisema y es probable que sea irreversible.

<i>Aumento de Proteasas</i>	<i>Descenso de Antiproteasas</i>
Serin Proteasas Neutrófilo Elastasa Catepsina G Proteinasa 3	Alfa-1 antitripsina Alfa- 1 quimiotripsina Inhibidor de la secreción de leucoproteasa Elafina
Cisteín-proteasas Catepsina B, K, L, S	Cistatinas
Metaloproteinasas de matriz (MMPs) MMP-8, MMP-9, MMP-12	Inhibidores tisulares de MMP 1-4 (TIMP1-4)

Figura 12. Proteasas y antiproteasas implicadas en la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). TIMP: inhibidor tisular de la metaloproteinasa (*Tissue inhibitor of metalloproteinase*). (Figura extraída y modificada de Vestbo, J. et al. 2013 [92]).

2.6.3. PATOFISIOLOGÍA

En la actualidad existe una buena comprensión de cómo el proceso de la enfermedad en la EPOC da lugar a las alteraciones de las características fisiológicas y los síntomas. Por ejemplo, la disminución del VEMS (volumen de aire expulsado durante el primer segundo de una espiración forzada) principalmente es el resultado de la inflamación y el estrechamiento de las vías aéreas periféricas, mientras que la disminución de la transferencia gases proviene de la destrucción del parénquima en el enfisema.

2.6.3.1. LIMITACIÓN DE FLUJO DE AIRE Y ATRAPAMIENTO DE AIRE

El grado de inflamación, fibrosis y de exudado luminal de las vías aéreas pequeñas se correlaciona con la reducción del VEMS y la relación VEMS/CVF (siendo CVF la capacidad vital forzada), y probablemente con el deterioro acelerado de la VEMS característica de la EPOC [88]. Esta obstrucción de las vías periféricas va atrapando progresivamente el aire durante la espiración, lo que da lugar a una hiperinflación. A pesar de esto el enfisema se asocia más a alteraciones del intercambio gaseoso que a la reducción del VEMS, que no contribuye a la retención de aire durante la espiración. Este hinchamiento tan grande que se produce debido a esta retención de aire da lugar a una reducción de la capacidad inspiratoria de tal manera que aumenta la capacidad funcional residual, particularmente durante el ejercicio (en este momento esta fenómeno anormal se conoce como la hiperinflación dinámica), y esto se traduce en la disnea y la limitación de la capacidad de ejercicio. Hoy en día se piensa que esta hiperinflación se desarrolla en momentos tempranos de la enfermedad y es el principal mecanismo en la disnea de esfuerzo [97]. La utilización de broncodilatadores de acción en las vías aéreas periféricas reduce el atrapamiento de aire, reduciendo así el volumen pulmonar y produciendo una mejoría considerable de los síntomas, así como la capacidad de ejercicio.

2.6.3.2. ALTERACIONES DEL INTERCAMBIO DE GASES

Las alteraciones del intercambio gaseoso tienen como resultado hipoxemia

e hipercapnia, y se produce por varios mecanismos. En general, empeora la transferencia de gas conforme la enfermedad progresa. La gravedad del enfisema se correlaciona con la pO_2 (presión parcial de oxígeno) arterial y otros indicadores de desequilibrio ventilación-perfusión (V_A/Q). La obstrucción de las vías periféricas también se traduce en un desequilibrio V_A/Q , y se combina con una alteración de la función muscular respiratoria cuando el pronóstico de la enfermedad es grave reduciendo la ventilación, lo que lleva a la retención de dióxido de carbono. Las anomalías de la ventilación alveolar y la reducción del lecho vascular pulmonar empeoran aún más las alteraciones del balance V_A/Q .

2.6.3.3. LA HIPERSECRECIÓN DE MOCO

La hipersecreción de moco, que da lugar a la tos productiva crónica, es una característica de la bronquitis crónica y no se asocia necesariamente con limitación del flujo aéreo. No todos los pacientes con EPOC padecen los síntomas de hipersecreción de moco. Cuando está presente, se debe a la presencia de una metaplasia mucosa que cursa con aumento del número de células caliciformes y agrandamiento de las glándulas submucosas en respuesta a una irritación respiratoria crónica provocada por el humo del cigarrillo y otros agentes nocivos. Varios mediadores y proteasas estimulan la hipersecreción de moco y muchos de ellos ejercen sus efectos a través de la activación del Receptor de Factor de Crecimiento Epidérmico (RFCE) [98].

2.6.3.4. HIPERTENSIÓN PULMONAR

Durante el transcurso de la EPOC, los pacientes pueden presentar Hipertensión Pulmonar (HP) tardía de leve a moderada. Esto se debe a una vasoconstricción hipóxica de las pequeñas arterias pulmonares, que con el tiempo van dando lugar a cambios estructurales que incluyen hiperplasia de la íntima y que más tarde derivan en una hipertrofia/hiperplasia del músculo liso [99]. Existe una respuesta inflamatoria en los vasos similar a la observada en las vías respiratorias y la evidencia de disfunción de las células endoteliales. La pérdida del lecho capilar pulmonar en el enfisema también puede contribuir al aumento de la presión en la circulación pulmonar. La hipertensión pulmonar progresiva puede llevar a la hipertrofia del ventrículo derecho y, finalmente, a una insuficiencia cardíaca derecha (*cor pulmonale*).

2.6.3.5. CARACTERÍSTICAS SISTÉMICAS

Cada vez es más fehaciente que la EPOC afecta a varios rasgos sistémicos, particularmente en pacientes con enfermedad grave, y que éstos tienen un gran impacto en la supervivencia y la comorbilidad [100, 101] (Figura 13). Comúnmente podemos observar caquexia en pacientes con EPOC grave. Puede haber una pérdida de masa muscular y debilidad como resultado de aumento de la apoptosis y/o por falta de actividad física que lleva a un desuso muscular. Los pacientes con EPOC tienen mayor posibilidades de padecer osteoporosis, depresión y anemia crónica [102]. El aumento de las concentraciones de mediadores inflamatorios, incluyendo el TNF- α , IL-6, y

radicales libres de oxígeno, puede mediar algunos de estos efectos sistémicos. Hay un aumento en el riesgo de enfermedades cardiovasculares, que se correlaciona con un aumento de la proteína C-reactiva (CRP, del inglés *C-reactive protein*) [103].

CATACTERÍSTICAS SISTÉMICAS DE LA EPOC
<ul style="list-style-type: none">- Caquexia: pérdida de masa libre de grasa.- Pérdida de músculo esquelético: apoptosis, atrofia por desuso.- Osteoporosis- Depresión- Anemia normocítica normocrónica.- Aumento del riesgo de enfermedad cardiovascular: asociada con un ↑ de proteína c-reactiva.

Figura 13. Características sistémicas de la EPOC. (Figura extraída y modificada de Vestbo, J. et al. 2013 [92]).

2.6.4. EXACERBACIONES

Las exacerbaciones representan una mayor amplificación de la respuesta inflamatoria en las vías respiratorias de los pacientes con EPOC, y puede ser desencadenada por una infección bacteriana, vírica, o por contaminantes ambientales. Hay una relativa falta de información acerca de los mecanismos inflamatorios implicados en este proceso. En las exacerbaciones leves y moderadas se produce un aumento de los neutrófilos, y en algunos estudios también encuentran este aumento en eosinófilos, en el esputo y la pared de las vías respiratorias [104]. Éste fenómeno se asocia con una mayor concentración de ciertos mediadores, incluyendo el TNF- α , LTB4 (leucotrienos B4) e IL-8 (interleuquina 8), y un aumento en los biomarcadores de estrés oxidativo. Existe aún menos

información sobre las exacerbaciones graves, aunque un estudio mostró un aumento marcado de los neutrófilos en la pared de las vías respiratorias y el aumento de expresión de quimiocinas [105]. Durante el periodo de exacerbación se produce un aumento del hinchamiento y atrapamiento aéreo, con reducción del flujo espiratorio, lo que explica el aumento de la disnea [106]. También se sufre un empeoramiento del equilibrio V_A/Q resultante de una hipoxemia grave.

2.7. TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO DE LA ENFERMEDAD PULMONAR OBSTRUCTIVA CRÓNICA

El tratamiento estratégico para una EPOC estable debería ser aquel que considerase los síntomas individuales de cada paciente y su futuro riesgo de exacerbaciones.

Habría que evaluar de forma individualizada los siguientes aspectos de la enfermedad:

- Síntomas
- Grado de limitación al flujo aéreo (medido mediante espirometría)
- Riesgo de exacerbaciones
- Comorbilidades

Evaluación de los Síntomas: Para evaluar los síntomas deberían emplearse cuestionarios validados, como la escala de disnea *Medical Research Council* británico modificado (mMRC) o el *COPD Assessment Test* (CAT)

Determinación del grado de limitación al flujo aéreo mediante espirometría: En la siguiente figura se recoge la clasificación a la gravedad

de la limitación al flujo aéreo en la EPOC (Figura 14).

En pacientes con cociente VEMS/CVF post-broncodilatador <0,70		
GOLD 1:	Leve	VEMS \geq 80% del valor de referencia
GOLD 2:	Moderada	50% \leq VEMS < 80% del valor de referencia
GOLD 3:	Grave	30% \leq VEMS < 50% del valor de referencia
GOLD 4:	Muy Grave	VEMS < 30% del valor de referencia

Figura 14. Clasificación de la gravedad de la limitación al flujo aéreo en la EPOC (a partir del VEMS posbroncodilatador)(Figura extraída y modificada de Rodríguez-Rosín, R. et al. 2011 [107]).

Evaluación del riesgo de exacerbaciones: El mejor factor pronóstico de las exacerbaciones frecuentes (dos o más por año) es el antecedente de un episodio previo tratado; el riesgo de exacerbaciones aumenta proporcionalmente al deterioro de la limitación al flujo aéreo.

Evaluación de Comorbilidades: La enfermedad cardiovascular, la osteoporosis, la depresión y la ansiedad, la disfunción musculoesquelética, el síndrome metabólico y el cáncer de pulmón son algunas enfermedades a menudo concurrentes a la EPOC. Estas comorbilidades pueden influir en la mortalidad y las hospitalizaciones, y deben tenerse en cuenta de forma sistemática y ser debidamente tratadas [108-111].

Evaluación combinada de EPOC: En la siguiente figura (Figura 15) podemos observar como la aplicación de una evaluación combinada permite un mejor tratamiento de la enfermedad mediante la combinación de diversos parámetros de evaluación.

Síntomas:

- Poco sintomático (mMRC 0-1 o CAT<10): el paciente es A o C.

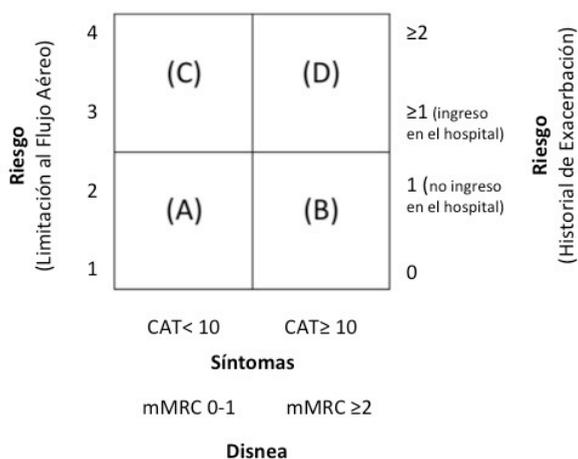
- Más sintomático (mMRC ≥ 2 o CAT ≥ 10): el paciente es B o D.

Limitación al flujo aéreo:

- Bajo Riesgo (GOLD 1 ó 2): el paciente es A o B.
- Alto riesgo (GOLD 3 ó 4): el paciente es C o D.

Exacerbaciones:

- Bajo Riesgo (≤ 1 al año): el paciente es A o B.



Categoría de Paciente	Características	Clasificación Espirométrica	Exacerbaciones por año	CAT	mMRC
A	Bajo Riesgo, Menos síntomas	GOLD 1-2	≤ 1	<10	0-1
B	Bajo Riesgo, Más síntomas	GOLD 1-2	≤ 1	≥ 10	≥ 2
C	Alto Riesgo, Menos síntomas	GOLD 3-4	≥ 2	<10	0-1
D	Alto Riesgo, Más síntomas	GOLD 3-4	≥ 2	≥ 10	≥ 2

Figura 15. Evaluación combinada de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). Cuando se evalúa el riesgo, debe escogerse el índice de riesgo más alto según el estadio GOLD y los antecedentes de exacerbaciones. (Figura extraída y modificada de Tashkin, DP. et al. 2013 [112]).

2.7.1. OPCIONES TERAPÉUTICAS

2.7.1.1. TRATAMIENTO NO FARMACOLÓGICO

Abandono del tabaquismo:

Dejar de fumar es la opción que más puede influir en la evolución natural de la EPOC. El personal sanitario debe estimular dicho abandono por parte de los pacientes [113].

Prevención del Tabaquismo:

Hay que promover las normas y los programas generales de prevención del tabaquismo. Es preciso colaborar con las autoridades sanitarias para que se aprueben leyes que establezcan que las escuelas, los centros públicos y los entornos laborales sean espacios libres de humo y por otra parte animar a los pacientes a mantener su domicilio sin humo.

Exposiciones Ocupacionales:

Se hará hincapié en la prevención primaria, que puede lograrse eliminando o reduciendo la exposición a diversas sustancias en el lugar de trabajo. También es importante la prevención secundaria, que se logra mediante la vigilancia y la detección precoz.

Contaminación doméstica y atmosférica:

Provocada a partir de la combustión de biomasa utilizada para cocinar y calentar viviendas cuya ventilación es inadecuada. Se aconsejará a los pacientes que tengan en cuenta los datos oficiales sobre la calidad del aire y que, en función de la gravedad de su enfermedad, eviten las actividades físicas intensas al aire libre o permanezcan en sus hogares durante los periodos de contaminación importantes.

Actividad Física:

Realizar actividades físicas de forma regular es beneficioso para todos los pacientes que padezcan EPOC.

2.7.1.2. PREPARADOS FARMACOLÓGICOS PARA LA EPOC ESTABLE

El tratamiento farmacológico se emplea para reducir los síntomas, disminuir la frecuencia y gravedad de las exacerbaciones y mejorar el estado de salud y la tolerancia al ejercicio. Cada esquema de tratamiento ha de ser específico para cada paciente, ya que la relación entre la gravedad de los síntomas y la de la limitación al flujo aéreo también está influida por otros factores, como la frecuencia y la gravedad de las exacerbaciones, la existencia de insuficiencia respiratoria, la presencia de comorbilidades y el estado de salud en general [113-117]. En la siguiente tabla (Tabla 1) se recogen las diversas clases de medicamentos que se emplean habitualmente para tratar la EPOC. La elección de la clase de fármaco depende de la disponibilidad de medicación y de la respuesta del paciente.

FÁRMACO	INHALADOR (µg)	SOLUCIÓN PARA NEBULIZADOR(mg/ml)	ORAL	VIALES PARA INYECCIÓN (mg)	DURACIÓN DE ACCIÓN (horas)
Agonistas beta-2					
<i>De reacción corta</i>					
Fenoterol	100-200 (MDI)	1	0,05% (jarabe)		4-6
Levalbuterol	45-90 (MDI)	0,21, 0,42			6-8
Salbutamol	100, 200 (MDI y DPI)	5	5mg (comprimidos) 0,024% (jarabe)	0,1 y 0,5	4-6
Terbutalina	400, 500 (DPI)		2,5 y 5 (comprimidos)		4-6
<i>De acción prolongada</i>					
Formoterol	4,5-12 (MDI y DPI)	0,01			12
Arformoterol		0,0075			12
Indacaterol	75-300 (DPI)				24
Salmeterol	25-50 (MDI y DPI)				12
Tulobuterol			2mg (transdérmico)		24
Anticolinérgicos					
<i>De acción corta</i>					
Bromuro de Ipratropio	20,40 (MDI)	0,25- 0,5			6-8
Bromuro de oxitropio	100 (MDI)	1,5			7-9
<i>De acción prolongada</i>					
Tiotropio	18 (DPI), 5 (SMI)				24
Combinación de agonistas beta-2 de acción corta más anticolinérgico en un inhalador					
Fenoterol / Ipratropio	200/80 (MDI)	1,25/0,5			6-8
Salbutamol / Ipratropio	75/15 (MDI)	0,75/0,5			6-8
Metilxantinas					
Aminofilinas			200-600 mg (comprimidos)	240	Variable, hasta 24h
Teofilina (de liberación retardada)			100-600 mg (comprimidos)		Variable, hasta 24h
Corticosteroides inhalados					
Beclometasona	50-400 (MDI y DPI)	0,2-0,4			
Budesonida	100, 200, 400 DPI	0,20, 0,25, 0,5			
Fluticasona	50-500 (MDI y DPI)				
Combinación fija de agonistas beta-2 de acción prolongada y corticosteroide					
Formoterol / Budesonida	4,5/160 (DPI) 9/320 (DPI)				
Salmeterol / Fluticasona	50/100, 250, 500 (DPI) 25/50, 125, 250 (MDI)				
Corticosteroides sistémicos					
Prednisona			5-60 mg (comprimido)		
Metilprednisona			4, 8, 16 mg (comprimidos)		
Inhibidores de la fosfodiesterasa IV					
Roflumilast			500µg (coprimidos)		24

Tabla 1 . Fármacos de uso habitual en la EPOC.

DPI: Inhalador en polvo seco. MDI: Inhalador (aerosol) dosificador presurizado. SMI: inhalador de niebla fina. No todos los fármacos están disponibles en todos los países; en algunos pueden estar disponibles otros.[117-119]

Broncodilatadores: Los broncodilatadores mejoran la limitación del flujo aéreo que caracteriza a la EPOC, ejerciendo un efecto sobre el tono del músculo liso bronquial de las vías aéreas y, en general, son el tratamiento de elección inicial en la EPOC. Los broncodilatadores de acción larga son convenientes por ser más efectivos en la mejora sintomática que los de acción corta. Además, la combinación de broncodilatadores de distintas clases farmacológicas puede mejorar la eficacia y disminuir los efectos adversos, comparada con el aumento de dosis de un único broncodilatador. Por ello, actualmente se trabaja en la mejora de los broncodilatadores existentes así como en posibles combinaciones con anti-colinérgicos ya que se han descrito efectos aditivos entre ambos.

Agonistas β_2 : Los agonistas β_2 producen una relajación del músculo liso bronquial mediante la estimulación de los receptores β_2 -adrenérgicos, que aumentan el monofosfato de adenosina cíclico (AMPC) intracelular, produciendo un efecto antagonista sobre la broncoconstricción. Se distingue dos subtipos: acción corta (Fenoterol, Levalbuterol, Salbutamol, Terbutalina) y acción larga (Formoterol, Arformoterol, Indacaterol, Salmeterol, Tulobuterol). Tal y como se observa en la siguiente tabla (tabla 2), los β -agonistas de acción corta se recomiendan como tratamiento inicial de la EPOC, utilizándose los de acción larga para el tratamiento de los pacientes en estadios más avanzados que no responden adecuadamente al tratamiento con los anteriores [120-126].

	I (leve)	II (moderada)	III (severa)	IV (muy severa)
VEMS/CVF	<0,70	<0,70	<0,70	<0,70
VEMS	≥80% predicho	50-80% predicho	30-50% predicho	<30% predicho <50% predicho y fallo respiratorio crónico
Tratamiento	Vacuna para la gripe y broncodilatador de corta duración, cuando sea necesario (agonista β_2 o anticolinérgico)	Vacuna para la gripe, broncodilatador de corta y ≥ 1 larga duración cuando sea necesario, considerar rehabilitación respiratoria.	Vacuna para la gripe, broncodilatador de corta y ≥ 1 larga duración cuando sea necesario, corticoide inhalado si exacerbaciones repetidas, considerar rehabilitación respiratoria.	Vacuna para la gripe, broncodilatador de corta y ≥ 1 larga duración cuando sea necesario, corticoide inhalado si exacerbaciones repetidas, administración de oxígeno a largo plazo y en caso de fallo respiratorio considerar rehabilitación respiratoria y operación quirúrgica.

Tabla 2 .Terapia farmacológica en cada estadio GOLD de la EPOC. VEMS: Volumen de aire espirado máximo durante el primer segundo de una espiración forzada. CVF: Capacidad vital forzada. (Tabla extraída y modificada de Pedersen, SE. et al. 2011 [127]).

Anti-colinérgicos: Los agentes anticolinérgicos producen broncodilatación al reducir la contracción de la musculatura lisa, antagonizando el tono colinérgico endógeno. Su principal efecto es el bloqueo del efecto de la acetilcolina en los receptores muscarínicos. Se distinguen dos subtipos: acción corta (Bromuro de Ipratropio, Bromuro de Oxitropio) y acción larga (Tiotropio) [128].

Metilxantinas: En este subgrupo destaca la teofilina, que constituye un tratamiento clásico de la EPOC. La teofilina presenta un efecto positivo sobre la fuerza del diafragma, un aumento del rendimiento de los músculos respiratorios, una reducción del atrapamiento aéreo, una mejoría del aclaramiento mucociliar y una reducción de las agudizaciones. Sin embargo, la teofilina, utilizada inicialmente como broncodilatador, ha sido relegada por sus modestos efectos comparados con otros broncodilatadores actuales. La teofilina ejerce su efecto actuando como inhibidor no selectivo de fosfodiesterasa, sin embargo su utilidad es limitada dada su menor eficacia y sus efectos adversos. [129-134]

Corticosteroides. Los corticosteroides inhalados constituyen el principal tratamiento anti-inflamatorio de pacientes con asma. En la EPOC se utilizan en combinación con broncodilatadores de larga duración. Sus efectos en pacientes con EPOC son controvertidos y, por ello, están limitado a indicaciones específicas, como en el caso de pacientes con EPOC avanzada por su utilidad en el tratamiento de las exacerbaciones. Se distinguen corticoides inhalados (Beclometasona, Budesonida, Fluticasona) y sistémicos (Prednisona, Metilprednisolona)[135].

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

farmacológicas dirigidas a los mediadores inflamatorios como diana terapéutica[121, 136].

Otros tratamientos farmacológicos

Vacunas: La vacuna de la gripe puede reducir la gravedad y la mortalidad de la enfermedad en pacientes con EPOC [137]. La vacuna pneumocócica polisacárida se recomienda en los pacientes con una edad \geq 65 años con EPOC [138], y además se ha demostrado que reduce la neumonía adquiridas en la comunidad de pacientes <de 65 años con un VEMS < del 40% con respecto al valor de referencia [139].

Tratamiento sustitutivo con alfa-1-antitripsina: No se recomienda en pacientes cuya EPOC no tenga su origen en el déficit de alfa-1-antitripsina.

Antibióticos: No se recomienda su uso, excepto para el tratamiento de las exacerbaciones de origen infeccioso y otras infecciones bacterianas [140-142].

Fármacos Mucolíticos: Los pacientes con producción de esputo viscoso pueden beneficiarse del tratamiento con mucolíticos, aunque los beneficios globales son insignificantes [142].

Antitusígenos: La utilización de fármacos antitusígenos nos está recomendada [143].

2.7.1.3. TRATAMIENTO DE LAS EXACERBACIONES

Recordamos que se define como exacerbación de la EPOC un episodio agudo caracterizado por un empeoramiento de los síntomas respiratorios más allá de la variabilidad diaria y que obliga a un cambio en la medicación habitual [144].

La causa más común de las exacerbaciones son las infecciones en el árbol bronquial (vírica o bacteriana) [145-147].

Opciones Terapéuticas

Oxigenoterapia: Se debe modular el oxígeno suplementario para lograr mejorar la hipoxemia del paciente y alcanzar una SaO₂ (saturación de oxígeno) del 88-92% [148].

Broncodilatadores: Para el tratamiento de las exacerbaciones son preferibles los broncodilatadores inhalados agonistas beta-2 de acción corta, con o sin anticolinérgicos de acción corta.

Corticosteroides sistémicos: Los corticosteroides sistémicos acortan el tiempo de recuperación, mejoran la función pulmonar (VEMS) y la hipoxemia arterial (PaO₂) y reducen el riesgo de recaídas precoces, los fracasos terapéuticos y la duración de la hospitalización. Se recomienda una dosis de 30-40 mg de prednisolona al día durante 10-14 días [121, 149-152].

Antibióticos: Deberían administrarse antibióticos en pacientes:

- Con los siguientes síntomas principales: incremento de la disnea, aumento del volumen de esputo, incremento de la purulencia del esputo.

- Con un incremento de la purulencia del esputo y otro síntoma principal.
- Que precisen ventilación mecánica.

Otros tratamientos: De acuerdo con las características clínicas del paciente, debe considerarse un aporte apropiado de líquidos, prestando especial atención a la administración de diuréticos y anticoagulantes, al tratamiento de las comorbilidades y aspectos nutricionales. De igual modo, siempre deben aplicarse medidas estrictas contra el tabaquismo activo.

Se debe hospitalizar a todos los pacientes que presenten características de exacerbación grave (Tabla 3). Los criterios para el diagnóstico y tratamiento de las exacerbaciones de la EPOC que requieren ingreso hospitalario dependerán de los recursos y medios locales de los que disponga cada centro.

CRITERIOS PARA EL INGRESO HOSPITALARIO
<ul style="list-style-type: none"> • Marcado incremento de la gravedad de los síntomas • EPOC grave • Aparición de nuevos signos físicos • Ausencia de respuesta terapéutica • Presencia de comorbilidades graves • Exacerbaciones frecuentes • Edad avanzada • Soporte domiciliario insuficiente

Tabla 3. Criterios para el ingreso hospitalario. (Tabla extraída y modificada de Vestbo, J.et al. 2013 [92]).

2.8. EL REMODELADO DE LA ENFERMEDAD PULMONAR OBSTRUCTIVA CRÓNICA

En la EPOC el término remodelado hace referencia a una serie de cambios estructurales, desencadenados por una respuesta inflamatoria anormal y crónica, que afectan principalmente a los bronquiolos y al parénquima [153] y cuya extensión está asociada con la severidad de la enfermedad [88]. Tanto el remodelado bronquiolar como la destrucción del parénquima contribuyen a un deterioro progresivo de la función pulmonar, un inadecuado vaciado del pulmón tras espiración y un subsiguiente proceso de hiperinflación característico de la EPOC [154].

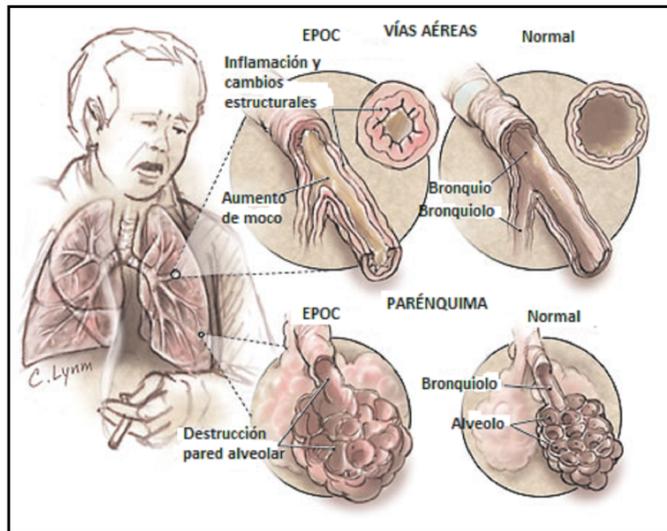


Figura 16. Remodelado en la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). En la figura se representan las principales anomalías estructurales desencadenadas en la EPOC, que afectan tanto a las vías aéreas como al parénquima pulmonar.

El epitelio bronquial constituye la primera barrera anatómica expuesta a las partículas nocivas del humo de tabaco u otros estímulos ambientales. Las células epiteliales bronquiales están involucradas en la iniciación del remodelado de los bronquiolos a través de la liberación de diversos mediadores pro-inflamatorios, como TNF- α , TGF- β 1, IL-1 β e IL-8, y proteasas. Estos mediadores desencadenan una respuesta inflamatoria caracterizada por una infiltración de células inflamatorias, entre las que predominan neutrófilos, macrófagos y células T CD8⁺ [155], con la subsiguiente formación de folículos linfoides. La presencia de los folículos linfoides ha sido descrita en las vías aéreas de pacientes con EPOC [88] y, aunque se requiere un estudio más profundo de su presencia y función, se piensa que son responsables de una respuesta inmune que contribuye a perpetuar la inflamación durante años tras el cese del tabaquismo [156].

La respuesta inflamatoria desencadena el remodelado de los bronquios de pequeño calibre, que sufren hipertrofia e hiperplasia de la musculatura lisa bronquial [157] y un proceso de fibrosis peri-bronquiolar. Estudios recientes han descrito que tanto la proliferación de células de músculo liso como la acumulación de miofibroblastos son procesos críticos que resultan en el estrechamiento de los bronquiolos asociado a la EPOC [158, 159]. Las células caliciformes y las glándulas submucosas del epitelio bronquial son las principales productoras del moco presente en el lumen de las vías aéreas. La presencia de estas células productoras de moco en los bronquiolos periféricos es escasa en condiciones no patológicas. Sin embargo, en los bronquiolos periféricos de los pacientes con EPOC, se produce un aumento del número de estas células, por un proceso conocido

como hiperplasia de células caliciformes y glándulas submucosas [160]. Tanto la hiperplasia de estas células como la hiperproducción del moco resultante, que contribuye a la oclusión de los bronquiolos, son las principales características de la disfunción mucociliar de la EPOC [161, 162]. Además, también se produce una liberación de proteasas tipo elastasa, por los neutrófilos, o tipo granzima B, por los linfocitos CD8⁺ presentes en los folículos linfoides, que contribuye a la destrucción del parénquima alveolar y a la formación de enfisema [155], término patológico que implica lesión en los alvéolos debido a un agrandamiento en los espacios distales a los bronquiolos acompañado de destrucción de la pared alveolar [163]. Esta destrucción del parénquima, por pérdida de estructuras alveolares, causa una disminución en la retracción elástica del pulmón [164].

También se ha descrito un remodelado vascular en pacientes EPOC, caracterizado por un aumento de la masa de músculo liso vascular y por la deposición de elastina y colágeno en la íntima de las arterias. Estas anormalidades en las arterias han sido asociadas con deficiencias en el intercambio gaseoso [165] y, en algunos casos, con hipertensión pulmonar [99].

En la siguiente tabla se resumen las características del remodelado en la EPOC.

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

Tabla 4. Características del remodelado en la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). (Tabla extraída y modificada de Gosens, R. et al. 2006 [166] y Jeffery, PK. et al. 2004 [153]).

2.8.1. REMODELADO DE LOS BRONQUIOLOS: FIBROSIS PULMONAR

El remodelado de los bronquiolos ha sido descrito como el indicador principal e independiente de la progresión de la EPOC, más que el proceso de inflamación [88]. Por tanto, el progreso de la EPOC está fuertemente asociado al engrosamiento de la pared bronquilar por procesos de reparación y remodelado.

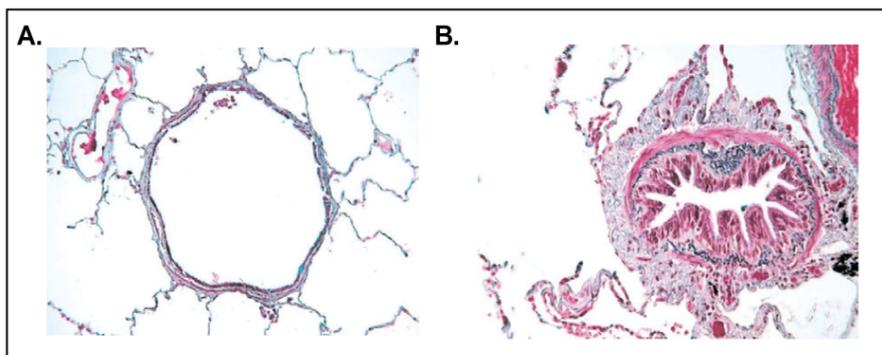


Figura 17. Remodelado bronquiolar en la EPOC: Comparación entre individuo sano y EPOC. (Figura extraída de Decramer M et al, 2012 [156]). (A) Bronquiolo normal. (B) En la EPOC los

bronquiolos sufren un estrechamiento debido a la infiltración de células inflamatorias, la hiperplasia mucosa y la deposición de tejido conectivo en el espacio peribronquiolar.

La fibrosis peri-bronquiolar, proceso que contribuye a este engrosamiento, ha sido descrita como una de las lesiones patológicas más importantes en individuos con EPOC leve y moderada [167]. Los bronquiolos, caracterizados por la ausencia de cartílago y por un diámetro interno inferior a 2mm, constituyen los conductos aéreos distales del pulmón y están formados por las siguientes capas: epitelio, lámina propia, músculo liso y adventicia [168]. En pacientes con EPOC, el epitelio bronquiolar presenta anormalidades estructurales como un grosor aumentado por metaplasia escamosa e hiperplasia de células caliciformes [165]. Además de estas anormalidades estructurales, el epitelio bronquiolar podría estar potencialmente implicado en el proceso de fibrosis peri-bronquiolar.

La fibrosis peri-bronquiolar es un proceso fibrótico asociado a la contracción del tejido, que causa el estrechamiento de la vía aérea y la consiguiente limitación del flujo aéreo. Este proceso fibrótico desencadena cambios estructurales en los bronquiolos mediante la acumulación de fibroblastos/miofibroblastos y de un denso tejido conectivo extracelular [159]. Actualmente no está del todo claro el factor exacto responsable de la producción de la matriz característica del remodelado así como el papel del epitelio activado en el proceso de remodelado y en la activación/diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos en la fibrosis peri-bronquiolar asociada a la EPOC.

Los miofibroblastos son células clave en el desarrollo de procesos fibróticos [169], pudiendo contribuir a la fibrosis peri-bronquiolar característica del remodelado bronquiolar. Estas células presentan características

morfológicas y bioquímicas intermedias entre fibroblastos y células de músculo liso [170] y actualmente los marcadores específicos para diferenciarlas son limitados. Los miofibroblastos presentan una mayor capacidad de proliferación y migración y se localizan en los focos fibróticos. Comparten con las células de músculo liso la presencia de fibras de α -actina de músculo liso (α -SMA), que les confiere un fenotipo contráctil [169]. Además son células que sintetizan grandes cantidades de colágeno, considerado el principal componente de la matriz extracelular. Por tanto, los miofibroblastos, junto con los fibroblastos, son los principales responsables de la síntesis y deposición de matriz extracelular, desencadenando las alteraciones estructurales características del remodelado [169]. Tanto la presencia de α -SMA como la síntesis de colágeno se utilizan como indicadores para diferenciar a los miofibroblastos de los otros dos tipos celulares.

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

Tabla 5. Características de los miofibroblastos (Tabla extraída y modificada de Singh SR et al, 2008 [170]). *Definición de abreviaturas: α -SMA: α -actina de músculo liso; COL tipo I: colágeno tipo I.*

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

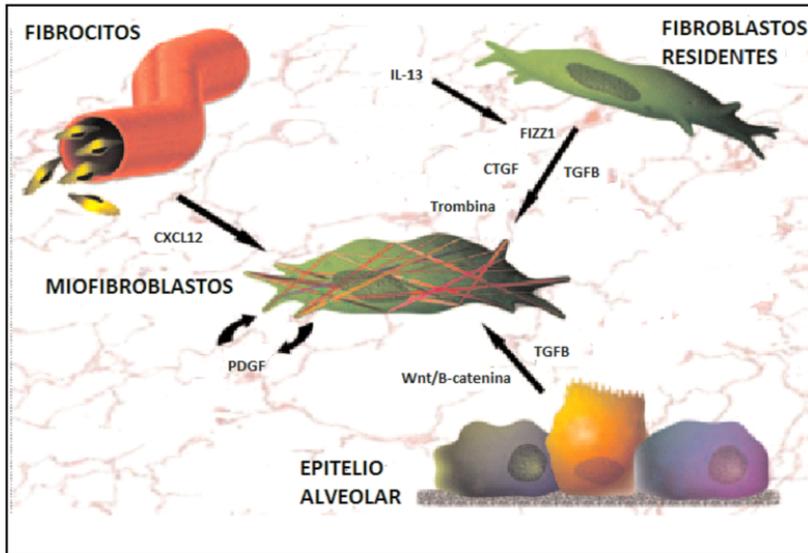


Figura 18. Posibles orígenes de los miofibroblastos. (Figura extraída y modificada de Scotton CJ et al, 2007 [169]). Las posibles vías del origen de los miofibroblastos, células clave en procesos fibróticos, son: (1) Proliferación y diferenciación de fibroblastos residentes, (2) reclutamiento de fibrocitos circulantes y (3) transición epitelial mesenquimal. Diversas citoquinas, factores de crecimiento y rutas de señalización podrían mediar estas rutas (flechas negras).

Una posible ruta es la proliferación y diferenciación de fibroblastos residentes en los pulmones a miofibroblastos, bajo la influencia de un ambiente profibrótico [171]. Una segunda vía que se plantea es que los miofibroblastos deriven del reclutamiento de fibrocitos circulantes, un tipo de células progenitoras que provienen de la médula espinal [172]. Además se ha postulado otra vía descrita en la literatura reciente, no representada en esta figura, que sería la transición de células de músculo liso de las vías aéreas a miofibroblastos [173]. Por último, otra hipotética vía representada en la figura describe una diferenciación de células epiteliales a

miofibroblastos mediante un proceso conocido como transición epitelial mesenquimal (TEM).

2.9. HIPERTENSIÓN PULMONAR ASOCIADA A LA ENFERMEDAD PULMONAR OBSTRUCTIVA CRÓNICA

La Hipertensión Pulmonar (HP) es una complicación importante que tiene lugar en la evolución natural de la EPOC. Su presencia está asociada con la reducción de la supervivencia y un mayor uso de los recursos en materia de asistencia sanitaria.

La clasificación clínica que actualmente realiza la Organización Mundial de la Salud (OMS) incluye la EPOC en el grupo diagnóstico III: La HP se encuentra asociada a desórdenes en el sistema respiratorio o hipoxemia (Tabla 6) [174]. El National Institute of Health la define como presión arterial pulmonar media de más de 25 mmHg [175]. Un esquema arbitrario de la gravedad basado en la presión arterial pulmonar media sería el siguiente: suave, de 26 a 34 mmHg ; moderado, de 35 a 44mmHg; y severa, 45mmHg o mas [176].

La HP en pacientes EPOC se manifiesta generalmente de forma suave y la presentan fundamentalmente aquellos pacientes que padecen hipoxemia severa. Existe a su vez un tipo de paciente EPOC con una HP desproporcionada que se desarrolla con una elevada presión arterial pulmonar media (≥ 40 mmHg) y con evidencia de una disfunción o fallo del ventrículo derecho (VD) a pesar de reducciones de suave a moderadas en el volumen espiratorio forzado en 1 segundo (VEMS $\geq 50\%$ predicho) y de la

hipoxemia [176-178]. A dichos pacientes se les designa con el término “fuera de proporción”.

GRUPO DIAGNÓSTICO OMS	DESCRIPCIÓN
Grupo I: Hipertensión Pulmonar Arterial	Familiar Idiopática asociada a otras condiciones: p.e. la enfermedad vascular del colágeno
Grupo II: Hipertensión Pulmonar Venosa	Fallo en el ventrículo izquierdo
Grupo III: Hipertensión Pulmonar asociada con enfermedad pulmonar intrínseca o hipoxemia.	EPOC Enfermedad Pulmonar Intersticial Alteración de la respiración durante el sueño
Grupo IV: Hipertensión Pulmonar causada por obstrucción tromboembólica crónica.	Enfermedad Crónica Tromboembólica Tumor Parásitos Material externo
Grupo V: Diverso	Sarcoidosis Pulmonar Histiocitosis de células de Langerhans Linfoangioleiomiomatosis

Tabla 6 .Clasificación Clínica designada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) Clinica classification by the World Health Organization (WHO) symposium on pulmonary arterial hypertension in Venice, Italy, 2003.
The table is a modification of that published by Simmonneau et al.[174].

2.9.1. IMPACTO

Se desconoce la incidencia o prevalencia exacta de HP en EPOC. Un antiguo estudio de Strasburgo, Francia, mostró que existía HP en 62 de 175 pacientes (35%) estudiados con EPOC moderada a severa usando un umbral de presión arterial pulmonar media (PAPM) superior a 20mmHg. Datos mas

recientes caracterizan mejor la prevalencia en algunos subgrupos de EPOC. De la población EPOC que fue estudiada, bien por necesitar un trasplante de pulmón o por una cirugía de reducción de volumen, aproximadamente la mitad padecían HP [177]. Ésta se manifestaba generalmente de forma suave, con una presión arterial pulmonar media de 27 ± 8 mmHg. Sólo en un 4% de los sujetos estudiados se detectó una HP severa .

El grupo de Chaouat [178], en sus estudios, mostró que sólo 27 de 998 pacientes estudiados con EPOC presentaban una PAPM de 40 mmHg o más. Y tan sólo 11 (1%) tenían HP sin ninguna otra causa identificable mas que EPOC.

La extrapolación de los datos utilizados para conocer los resultados epidemiológicos para EPOC en Estados Unidos nos permiten un análisis muy interesante. Asumiendo que un 1% de los 500.000 pacientes hospitalizados por EPOC padecen un HP de moderada a severa (presión arterial pulmonar media de 40 mmHg o mayor), la prevalencia general de HP significativa en pacientes con EPOC es muy superior a la prevalencia de la HPA idiopática. Aquellos pacientes con HP severa parecen tener menos obstrucción severa, tal y como lo indica el volumen espiratorio forzado en un segundo (VEMS), de aproximadamente el 50% del valor previsto [178]. El 40% de los pacientes con EPOC e HP examinado por autopsia presentó evidencia de hipertrofia ventricular derecha [179]. El examen de una población de referencia que padece HP ofrece otra perspectiva. En el servicio de HP perteneciente a la Clínica Mayo en Jacksonville, Florida, el 10% (58 de 578) de los pacientes derivados por padecer HP entre 1998 y 2008 tenían EPOC como causa primaria o contribuyente. Las referencias han sido más

frecuentes en los últimos 3 años, pero esto puede que sólo se deba a que en la actualidad hay una mayor detección de la enfermedad debido a avances y mejoras médicas más que a un aumento en la incidencia .

El desarrollo natural de la HP en el marco de la EPOC tampoco está bien caracterizada. Por una parte existe un estudio longitudinal que sugiere que la HP inducida por el ejercicio puede preceder a un estado persistente incluso en reposo [180]. Otro estudio de pacientes sometidos a cateterismo cardíaco derecho secuencial demostraron una progresión en el tiempo, aunque a un ritmo lento de 0,5mmHg por año [181]. A pesar de los niveles suaves y la lenta progresión de la HP en la mayoría de los pacientes con EPOC, el estudio de Chaouat [178] confirma los datos más antiguos que sugieren un impacto más dramático en la supervivencia [182, 183]. Cinco años de supervivencia oscilan entre menos de 20% a 36% (Chaouat menos del 20%, Oswald 36%). El grupo francés ha demostrado que la supervivencia se correlaciona con el deterioro de la HP y el envejecimiento.

Además, se ha demostrado que la HP es un factor predictivo de las exacerbaciones de la EPOC [182]. Puede ser difícil separar el impacto independiente de enfermedad cardiovascular y pulmonar cuando coexisten. De acuerdo con Agencia para la Investigación y el Informe de calidad del 2005, las hospitalizaciones implican que las enfermedades cardio-pulmonares (incluyendo, pero no limitado a, *cor pulmonale*) han aumentado en un 51% desde 1997 [184]. Por lo general para pacientes con un diagnóstico secundario, la duración de la estancia y costes hospitalarios de enfermedad cardíaca pulmonar es mayor en comparación con pacientes con diagnóstico primario similar sin la enfermedad cardíaca pulmonar. En

general, el coste estimado es de \$5,6 millones, o 1,8% del coste total de todas las estancias hospitalarias.

2.9.1.1. PATOBIOLOGÍA

Normalmente, la circulación pulmonar ofrece una baja resistencia que puede acomodar a un aumento significativo en el gasto cardíaco con poco aumento de la presión arterial pulmonar [185]. Los vasos pulmonares tienen aproximadamente una décima parte de la resistencia y una cuarta parte de la presión arterial en comparación con la circulación sistémica [186].

Existe una gran variedad de procesos fisiopatológicos implicados en la EPOC asociada a HP. Por ejemplo, la hipoxia produce vasoconstricción para mantener una ventilación adecuada para equilibrar la perfusión [186, 187]. La respuesta vasoconstrictora pulmonar hipóxica está mediada principalmente por alteraciones en los niveles de vasoconstrictores [188].

La hipoxia crónica produce un remodelado vascular en el que las distintas funciones celulares están alteradas, incluyendo fibroblastos, células endoteliales y células del músculo liso vascular [189]. El remodelado afectaría a las tres capas vasculares: fibrosis de la íntima, hipertrofia del músculo liso de la media, y la alteración de la matriz de colágeno de la adventicia.

Se sabe que la remodelación vascular descrita anteriormente explica la HP persistente en la EPOC. La falta de reversibilidad en respuesta al oxígeno u óxido nítrico inhalado apoya esa afirmación. Lo que no se conoce es el

mecanismo por el cual se produce la remodelación. De hecho, la correlación entre la HP e indicadores de la gravedad de la enfermedad, tales como VEMS y PaO₂, es débil. Los niveles de vasoconstrictores tales como la endotelina-1, la serotonina, y angiotensina II se encuentran generalmente elevados, y los niveles de vasodilatadores endógenos disminuyen proporcionalmente. La disfunción de las células endoteliales probablemente contribuye al desequilibrio de los mediadores vasculares. Como consecuencia, puede haber disminución de la producción de NO y de la prostaciclina, así como la disminución del aclaramiento de la ET-1 [190, 191]. Además, la angiotensina II, la ET-1, y la serotonina estimulan la proliferación de células musculares vasculares lisas, lo que agrava el remodelado vascular.

Los polimorfismos genéticos también pueden desempeñar un papel importante. Estos vínculos se han demostrado con el gen de la óxido nítrico sintasa y el genotipo del transportador de serotonina LL. Éste último puede ser relevante para el posible papel de la serotonina y sus transportadores en la hiperplasia del músculo liso vascular. Un estudio demostró la correlación del genotipo LL con una mayor presión arterial pulmonar [192]. Mientras la mayoría de los pacientes con HP en asociación con EPOC tienen una presión arterial pulmonar media (PAPM) ligeramente elevada, un pequeño porcentaje padece una HP de moderada a severa. Los expertos han especulado sobre la causa de hipertensión pulmonar desproporcionada con la gravedad de la EPOC. Uno de los autores consultados [193] piensa que las dos explicaciones más posibles son: (1) una respuesta vasoconstrictora pulmonar debida a una hipersensibilidad a la hipoxia cuyo

origen tal vez sea una predisposición genética [192], o (2) la coexistencia de la EPOC y la vasculopatía arterial pulmonar.

Otras áreas de investigación activa incluyen la toxicidad directa del humo de tabaco sobre la circulación pulmonar [194-196], la inflamación que involucra a citoquinas, y los roles de hipercapnia crónica [197, 198] y policitemia [199]. Todos potencialmente pueden causar o facilitar el remodelado vascular. Los factores mecánicos también pueden jugar un papel importante. La hiperinflación puede conducir a un aumento de la resistencia vascular pulmonar [200]. La disfunción diastólica puede elevar la presión de llenado de la aurícula izquierda, lo que contribuye a una elevación de la presión arterial pulmonar media [201]. La reducción de volumen capilar de un enfisema puede ser contributiva; sin embargo, la HP no parece estar relacionada con el área total de la superficie alveolar o la densidad pulmonar.

En pacientes con enfermedad grave, la arteriopatía pulmonar progresiva aumenta la resistencia al flujo requiriendo mayores presiones ejercidas por el ventrículo derecho. En última instancia, esto se traduce en la hipertrofia del ventrículo derecho. Exacerbaciones de la EPOC pueden tener como resultado el empeoramiento de la HP y el edema periférico [99]. En general, la HP vuelve a la línea de base después de que el paciente se recupere de la exacerbación aguda. A pesar de que la retención de líquidos y el edema periférico puede ser señal de la insuficiencia ventricular derecha, la hipoxia y la hipercapnia de forma independiente pueden producir reabsorción de sodio y agua a través del sistema renina-angiotensina-aldosterona [202].

2.9.2. REMODELADO VASCULAR PULMONAR

El remodelado vascular es un proceso que produce un engrosamiento de la pared arterial y aumento de la resistencia de la misma mediante la invasión de la pared del lumen del vaso reduciendo así su diámetro. En la EPOC, el remodelado vascular pulmonar afecta a las arterias pequeñas y precapilares, y se ha identificado en diferentes grados de severidad de la enfermedad. Los pacientes de EPOC e HP en fase terminal muestran depósito de músculo longitudinal, fibrosis y elastosis que amplían la íntima de las arterias pulmonares musculares [203, 204]. Esta ampliación de la íntima de las arterias pulmonares musculares también está presente en los pacientes con EPOC muy grave, sin HP [195]. En las arteriolas, hay un desarrollo de una capa media del músculo liso circular, delimitado por una nueva lámina elástica, con la deposición de músculo longitudinal y la fibrosis de la íntima [203, 204].

En EPOC leve a moderada, las arterias pulmonares musculares muestran crecimiento de la íntima con reducción del tamaño de la luz, que es más pronunciada en las pequeñas arterias [205-207]. La hiperplasia de la íntima es resultado de la proliferación de células musculares lisas (CML) mal diferenciadas, y la deposición de las fibras elásticas y de colágeno (Figura 19) [194]. Además, se encuentra muscularización de las arteriolas [208].

Los cambios en la túnica media son menos visibles en la EPOC y la mayoría de los estudios morfométricos no han logrado demostrar diferencias en el espesor de la capa muscular al comparar los pacientes con EPOC con los sujetos control [205-207]. El remodelado de las arterias pulmonares no se limita a pacientes con diagnóstico establecido de EPOC. De hecho, el

engrosamiento de la íntima, que no difiere del observado en pacientes con EPOC leve o moderada, también está presente en los grandes fumadores con función pulmonar normal [194].

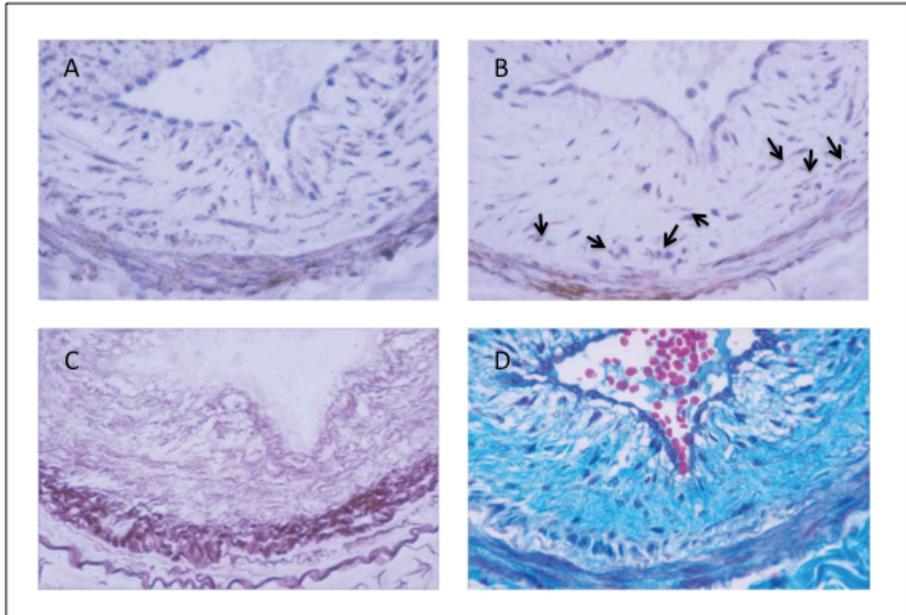


Figura 19. Remodelado Vascular Pulmonar en la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica. Serie de secciones de una arteria pulmonar con hiperplasia prominente de la íntima y estrechamiento de la luz. La inmunotinción para la α -actina del músculo liso (A) revela la proliferación en la íntima de células musculares lisas, aunque no todos ellos muestran inmunorreactividad para la desmina [flechas] (B), un filamento contráctil expresado en células musculares lisas maduras, lo que indica un estado pobremente diferenciado. La tinción para las fibras elásticas (c) y de colágeno (d) mostraron una marcada elastosis y fibrosis en la íntima.[209]

2.9.2.1. CAMBIOS INFLAMATORIOS

La EPOC es una enfermedad inflamatoria; por lo tanto, las células inflamatorias pueden contribuir a las alteraciones de los vasos pulmonares.

De hecho, el grado de remodelado vascular pulmonar se correlaciona con la severidad de infiltrado de células inflamatorias en las vías respiratorias pequeñas [206, 208]. Los pacientes con EPOC tienen un mayor número de células inflamatorias que infiltran la adventicia de las arterias pulmonares musculares en comparación con los no fumadores [197]. Este infiltrado inflamatorio está constituido en su mayoría por linfocitos T activados, con un predominio de la subpoblación CD8+ [197, 210]. Por el contrario, el número de neutrófilos, macrófagos y linfocitos B son mínimas, y no difieren de las de los sujetos control. En los pacientes con EPOC leve a moderada la intensidad de infiltrado de células inflamatorias en las arterias pulmonares se correlaciona con el grado de obstrucción al flujo aéreo, lo que sugiere que, conforme avanza la enfermedad, la reacción inflamatoria en las arterias pulmonares puede volverse más severa [197].

Curiosamente, los fumadores con función pulmonar normal también muestran un aumento del número de linfocitos T CD8+ en la arteria adventicia, con una reducción del ratio CD4+ / CD8+ en comparación con los no fumadores, que no difieren de los pacientes con EPOC de leve a moderada [197].

2.9.3. DISFUNCIÓN ENDOTELIAL

Las células endoteliales juegan un papel crucial en la regulación de la homeostasis vascular [211]. En los vasos pulmonares, las células endoteliales contribuyen a la reducción del tono vascular, [212] regulan la adaptación del vaso al flujo creciente [213] y modulan la vasoconstricción

hipóxica [214, 215]. La disfunción endotelial de las arterias pulmonares se ha demostrado en diferentes grados de gravedad de la EPOC: pacientes con EPOC en fase terminal que se sometieron a un trasplante de pulmón [216] y los pacientes con enfermedad leve a moderada (Figura 20) [207]. El deterioro de la función endotelial puede estar asociada con o como resultado de cambios en la expresión o la liberación equilibrada de mediadores vasoactivos con propiedades vasodilatadoras, como el NO o la prostaciclina, y los mediadores con propiedades vasoconstrictoras, como la ET-1 o la angiotensina.

De hecho, la expresión de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) en las arterias pulmonares, que se encuentra disminuida en pacientes con HPA idiopática [191], también se reduce en pacientes con EPOC [217, 218] y en los fumadores sin obstrucción al flujo aéreo [217].

Nana-Sinkam et al. [219] han demostrado que la expresión de la prostaciclina sintasa en las arterias pulmonares también se reduce en pacientes con enfisema grave. Del mismo modo, Tuder et al. [220] demostraron la pérdida de expresión de la prostaciclina sintasa en las células endoteliales de las arterias pulmonares de pacientes con diferentes formas de HP.

Giaid et al. [39] demostraron que la expresión de ET-1 en las arterias pulmonares se encontraba incrementada tanto en formas primarias como secundarias de hipertensión pulmonar.

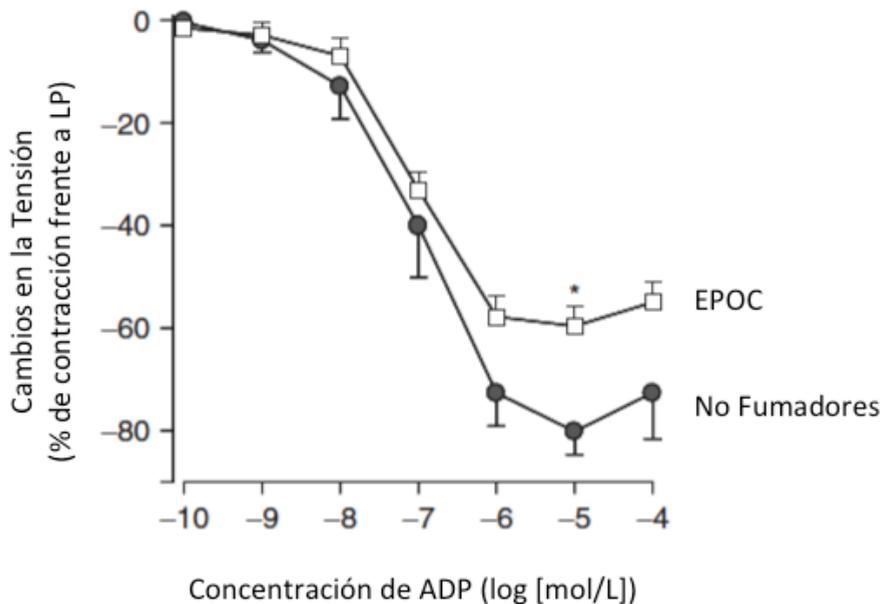


Figura 20. La disfunción endotelial en la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). Cambios en la tensión de los anillos de la arteria pulmonar, precontraída con L-fenilefrina (LP), en respuesta a concentraciones acumulativas de adenosina difosfato (ADP), un vasodilatador endotelio-dependiente, en los pacientes con EPOC de leve a moderada y en pacientes no fumadores. Los pacientes con EPOC mostraron una reducción endotelio-dependiente de la relajación en comparación con los no fumadores [207] * P <0,05 frente a los no fumadores. (Figura extraída y modificada de Barberá, JA. et al. 2009 [209]).

Sin embargo, estudios realizados en pacientes con EPOC de leve a moderada o enfisema grave no han demostrado diferencias en la expresión de ET-1 en las arterias pulmonares, en comparación con los no fumadores [217, 218]. No obstante esto podría deberse a que los pacientes evaluados en esta serie no padecían HP.

2.9.4. PATOBIOLOGÍA DE LOS CAMBIOS VASCULARES PULMONARES

La hipoxia se ha considerado tradicionalmente el mecanismo patogénico principal de la HP en la EPOC. Sin embargo, su papel está siendo reconsiderado porque la remodelación vascular pulmonar y la disfunción endotelial se produce en pacientes con EPOC leve que no tienen hipoxemia y en los fumadores con función pulmonar normal [194, 197, 206], y porque la oxigenoterapia a largo plazo no revierte del todo la HP [221].

Observaciones recientes han indicado que los productos del humo del tabaco puede ser la causa de la insuficiencia vascular pulmonar en la EPOC [99]. Esta propuesta surge de la observación de que los fumadores con función pulmonar normal muestran cambios importantes en las arterias pulmonares, tales como la proliferación de células de músculo liso (CML), [194] deterioro de la función endotelial [207], la reducción de expresión de la eNOS, [217] el aumento de expresión de factores de crecimiento [195] e infiltrado de células inflamatorias [197], que son indistinguibles de las observadas en pacientes con EPOC leve a moderada, y se diferencian claramente de los no fumadores.

Además, cobayas expuestas a largo plazo al humo del cigarrillo desarrollar HP y el remodelado vascular [222], cambios que aparecen cuando no hay evidencia de enfisema, lo que indica que las anomalías vasculares inducidas por el humo del tabaco preceden a su desarrollo [223]. En este modelo animal, la exposición al humo del tabaco induce a cambios rápidos en la expresión del gen del factor de crecimiento endotelial vascular (FCEV), el receptor de FCEV, ET-1 y NOS inducible [224], mediadores que regulan el crecimiento de células vasculares y la contracción del vaso, y es probable

que estén involucradas en la patogénesis de los cambios vasculares pulmonares de la EPOC. Además, la exposición de las células endoteliales de la arteria pulmonar al humo del cigarrillo provoca una inhibición irreversible de la actividad de eNOS, que es como consecuencia de la disminución de contenido de proteína y el ARN mensajero [225]. El Humo del tabaco contiene una serie de productos que tienen el potencial para producir lesión endotelial, entre los que la acroleína aldehído parece papel importante, ya que reduce la expresión de la sintasa de prostaciclina en las células endoteliales [219].

En resumen, hay pruebas que sugieren que el evento inicial en la historia natural del HP en la enfermedad pulmonar obstructiva pulmonar podría comenzar con la lesión del endotelio por el consumo de productos de cigarrillo (Figura 21). De hecho, las lesiones endoteliales en arterias pulmonares en pacientes con EPOC pueden ser identificados en observación microscópica como áreas denudadas de endotelio [225]. Más sutil, pero no por ello menos importante, es la alteración de síntesis endotelial y liberación de mediadores vasoactivos asociados con el hábito de fumar [217]. El daño endotelial también produce un desequilibrio entre los factores que regulan crecimiento de las células, lo que favorece la proliferación de células de músculo liso y deposición de matriz extracelular (Figura 21). Todos estos cambios pueden contribuir a la hiperplasia de la íntima, con la consiguiente reducción del lumen arterial, lo que aumenta la resistencia vascular pulmonar.

Las arterias con disfunción endotelial son más susceptibles a la acción de factores adicionales. Entre ellos, la hipoxemia arterial sostenida y la hipoxia alveolar en las unidades pulmonares mal ventiladas desempeñan un papel crucial, ya que puede inducir mayor deterioro endotelial y el remodelado vascular, ya sea directamente o a través de mecanismos dependientes de FCVE, amplificando los efectos iniciales de los productos de humo de cigarrillo. Efectos similares pueden ser producidos por las citocinas liberadas por las células inflamatorias (Figura 21).

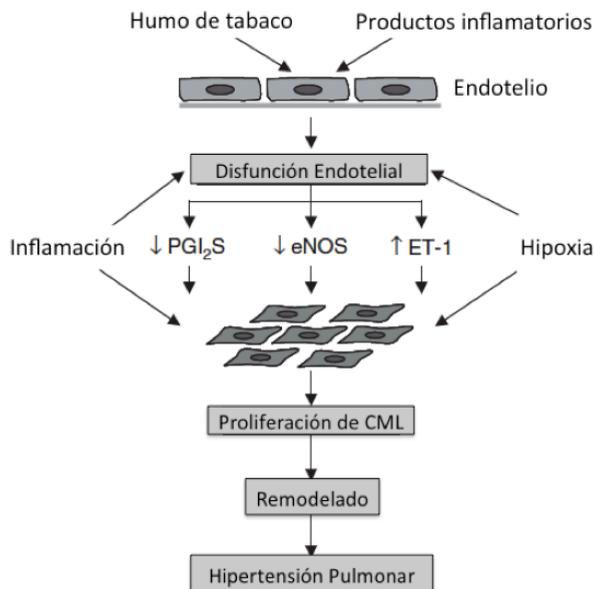


Figura 21. Biopatología de la Hipertensión Pulmonar en la EPOC.

El humo del cigarrillo o diferentes productos inflamatorios pueden dar lugar al inicio de una secuencia de cambios mediante el desarrollo de una disfunción endotelial. El desequilibrio entre agentes vasoactivos derivados del endotelio promueve la proliferación de células de músculo liso (CML), el remodelado de la pared vascular y la hipertensión pulmonar. En el curso natural de la enfermedad, la inflamación y la hipoxia contribuyen a mejorar y perpetuar este proceso actuando sobre células endoteliales y del músculo liso.

eNOS = óxido nítrico sintasa endotelial; ET-1: endotelina-1; PGI₂S: prostaciclina (prostaglandina I₂) sintasa. (Figura extraída y modificada de Barberá, JA. et al. 2009 [209]).

2.9.5. TRATAMIENTO DE LA HIPERTENSION PULMONAR ARTERIAL ASOCIADA A LA ENFERMEDAD PULMONAR OBSTRUCTIVA CRÓNICA

En los últimos años se han desarrollado varios fármacos para algunas formas de HP que mejoran los síntomas clínicos y retrasan la progresión de la enfermedad, pero el pronóstico es todavía pobre. La eficacia de los vasodilatadores está limitada por la falta de selectividad pulmonar, el desacoplamiento de la ventilación-perfusión y la baja eficacia cuando la contracción de las arterias pulmonares implica mecanismos de sensibilización al calcio.

Las estrategias terapéuticas están dirigidas a reducir la vasoconstricción y/o el componente proliferativo, y sólo la HPA posee un tratamiento farmacológico aprobado.

Se han utilizado antagonistas de los canales de calcio pero éstos sólo benefician a una pequeña proporción de pacientes con HPA. Durante los últimos años se han desarrollado un grupo de fármacos destinados a combatir la HPA incluyendo a inhibidores de las fosfodisterasas (sildenafil y análogos), prostaciclina y análogos (p.e. el iloprost) y antagonistas de los receptores de ET-1 (bosentan y análogos), los cuales mejoran los síntomas clínicos y ralentizan la progresión de la enfermedad. Aún así, el pronóstico para pacientes tratados todavía es malo y las estrategias actuales están dirigidas al uso de combinación de diferentes fármacos. Además, los

tratamientos son muy caros, representando una gran carga económica para el sistema nacional de salud (desde alrededor de 15-25.000€ para el sildenafil hasta unos 75-150.000€ para el iloprost por paciente/año, lo cual aumenta cuando los usamos en combinación). La terapia para la Hipertensión Pulmonar Persistente Neonatal (HPPN) incluye la administración de NO inhalado, a pesar de que este tratamiento falla en aproximadamente el 50% en recién nacidos y el sildenafil actualmente está siendo considerado como alternativa. Pacientes que padecen una HP desproporcionada teóricamente podrían beneficiarse de estos tratamientos pero actualmente esto no está aprobado debido a la falta de estudios controlados randomizados. Es más, el uso de la terapia con vasodilatadores en pacientes con EPOC y con HP actualmente es controvertida (especialmente en aquellos con una HP moderada) debido a un efecto potencialmente nocivo de estos fármacos en el intercambio gaseoso (como describiremos más adelante). Un tratamiento seguro y efectivo podría además de forma hipotética mejorar la supervivencia de gran parte de la población de pacientes con una Presión Pulmonar Arterial (PPA) moderadamente elevada.

2.9.5.1. LIMITACIÓN DE LAS TERAPIAS ACTUALES. BÚSQUEDA DE LOS FÁRMACOS IDÓNEOS

Los tratamientos actuales para la HP con vasodilatadores (bloqueantes de los canales de calcio, inhibidores de PDE5 y análogos de prostaciclina) están limitados por sus efectos sistémicos. De este modo, la hipotensión sistémica excluye el uso de dosis efectivas de vasodilatadores.

En neonatos con HPPN, el *ductus arteriosus* y/o el *forament ovale* permanecen patentes permitiendo una comunicación (*shunt*) hacia la izquierda o la derecha. Por consiguiente, la vasodilatación sistémica en lactantes con HPPN es particularmente dañina debido a que aumenta el *shunt* y reduce la oxigenación arterial. Pese a la necesidad de la selectividad pulmonar, los fármacos actuales presentan tanto acciones sistémicas como pulmonares. Según estudios realizados hace algunos años en los que se comparó el efecto vasodilatador de los vasodilatadores usados o con potencial de ser usados en HP en ese momento en arterias pulmonares y sistémicas de cerdos neonatos [226] el único vasodilatador pulmonar selectivo fue el ATP (vía receptores P2Y₁), un compuesto con poco potencial de ser usado como tratamiento crónico.

Algunos vasodilatadores no son capaces de inducir una vasodilatación efectiva dependiendo del mecanismo vasoconstrictor subyacente responsable del aumento de la PPA. La contracción del músculo liso se produce por:

1/ aumentos en calcio intracelular que conduce a un aumento de la activación de la quinasa de las cadenas ligeras de miosina (MLCK por sus siglas en inglés, *myosin light chain kinase*) y

2/ calcio-sensibilización mediada principalmente por la inhibición de la fosfatasa de las cadenas ligeras de miosina (MLCP por sus siglas en inglés, *myosin light chain phosphatase*).

De este modo, los bloqueantes de canales de calcio son muy efectivos reduciendo el calcio pero son vasodilatadores precarios cuando las arterias

pulmonares están estimuladas por vasoconstrictores (como el TXA₂), que actúa principalmente en la sensibilización al calcio. El NO y los fármacos que activan/potencian la secuencia del NO-GMPc (p.e. los inhibidores de la PDE5 (sildenafil), activadores de la guanilato ciclasa (riociguat)) son efectivos reduciendo el calcio y tienen efectos parciales en la sensibilización del calcio. El Fasudil y el Y-27632, fármacos que se desarrollaron como inhibidores de la Rho quinasa, son vasodilatadores muy efectivos a pesar de no afectar a los niveles de calcio [227].

Tradicionalmente, los pacientes han sido clasificados en aquellos que responden a terapias vasodilatadoras y aquellos que no responden a las mismas basándose en una respuesta vasodilatadora aguda a la inhalación de NO o bloqueantes de los canales de calcio. Ahora parece que los pacientes anteriormente considerados como resistentes a la terapia vasodilatadora deberían responder ante un vasodilatador adecuado [228].

Otra limitación de la mayoría, si no de todos, de los vasodilatadores disponibles hoy en día y que se administran sistémicamente son los efectos de desacoplamiento en la ventilación-perfusión. La vasoconstricción pulmonar hipóxica (VPH) es un mecanismo fisiológico de adaptación altamente conservada que optimiza la saturación de oxígeno en sangre mediante un aumento de la resistencia vascular pulmonar en las regiones pulmonares mal aireadas (hipóxica). Por lo tanto, bajo las condiciones de enfermedad pulmonar obstructiva, la VPH nos lleva a reducir el flujo sanguíneo a regiones hipóxicas y lo redirige hacia los alvéolos mejor ventilados con el fin de mantener la saturación arterial de O₂ a expensas de

una elevada PPA (Figura 22, izquierda). Los vasodilatadores usados actualmente ejercen su acción profundiendo bien los alvéolos bien ventilados o los hipóxicos. Esto da lugar a una discordancia en el tandem ventilación-perfusión y a un efecto nocivo en el intercambio gaseoso (Figura 22, derecha).

Con el fin de sortear este problema han sido usados vasodilatadores inhalados incluyendo el NO, nitritos, derivados de prostaciclina y otras drogas. La ventaja es que estos fármacos sólo tienen acceso a los alvéolos ventilados (la obstrucción aérea no permite alcanzar las zonas hipóxicas). Además, dichos fármacos no alcanzan la circulación sistémica y, si lo hacen, es sólo parcialmente. El principal problema de esta opción es que se requiere la utilización de sistemas complejos de inhalación continua de fármacos.

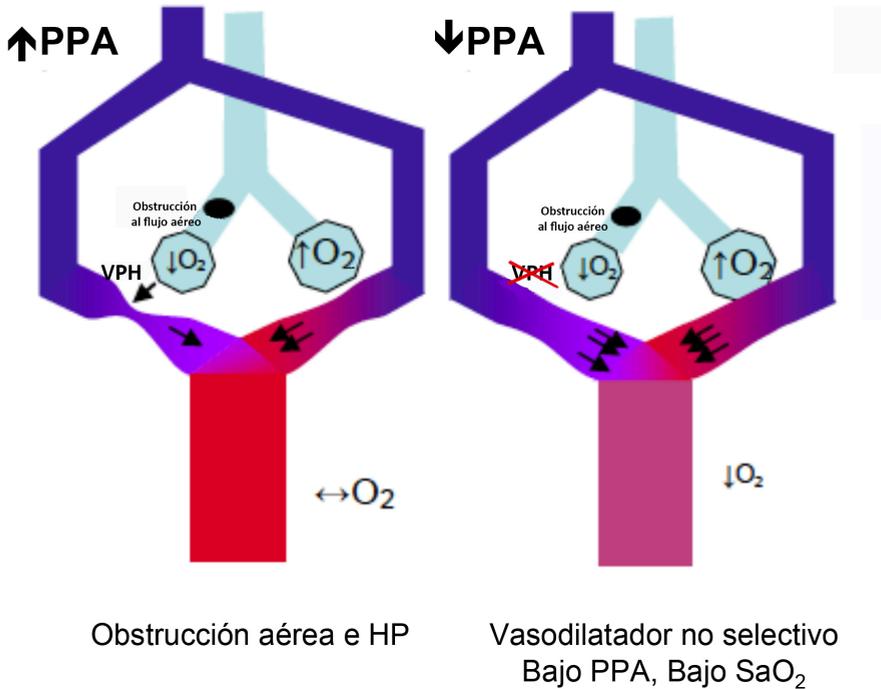


Figura 22 . Representación esquemática del acoplamiento de la ventilación-perfusión en la obstrucción aérea (izquierda) y desacoplamiento tras la administración de un vasodilatador no selectivo (derecha). VPH: vasoconstricción pulmonar hipóxica; HP: Hipertensión Pulmonar; PPA: Presión Pulmonar Arterial.

El fármaco idóneo para tratar la HP debe mostrar las siguientes propiedades:

1. Combinar efectos vasodilatadores y antiproliferativos.
2. Ejercer efectos vasodilatadores en la circulación pulmonar, evitando la hipotensión sistémica.
3. Ejercer efectos vasodilatadores selectivos en las áreas pulmonares oxigenadas, manteniendo la VPH.
4. Ejercer efectos vasodilatadores efectivos bajo condiciones de

sensibilización al calcio.

5. Farmacocinéticas apropiadas (activas oralmente y con vida media prolongada).

Los beneficios esperados de estos compuestos son:

1. Reducir la PPA.
2. A largo plazo reducir el fallo y la hipertrofia ventricular derecha.
3. Mejorar la saturación de oxígeno arterial, reduciendo la necesidad de terapia con oxígeno.
4. Mejorar los síntomas clínicos: capacidad de realizar ejercicio.
5. Aumentar la supervivencia.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

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

- 1) La HP asociada a la EPOC se desarrollada principalmente por el consumo crónico de tabaco, siendo un factor de mal pronóstico de la enfermedad, elevando la morbi-mortalidad y el gasto sanitario asociado a la EPOC.
- 2) El sistema de la ET se encuentra sobre-expresado y alterado en los pacientes con EPOC y contribuye al remodelado de las arterias pulmonares y al desarrollo posterior de HP hipóxica.
- 3) El uso de vasodilatadores sistémicos para tratar la HP asociada a EPOC es controvertido dados sus efectos deletéreos sobre el desacoplamiento entre la ventilación y la perfusión lo que contribuye a una disminución de la saturación de oxígeno.
- 4) El empleo de vasodilatadores con efecto antiremodelado arterial y con efecto débil en la saturación de oxígeno podría ser una terapia de interés en la HP asociada a la EPOC.
- 5) El uso de antagonistas de los ETRs puede mejorar la disnea y la capacidad de ejercicio en pacientes EPOC con HP desproporcionada, sin embargo hoy día se desconoce la preferencia de bloqueo selectivo o dual de los ETRs.
- 6) Actualmente se desconoce el efecto del humo de tabaco sobre el sistema de ET en los componentes celulares de las arterias pulmonares, así como el efecto de los inhibidores de ETRs sobre las alteraciones del sistema de ET inducidos por el tabaco.

En la presente tesis doctoral se hipotetiza una posible acción antiremodelado arterial pulmonar de los inhibidores de receptores duales de ET. En concreto se hipotetiza que bosentan, un inhibidor dual de los ETRs, mejora la disfunción endotelial, el remodelado muscular arterial y la contractilidad arterial pulmonar comprometidas por el humo de tabaco de manera superior a la inhibición de ETRs selectivos.

Con el fin de evaluar la validez de las hipótesis planteadas a partir de los antecedentes expuestos, se establecen los siguientes objetivos, que se desarrollarán en dos estudios diferenciados:

Objetivos del estudio 1:

- i) Estudiar el efecto del extracto de humo de tabaco sobre el sistema ET en células endoteliales de arteria pulmonar humana
- ii) Estudiar el efecto de bosentan sobre el efecto deletéreo del extracto de humo de tabaco en el sistema de ET así como en la disfunción endotelial

Objetivos del estudio 2:

- i) Estudiar el efecto del extracto de humo de tabaco sobre el sistema ET en células de músculo liso de arteria pulmonar humana
- ii) Estudiar el efecto de bosentan y de inhibidores selectivos de los ETR sobre el efecto deletéreo del extracto de humo de tabaco en células de músculos liso arterial *in vitro* y arterias pulmonares *ex vivo*.
- iii) Estudiar el perfil diferencial de expresión de ETRs en arterias pulmonares de pacientes sanos *versus* pacientes con EPOC

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL

1. PACIENTES

Para el estudio utilizamos tejido periférico de pulmón humano obtenido de pacientes que fueron sometidos a cirugía en el Servicio de Cirugía Torácica del Consorcio Hospital General Universitario de Valencia (CHGUV) al padecer carcinoma pulmonar. Este proyecto fue aprobado previamente por la Comisión de Investigación y el Comité Ético de Investigaciones Clínicas (CEIC) del CHGUV y se obtuvo el consentimiento informado escrito de cada paciente participante. En los anexos I y II se muestra la aprobación de la comisión de investigación del CHGUV (anexo I), y por el CEIC (anexo II).

Ninguno de los pacientes presentaba signos clínicos de hipertensión pulmonar. Durante los días previos a la cirugía se les realizaron pruebas de función pulmonar (espirometría forzada) y gasometría arterial.

En los estudios *in vitro* se incluyeron pacientes asintomáticos no fumadores con función pulmonar normal.

Los pacientes fumadores y pacientes EPOC fueron exclusivamente admitidos para el estudio de la expresión de ETRs en arteria pulmonar.

Las características clínicas de los pacientes se definen en la siguiente tabla:

	No fumadores	Fumadores	EPOC
Pacientes n	6	7	8
Edad (años)	66±5	68±7	67±9
Consumo de Tabaco paquete/año	0	30±3	40±8
VEMS % pred	92±3	90±6	68±8
CVF % pred	94±4	93±8	87±6
VEMS/CVF %	89±5	87±7	63±5
CPT %pred	90±6	88±3	97±4
P _{a,O₂} , mmHg	90±8	85±7	84±6
P _{a,CO₂} mmHg	37±6	39±3	41±3

Tabla 7. Los datos están presentados como mean±SEM. EPOC: Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica; VEMS: Volumen Espiratorio Forzado en 1 s; % pred: % predicho; CVF: Capacidad Vital Forzada ; CPT: Capacidad Pulmonar Total ; P_{a,O₂}: Presión de Oxígeno en sangre arterial; P_{a,CO₂}: Presión de Dióxido de Carbono en sangre arterial. Paquetes/año: 1 año fumando 20 cigarrillos/día.

2. FÁRMACOS UTILIZADOS

En el **primer estudio** planteado en este trabajo se han utilizado diversas herramientas farmacológicas que se representan en la siguiente figura:

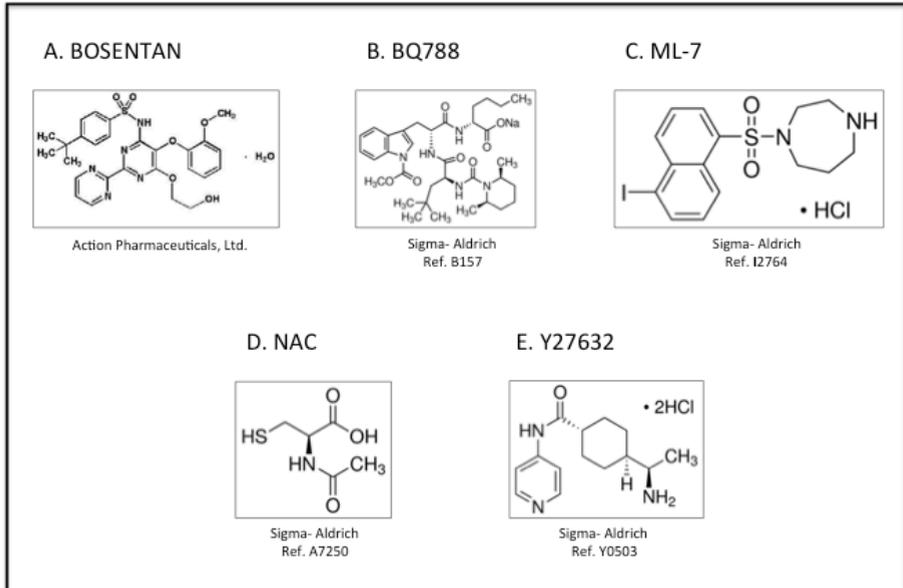


Figura 23. Definición de abreviaturas: Bosentan: Antagonista de receptor de endotelina; BQ788: Antagonista selectivo del receptor de endotelina ET_B; ML-7: Inhibidor selectivo de la quinasa de la cadena ligera de miosina; NAC: N-acetil-L-cisteína; Y27632: Antagonista de la Rho quinasa.

- **Bosentan:**

El Bosentan, es un inhibidor no selectivo de los receptores A y B de la endotelina [229] , con mayor afinidad por el subtipo A. La inhibición de los receptores de ET afecta a las vías intracelulares que median la vasoconstricción y causan vasodilatación. Debidos a que estos receptores se encuentran en concentraciones elevadas en pulmón, los antagonistas de receptores de la endotelina fundamentalmente causan vasodilatación en la vasculatura pulmonar y disminuyen la presión vascular pulmonar. En ensayos controlados

randomizados, el bosentan fue efectivo paliando los síntomas, aumentando la tolerancia al ejercicio y prolongando el tiempo de deterioro clínico en pacientes con Hipertensión Arterial Pulmonar (HPA) idiopática. El Bosentan fue el primer antagonista de receptores de endotelina en ser aprobado en los Estados Unidos por la FDA (*Food and Drug Administration*) en noviembre del 2001, y hoy en día permanece en uso activo. Actualmente está indicado para el tratamiento de la HPA clase III o IV [230].

- **BQ788:**

El BQ788, [N-cis-2,6-dimethylpiperidinocarbonyl-L-gamma-methylleucyl-D-1-methoxycarbonyltryptophanyl-D-norleucine], es un antagonista selectivo del receptor de endotelina subclase B, utilizado habitualmente para demostrar el papel endógeno o exógeno de la ET *in vitro* e *in vivo*.

- **ML-7:**

Hexahydro-1-[(5-iodo-1-naphthalenyl)sulfonyl]-1H-1,4-diazepine hydrochloride. Inhibidor selectivo de la quinasa de la cadena ligera de miosina (MLCK) ($K_i=0,3$ mM). Muestra una inhibición más potente que el compuesto original *ML9 hydrochloride*. Provoca una inhibición reversible ATP-competitiva de Ca^{2+} calmodulina-dependiente y de MLCKs de músculo liso- independiente.

- **N-acetil-L-cisteína (NAC):**

La N-acetil-L-cisteína (NAC) es un agente antioxidante que inhibe el estrés oxidativo, con un efecto sobre el estado redox celular y actuando directamente como un secuestrador de especies reactivas de oxígeno. La NAC previene el aumento en la expresión de citoquinas y quimiocinas inflamatorias mitigando la estimulación de NF- κ B por especies reactivas de oxígeno [231-233]. Además, se ha demostrado que reduce la frecuencia de las exacerbaciones en la EPOC y podría tener un papel en el tratamiento de pacientes con exacerbaciones recurrentes [234].

- **Y27632:**

El, Y-27632, (R)-(+)-trans-4-(1-Aminoethyl)-N-(4-Pyridyl) cyclohexanecarboxamide dihydrochloride) es un inhibidor permeable a células, potente y selectivo de la ROCK (*Rho-associated coiled coil forming protein serine/threonine kinase*). El Y-27632 inhibe tanto a ROCKI ($K_i = 220$ nM) como a ROCKII ($K_i = 300$ nM). Esta inhibición es competitiva respecto al ATP por el lugar de unión [235] .

En el **segundo estudio** planteado a parte de trabajar de nuevo con Bosentan y BQ788, utilizamos nuevas herramientas farmacológicas:

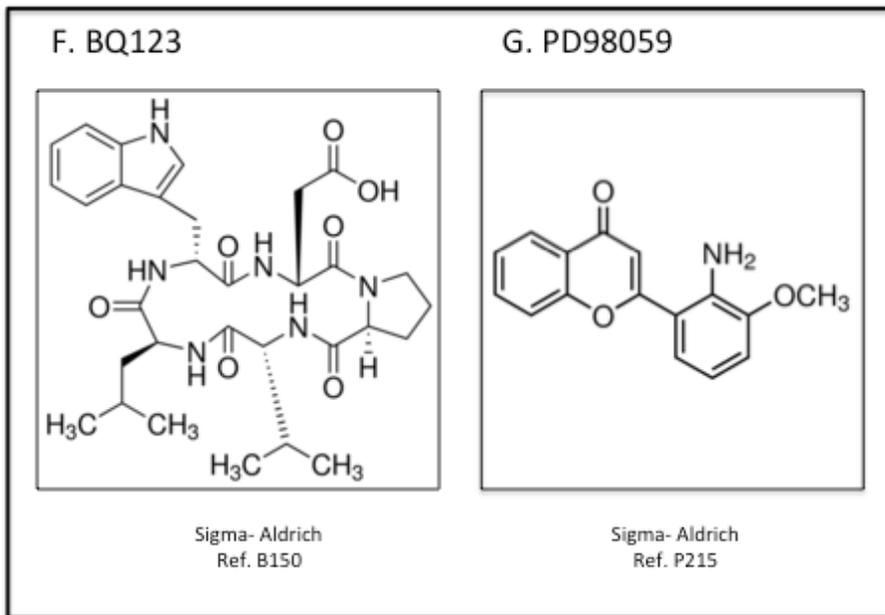


Figura 24 .Definición de abreviaturas: BQ123: Antagonista selectivo del receptor de endotelina tipo A. PD98059: Inhibidor de la MAP quinasa quinasa.

- **BQ123:**

El BQ123 es un potente antagonista selectivo del receptor de endotelina tipo A. También bloquea la movilización de Ca^{2+} , la contracción celular y la activación MAP quinasa.

- **PD98059:**

El PD98059, 2-(2-Amino-3-metoxifenil)-4H-1-benzopirán-4-ona, es un potente inhibidor de la MAP quinasa quinasa, también conocida como MAPK/ERK quinasa o MEK quinasa. Media sus propiedades inhibitorias mediante la unión con ERK específica,

MAP quinasa MEK, por lo que previene la fosforilación de ERK1/2 (p44/p42 MAPK) mediante MEK1/2 [236].

3. ANTICUERPOS Y SONDAS DE PCR

3.1. ANTICUERPOS

Anticuerpo Primario:

- Anticuerpo anti-humano de receptor ET_B de conejo (ref. E9905, Sigma-Aldrich, UK).
- Anticuerpo anti-humano de receptor ET_B (origen:conejo) (ref. sc-33537, Santacruz Biotechnology)
- Anticuerpo anti-humano de receptor ET_A de conejo (ref. E3651, Sigma- Aldrich, UK).
- Anticuerpo anti-humano dipospho MLC (Thr18/Ser19) (origen: conejo), (ref. 3674, Cell signalling).
- Anticuerpo anti-humano MLC (origen:conejo), (ref.3672, Cell signalling).
- Anticuerpo monoclonal anti-humano de RhoA (origen:ratón), (ref. MCA5312Z AbD Serotec, UK).
- Anti-humano β -actina (origen:ratón) (ref. A1978 Sigma-Aldrich).
- Anticuerpo anti-humano p-44/42 MAPK (ERK1/2) (Thr202/Tyr204)(20G11) (origen: conejo), (ref. 4376s, Cell Signalling)

- Anticuerpo anti-humano ERK1/2 p-44/42 MAPK (ERK1/2) (137F5) (origen:conejo), (ref. 4695, Cell Signalling)
- Anticuerpo anti-humano ET-1 (IC4) (origen: ratón) (ref. ab20940, Abcam)

Anticuerpo Secundario:

- Anticuerpo anti-ratón conjugado a HRP (origen:burro), (ref. Thermo Fisher Scientific (SA1-100)).
- Anticuerpo anti-conejo conjugado a HRP (origen:burro), (ref. Thermo Fisher Scientific (SA1-200)).
- Anticuerpo anti-ratón conjugado a rodamina (origen:burro), (ref. Thermo Fisher Scientific (31686)).

3.2. SONDAS

- Receptor Endotelina Tipo B, ThermoFisher Scientific, ref. Hs00240747_m1
- Receptor Endotelina Tipo A, ThermoFisher Scientific, ref. Hs03988672_m1
- GAPD de Ratón (GAPDH) Control Endógeno Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa ,GAPDH, Applied Biosystems, ref. 4352339E
- TRITC conjugado con Faloidina (*Phalloidin-tetramethylrhodamine B isothiocyanate conjugate from Amanita phalloides*), Fluka, Sigma-Aldrich, ref. 77418

4. KITS Y REACTIVOS

Reactivos Utilizados:

REACTIVO	CASA COMERCIAL	REFERENCIA
Acrilamida	Sigma-Aldrich	Ref. A3574
Bicarbonato Sódico (NaHCO ₃)	Sigma-Aldrich	Ref. S5761
BSA (Bovine Serum Albumin)	Invitrogen™	Ref. 15561-020
Cigarros de investigación para EHT	Tobacco Health Research	Ref. 2R4F
Cloruro Cálcico	Panreac	Ref. 141221
Cloruro de magnesio (MgCl ₂).	Panreac	Ref. 141396
Cloruro de Potasio (KCl)	Panreac	Ref. 141494
Cloruro de sodio (NaCl)	Panreac	Ref. 141659
DAPI (4',6- Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride)	Molecular Probes™	Ref. D1306
D(+)- Glucosa	Panreac	Ref. 141341
Deoxyribonuclease I, Alexa Fluor® 488 Conjugate	Thermo Fisher Scientific	Ref. D12371
Dithiothreitol	Sigma-Aldrich	Ref. 43816
DMSO (Dimetilsulfóxido)	Sigma-Aldrich	Ref. 34869
Dodecilsulfato sódico (SDS)	Sigma-Aldrich	Ref. L3771
ECL plus	Amersham GE Healthcare	Ref. RPN2132
EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid)	Sigma-Aldrich	Ref. E6758
Enzima Colagenasa	Gibco, UK	Ref. 17100-017
Filtro "Millex-GS Syringe Driven Filter Unit MCE 0,22 µm"	Millipore	Ref. SLGS033SS
Formaldehido	Sigma-Aldrich	Ref. F8775
Fosfato de potasio (KH ₂ PO ₄)	Sigma- Aldrich	Ref. P-5655
Fosfato disódico (Na ₂ HPO ₄)	Sigma-Aldrich	Ref. RES0971S-A702X
Fungizona™	Sigma-Aldrich	Ref. A2411

Fura-2 acetometil ester	Sigma-Aldrich	Ref. F0888
HBSS (<i>Hank's balanced salt solution</i>) Buffer de corte	Gibco®	Ref. 14025092
HEPES (Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazino etanosulfónico)	Sigma-Aldrich	Ref. H4034
H₂DCF-DA (2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato) Indicador utilizado para monitorizar la generación intracelular de especies reactivas de oxígeno.	Molecular Probes	Ref. C6827
Lonomicina (<i>lonomycin from Streptomyces conglobatus</i>)	Sigma-Aldrich	Ref. I9657
Leche en polvo para bloqueo de membrana de Western Blot	Marvel®	
Lipofectamine®2000 Transfection Reagent	Invitrogen™	Ref. 11668-019
Marcador de peso molecular para Western Blot: Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Prestained Protein Standards	Bio-Rad Laboratories	Ref. 1610375
Mowiol®4-88	Calbiochem	Ref. 475904
O.C.T.™ (Optimum Cutting Temperature Compound)	TissueTek®	Ref. 4583
Phalloidin-TRITC labeled (Isotiocianato de tetrametilrodamina (TRITC) conjugado a faloidina)	Sigma-Aldrich	Ref. 77418
Paraformaldehído 4%	Panreac	Ref.252931
Penicilina-Estreptomina	Sigma-Aldrich	Ref. P-4333
Pepstatin A	Sigma-Aldrich	Ref. 77170
PBS (Tampón fosfato salino)	Sigma-Aldrich	Ref. P-4417
RhoA-targeted siRNA (siARN)	Ambion™, Invitrogen	ID:s758
Sacarosa	Sigma-Aldrich	Ref. 16104
Saponina	Sigma-Aldrich	Ref. 47036
Silencer® Select siRNA (siARN)	Ambion™, Invitrogen	Ref. 4397918
Tampón de lisis para la	Applied Biosystems™	Ref. 4305895

purificación de ácidos nucleicos. (<i>Nucleic Acid Purification Lysis Solution</i>).		
Tripsina	Sigma-Aldrich	Ref. T26000000
TriPure® Isolation Reagent	Roche, Indianapolis, USA)	Ref. 11667157001
Tris Base	Sigma-Aldrich	Ref. 77-86-1
Triton X-100	Panreac	Ref. 142314
Tween20	Sigma-Aldrich	Ref. P-1379

Kits Utilizados:

KITS	CASA COMERCIAL	REFERENCIA
Kit “cell proliferation enzyme-linked immunosorbent assay BrdU kit”	Roche	Ref. 11647229001
Kit “Endothelin EIA kit”	Cayman Chemical	Ref. 583151
Kit “Lactato dehidrogenasa (LDH)”	Cayman Chemical	Ref. 1000882
Kit “Nitric Oxide Assay Kit”	Calbiochem-Novabiochem	Ref. 482650
Kit “RhoA G-LISA Activation Assay Kit (Colorimetric format)”	Cytoskeleton, Inc.	Ref. BK124
Kit “Thromboxane B2 EIA Kit”	Cayman Chemical	Ref. 501020
TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems™	Ref. 4366596

5. MEDIOS DE CULTIVO

MEDIO DE CULTIVO	CASA COMERCIAL	REFERENCIA
Albúmina sérica bovina (BSA)	Sigma-Aldrich	Ref. A7906
DMEM (dulbecco's modified eagle medium)	Lonza	Ref. 12-614Q

EGM™-2 SingleQuot Kit Suppl. & Growth Factors (<i>Endothelial Cell Growth Medium</i>)	Lonza, Clonetics, UK	Ref. CC-4176
Opti-MEM	Invitrogen	Ref. 11058021
PBS (Phosphate buffered saline)	Sigma-Aldrich	Ref. P4417
RPMI-1640 (<i>Roswell Park Memorial Institute</i>)	Lonza	Ref. 12-918F
Suero de Cabra (<i>Goat serum</i>)	Gibco®	Ref. 16210064
SFB (Suero Fetal Bovino)(<i>FBS- fetal bovine serum</i>)	Sigma-Aldrich	Ref. 12133C

6. APARATOS

APARATO	CASA COMERCIAL
ABI Prism™ Nucleic Acid PrepStation	Applied Biosystems™
Bomba de respiración para animales (<i>Harvard Apparatus Model 680 Rodent Respirator</i>)	Harvard Apparatus
Cámara de perfusión de gas	Harvard Apparatus
Cámara digital de alta resolución para microscopio de fluorescencia (CoolSNAP HQ2 CCD)	Photometrics®
Espectrofotómetro microplaca Victor 1420 Multilaber Counter	PerkinElmer®
9800 Fast Thermal Cycler	Applied Biosystems™
7900HT Fast Real-Time PCR System	Applied Biosystems™
Filtro de densidad neutra (nd8)	Nikon Instruments
Filtros de excitación Nikon (340nm, 380nm)	Nikon Instruments
Filtros de emisión Nikon (ancho de banda 510/520nm, 45°, espejo dicotómico 400nm)	Nikon Instruments
Krumdieck Tissue Slicer - Model MD4000	Alabama Research and Development

Lambda 10-2 (Sistema de rueda de filtros para microscopía de fluorescencia)	Sutter Instruments
Lámpara de arco de xenon XBO 100, 100w, 50/60Hz	Nikon Instruments
Microprocesador Pentium III	Intel® Corporation
Microscopio invertido de epifluorescencia Nikon Eclipse TE-200 con objetivo de fluorescencia Nikon Japan S fluor 40x de inmersión, apertura numérica 1.3	Nikon instruments
NanoDrop 2000c Spectrophotometer	NanoDrop®, ThermoScientific
Sistema de Perfusión Multi-válvula	Harvard Apparatus
Válvula de Flujo	Harvard Apparatus

MÉTODOS

1. AISLAMIENTO Y CULTIVO DE CÉLULAS ENDOTELIALES Y MUSCULARES DE ARTERIA PULMONAR HUMANA

Estos experimentos se realizaron siempre en arterias pulmonares de pacientes no fumadores con la finalidad de conseguir un mejor estudio *in vitro* de el humo de tabaco (HT).

1.1. AISLAMIENTO

Para el proceso de aislamiento celular partimos de piezas quirúrgicas humanas obtenidas por resección pulmonar debida a carcinoma de pulmón. De dicha resección seleccionamos tejido no traumático y libre de tumor (tejido sano) del cual se extrajeron las arterias pulmonares que utilizamos para nuestro estudio.

A continuación todo el proceso se llevó a cabo en condiciones de esterilidad con el fin de evitar cualquier tipo de contaminación por agentes externos. Se procedió a la recogida y procesamiento de la muestra en campana de flujo laminar, con material adecuadamente esterilizado y en zonas de cultivo celular asépticas.

El aislamiento mecánico se realizó con bisturís, pinzas mosquito rectas, pinzas Allis, pinzas de disección con garra y tijeras de Metzemabaum.

Una vez tenemos la arteria aislada del resto del tejido pulmonar tomamos segmentos de la misma de 2-3mm de diámetro interno. Abrimos la arteria

cuidadosamente sin tocar la capa interna (endotelio), ya que podríamos dañar las células. Tras la disgregación mecánica se llevó a cabo la disgregación enzimática con un 1% de enzima Colagenasa (Gibco, Reino Unido) en medio de cultivo RPMI-1640 sin Suero Fetal Bovino (SFB) durante 30 minutos a 37°C. La colagenasa hidroliza el colágeno en su formación de triple hélice, liberando fragmentos pequeños de tejidos y células aisladas. Pasado este tiempo neutralizamos la disgregación mediante la adición de medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 suplementado con un 20% de FCS. El homogeneizado se centrifugó a 1200 rpm durante 8 minutos a 4°C.

Eliminamos el sobrenadante y, el pellet resultante de la centrifugación fue resuspendido con *Endothelial Cell Growth Media 2* (EGM-2) complementado con Single Quotes (Clonetics, Reino Unido), FCS al 10%, fungizona al 1% y penicilina/estreptomicina al 2%.

1.2. CULTIVO

Guardamos en el incubador a 37°C y 5% de CO₂, y cada día procedimos a su limpieza (comprobando que se encontraban bien adheridas) con una solución tampón fosfato salino (PBS) durante tres días. Una vez ya hubieron crecido las células cambiamos el medio cada dos días. Para hacer el primer pase nos esperamos a que la confluencia fuese del 50% (aproximadamente una semana).

Después tripsinizamos las células mediante la adición de solución de tripsina (0,25% de tripsina) con el fin de que las células adheridas se desprendan del sustrato.

Para hacer la selección de las CMLAPhs utilizamos la adición de bolas magnéticas impregnadas con anticuerpo CD31 específico para células endoteliales de arteria pulmonar (Dynabeads CD31 endothelial cells[®], Dynal Biotech, Alemania). Para ello la mezcla de células resultantes de la tripsinización se incubaron con los Dynabeads forradas con anticuerpo CD31 durante 30 minutos a 4° C agitándolas suavemente.

En el sobrenadante quedarán las CMLAPhs, mientras que adheridas a los Dynabeads estarán las células endoteliales (CEAPhs).

Tras la incubación, recogimos las CEAPhs usando un concentrador de partículas magnéticas (imán denominado MCP-1; Dynal) y las lavamos cuatro veces con una solución tampón fosfato salino (PBS) / albúmina de suero bovino (BSA).

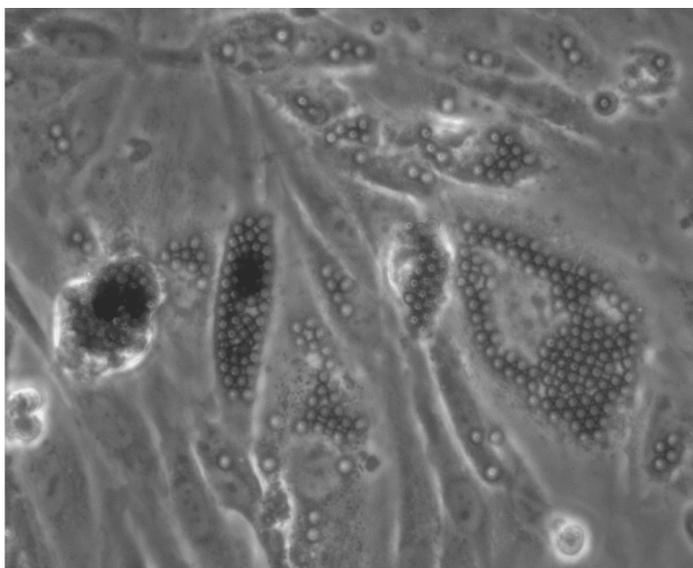


Figura 25. Imagen representativa de células endoteliales de arteria pulmonar humana unidas a bolas magnéticas (Dynabeads) cargadas con anticuerpo anti-CD31 durante el proceso de aislamiento.

Por centrifugación a 1200rpm a temperatura ambiente recogimos las CMLAPHS, que posteriormente fueron cultivadas en medio DEMEM con 10% de suero fetal bovino (SFB), 1% de fungizona, y 2% de estreptomycin/penicilina.

Y por otra parte al quitar el imán MCP-1 las CEAPHs se depositaron en el fondo del tubo, las cuales aislamos por centrifugación a 1200rpm y temperatura ambiente. Posteriormente dichas células fueron cultivadas con medio *Endothelial Cell Growth Media 2* (EGM-2) complementado con Single Quotes (Clonetics, Reino Unido), SFB al 10%, fungizona al 1% y penicilina/estreptomycin al 2%.

2. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE PCR A TIEMPO REAL

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) es una de las herramientas tecnológicas más innovadoras para el estudio de los ácidos nucleicos. Se caracteriza por ser una técnica de alta sensibilidad, reproductividad y eficiencia, que genera resultados fiables en poco tiempo y fáciles de analizar.

Actualmente, sabemos que la misión de la PCR es copiar millones de veces una secuencia específica de ADN mediante una poderosa catálisis llevada a cabo por una enzima conocida como ADN polimerasa, de tal forma que cantidades pequeñas de ADN pueden ser sintetizadas y copiadas fielmente para analizarse con diferentes fines.

El progreso de esta técnica ha sido muy notable; es por ello que una de las formas recientes para detectar y cuantificar a los ácidos nucleicos es a través de la PCR a tiempo real (RT-PCR, ReverseTranscription-PCR), la cual es una modalidad de la PCR considerada como una técnica cuantitativa (mientras que la PCR convencional o también conocida como PCR a punto final, está considerada como una técnica cualitativa).

Por lo tanto, la reacción aprovecha la actividad de la enzima ADN polimerasa, que tiene la capacidad de sintetizar naturalmente el ADN en las células. En la reacción, si usamos como sustrato ADN genómico, entonces típicamente hablamos de una PCR, pero si usamos ácido deoxiribonucleico (ADN) complementario (ADNc) proveniente del ARNm (ácido ribonucleico mensajero) se le conoce como RT-PCR. Esta conversión se logra mediante una reacción conocida como transcripción inversa y controlada por la

enzima transcriptasa inversa, capaz de convertir el ARNm en una molécula de ADNc.

Para poder hacer la RT-PCR primero que nada debemos extraer el ARN en su totalidad a partir de las CMLAPhs y CEAPhs que tenemos cultivadas. Este paso se realizó mediante el uso de Tripure® Isolation Reagent (Roche, Indianapolis, USA).

2.1. EXTRACCIÓN DE ARN A PARTIR DE CÉLULAS DE MÚSCULO LISO DE ARTERIA PULMONAR HUMANA

Una vez transcurrido el tiempo de estimulación, se lisaron las células utilizando el tampón de lisis para la purificación de ácidos nucleicos (Applied Biosystems, Darmstadt, Alemania). El ácido ribonucleico (ARN) total se aisló mediante el sistema de extracción *ABI Prism™ 6100 Nucleic Acid Prep Station* (Applied Biosystems, Darmstadt, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante.

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

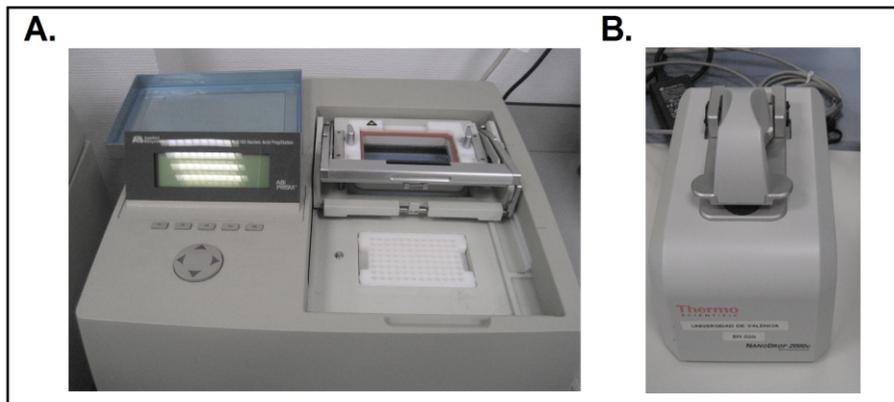


Figura 26. Extracción de ARN total y cuantificación. A. Sistema *ABI Prism TM 6100 Nucleic Acid Prep Station* para la extracción de ácidos nucleicos. B. Espectrofotómetro *NanoDrop 2000C* para la cuantificación de ácidos nucleicos.

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

El siguiente paso fue la síntesis de ADNc a partir del ARN molde extraído.

2.2. RETROTRANSCRIPCIÓN INVERSA

En la reacción de retrotranscripción inversa (RT), la enzima retrotranscriptasa inversa es la encargada de sintetizar ADNc a partir de un ARN molde.

Tomando en consideración la cuantificación del ARN extraído, se transformó un total de 300ng de ARN en ADNc utilizando *Taq Man Reverse Transcription Reagents Kit* (Applied Biosystems, Perkin-Elmer Corporation, CA, EEUU) en un volumen final de 15 μ L. Se realizó este proceso en un termociclador *9800 Fast Thermal Cycler* (Applied Biosystems) con los siguientes pasos: incubación durante 10 minutos a 25 $^{\circ}$ C, ciclo de 30 minutos a 48 $^{\circ}$ C e inactivación de la enzima, durante 5 minutos a 95 $^{\circ}$ C. El ADNc sintetizado se almacenó a -20 $^{\circ}$ C hasta su utilización.

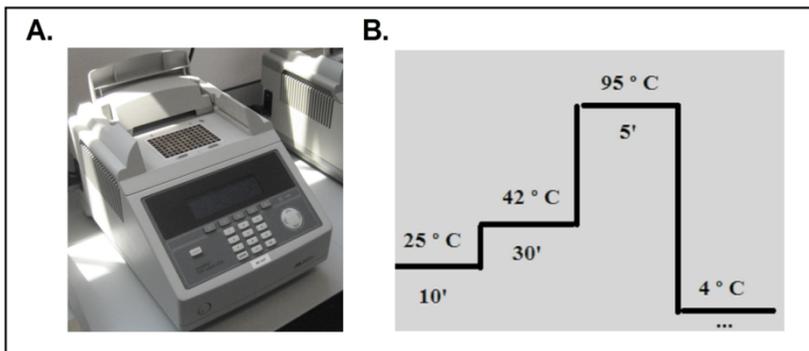


Figura 27. Retrotranscripción inversa. A. Termociclador *9800 Fast Thermal Cycler* para realizar la reacción de retrotranscripción inversa. B. Etapas de la reacción. En la figura se muestran temperaturas ($^{\circ}$ C) y tiempos (minutos) de los distintos pasos de la reacción.

2.3. RT-PCR A TIEMPO REAL

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) consiste en la amplificación selectiva de una región de ADN de interés, utilizando oligonucleótidos como cebadores de la síntesis de ADN. Los cebadores se unen específicamente a secuencias que flanquean la región que se pretende amplificar. La reacción

de amplificación consiste en la repetición de un ciclo integrado por tres etapas:

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

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

La variante denominada PCR 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. Para ello se utilizaron *Ensayos de Expresión Génica TaqMan®*, que son mezclas pre-formuladas de sondas y cebadores específicos para el gen de interés marcadas con fluorocromos. Los reactivos TaqMan utilizan una sonda fluorogénica y la actividad 5' nucleasa de la Taq polimerasa de ADN para detectar un producto de PCR específico a medida que se acumula durante la reacción, tal y como se detalla en la siguiente figura:

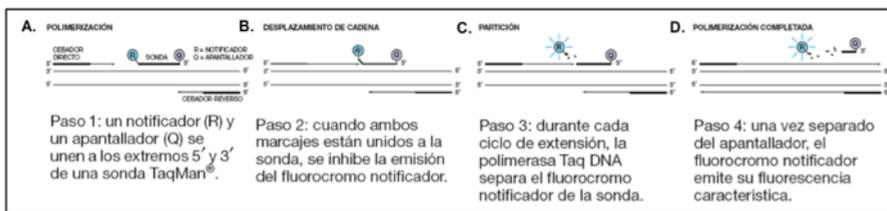


Figura 28. Los reactivos TaqMan utilizan una sonda fluorogénica y la actividad 5' nucleasa de la Taq polimerasa de ADN para detectar un producto específico de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a medida que se acumula durante la reacción (Figura extraída de “Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System: Guía de reactivos” 2006, 2010).

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

Gen	Símbolo del gen	Referencia	Longitud del amplicón (pb)
Receptor Endotelina Tipo B	ET _B	Hs00240747_m1	77
Receptor Endotelina Tipo A	ET _A	Hs03988672_m1	96
GAPD de Ratón (GAPDH) Control Endógeno Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa	GAPDH	4352339E	107

Tabla 8. *Ensayos de Expresión Génica TaqMan®* utilizados en la RT-PCR a tiempo real (Applied Biosystems).

Cada reacción de PCR contenía los siguientes componentes:

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

para alcanzar un volumen final de 10 μL .

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

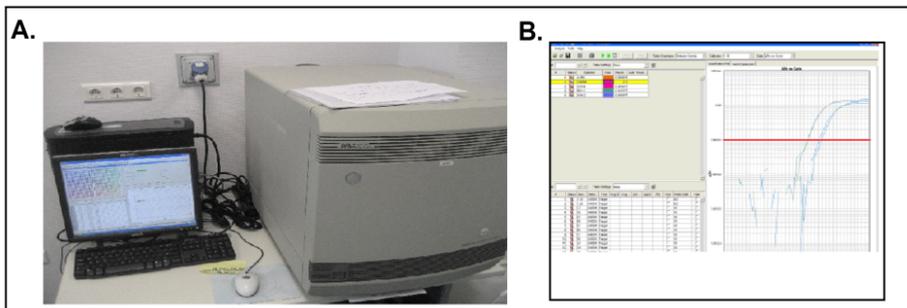


Figura 121. RT-PCR a tiempo real. A. Termociclador *7900HT Fast Real-Time PCR System* para la realización de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real (RT-PCR). B. Software *RQ Manager* utilizado para el análisis de las curvas de amplificación obtenidas y la cuantificación de la expresión génica.

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

retrotranscripción inversa y antes comenzará la amplificación a ser exponencial.

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

En este método se utiliza la siguiente ecuación:

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

Siendo:

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

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

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

El ARN de silenciamiento (siRNA, por sus siglas en inglés *small interfering RNA*), incluyendo el siARN codificado control, fueron adquiridos en Ambion (Huntingdon, Cambridge, UK). El siARN para RhoA (ID: s758) sentido 5'-CACAGUGUUUGAGAACUAUtt-3' y anti sentido 5'-AUAGUUCUCAAACACUGUGgg-3' fueron diseñados también por Ambion.

Las CEAPHs fueron transfectadas con siARN (50nM) en medio libre de suero y antibiótico por un periodo de 6h. Posteriormente el medio fue aspirado y reemplazado por medio con suero por un periodo de 42h antes de los experimentos con el EHT.

El reactivo de transfección utilizado fue la lipofectamina-2000 (Invitrogen, Paisley, UK) a una concentración final de 2µg/ml.

La expresión de ARNm para la transcripción de RhoA fue determinada por RT-PCR a tiempo real después de 48h del post-silenciamiento y comparado con el siARN control al tiempo respectivo para determinar la eficiencia del silenciamiento.

Además, la expresión proteica de RhoA fue medida mediante la técnica de Western blot después de 48h tras el silenciamiento, utilizando un anticuerpo monoclonal comercializado anti-humano RhoA (origen:ratón) (AbD serotec, UK, cat. nº MCA5312Z). La expresión de proteína fue referida a la expresión de β-actina (1:1000, Sigma, USA) como control interno.

Todos los experimentos se hicieron por triplicado.

4. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN PROTEICA MEDIANTE WESTERN BLOT

La extracción de proteínas de CMLAPhs, la de CEAPhs, los cortes de precisión de pulmón humano y los tejidos de arteria pulmonar de pacientes no fumadores, fumadores y pacientes con EPOC fueron probados para ET_B (50 kDa), ET_A (54 kDa), p-ERK1 / 2 (42-44 kD), β-actina (42 kD), RhoA (22kD) y p-MLC (18kD) utilizando inmunodetección mediante la técnica de Western blot, técnica analítica usada para detectar proteínas específicas en una muestra determinada mediante electroforesis en gel.

Para ello las células se rasparon de un matraz confluyente de 25cm² y se lisaron en hielo mediante la adición de un buffer de lisis que consta de cóctel inhibidor completo al que se le adicionó 1mM de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA, Roche Diagnostics Ltd, West Sussex, Reino Unido) con 20mM de base Tris (Sigma-Aldrich), 0,9% cloruro sódico (NaCl, Panreac), 0,1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich), Dithiothreitol 1mM (Sigma-Aldrich) y 1mg/ml de Pepstatina A (Sigma-Aldrich).

Para cuantificar el nivel de proteína en cada muestra y así garantizar la igualdad de carga de las mismas utilizamos el protocolo de Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories Ltd, Herts, Reino Unido) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Con el fin de separar las diferentes proteínas del extracto celular se cargaron un total de 20µg de proteína desnaturalizada por muestra, en un gel de poliacrilamida y sodio dodecil sulfato (SDS/PAGE, por sus siglas en inglés) junto con un marcador de pesos moleculares *Bio-Rad Kaleidoscope* (Bio-Rad Laboratories).

Al gel, formado por un gel de apilamiento (acrilamida al 5%) situado encima de un gel de resolución (acrilamida al 10%), se le aplicó una corriente eléctrica de 100V durante 1h, provocando que las proteínas migrasen a su través.

Posteriormente se transfirieron las proteínas desde el gel a una membrana Difluoruro de Polivinilideno (PVDF, por sus siglas en inglés *Polyvinylidene difluoride*) mediante una electrotransferencia húmeda. La membrana se bloqueó con leche en polvo al 5% en PBS que contiene 0,1% de TWEEN®20 (PBS-T) durante 3h. Transcurrido el bloqueo, se incubó la membrana con el anticuerpo primario correspondiente durante toda la noche (*Overnight*) a 4°C.

Tras la incubación, se lavó la membrana y se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente, conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) (1: 1000) durante 1 hora. Tras los lavados, se utilizó ECL Plus (Amersham GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido), siguiendo las instrucciones del fabricante, para la detección de las proteínas marcadas.

Los anticuerpos primarios y secundarios utilizados se indican en la siguiente Tabla:

Anticuerpo primario		
Nombre	Referencia	Dilución
Anticuerpo anti-humano de receptor ET _B (origen:conejo)	E9905 Sigma-Aldrich, UK	1:1000
Anticuerpo anti-humano de receptor ET _B (origen conejo)	sc-33537 Santacruz biothecnology, California	1:1000

Anticuerpo anti-humano de receptor ET _A (origen conejo)	E3651 Sigma-Aldrich, UK	1:1000
Anticuerpo anti-humano diphospho MLC (Thr18/Ser19) (origen: conejo)	3674 Cell signalling	1:1000
Anticuerpo anti-humano MLC (origen: conejo)	3672 Cell Signalling	1:1000
Anticuerpo anti-humano p-44/42 MAPK (ERK1/2) (Thr202/Tyr204)(20G11) (origen: conejo)	4376s Cell Signalling	1:10000
Anticuerpo anti-humano ERK1/2 p44/42 MAPK (Erk1/2) (137F5) (origen: conejo)	4695 Cell Signalling	1:1000
Anticuerpo monoclonal anti-humano de RhoA (origen: ratón)	MCA5312Z AbD Serotec, UK	1:1000
Anti-humano β-actina (origen: ratón)	A1978 Sigma-Aldrich	1:1000
Anticuerpo secundario		
Nombre	Referencia	Dilución
Anticuerpo anti-ratón conjugado a HRP (origen: burro)	Thermo Scientific (SA1-100)	1:1000
Anticuerpo anti-conejo conjugado a HRP (origen: burro)	Thermo Scientific (SA1-200)	1:1000
Peroxidasa conjugada		1:10000

Tabla 9. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados en ambos estudios. Definición de abreviaturas: MLC (*Myosin Light Chain*): Cadena ligera de miosina. HRP: *Peroxidasa de rábano*. ERK1/2 (*Extracellular signal-regulated kinases 1 and 2*): Quinasas 1 y2 reguladas por señales extracelulares. p-ERK 1/2: *phospho ERK1/2*

La densitometria de las bandas fue realizada empleando el software Imaje J 1.42 (disponible en <http://rsb.info.nih.gov/ij> USA).

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.

5. PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES DE EXTRACTO DE HUMO DE TABACO

El extracto de humo de tabaco utilizado en los experimentos se obtuvo a partir del humo generado por los cigarrillos de investigación (2R4F; Tobacco Health Research, Universidad de Kentucky, KY, EEUU). Para generar dicho humo se introdujo el cigarrillo en una bomba de respiración de animales (Apparatus Rodent Respirator 680; Harvard, Alemania) aplicando un mecanismo que simula la inhalación humana al consumir el cigarrillo (3 bocanadas/minuto; 1 respiración 35 ml; cada bocanada de 2 s de duración y consumiendo el cigarrillo hasta llegar a 0,5 cm por encima del filtro).

El humo de tres cigarrillos, generado mediante este procedimiento, se burbujeó en un matraz con 25 mL de medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) para CMLAPhS y EGM-2 para las CEAPhS precalentado a 37°C. El EHT generado se esterilizó mediante filtrado con un filtro de acetato de celulosa de 0.22 μ m (Corning, NY, EEUU). El extracto obtenido como resultado de este procedimiento fue considerado como 100% de EHT y se utilizó como estímulo en los experimentos dentro de los 30 minutos posteriores a su preparación.

Una dilución al 10% de EHT corresponde aproximadamente a la exposición asociada a fumar dos paquetes de tabaco diarios [237].

La calidad de la solución de EHT preparada se evaluó mediante medida de absorbancia a 320nm, 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 . Y con el fin de probar la citotoxicidad del EHT, se realizó un ensayo de citotoxicidad de lactato deshidrogenasa (Lactate dehydrogenase Cytotoxicity Assay, Cayman, España) para lo cual se trataron los dos tipos celulares con concentraciones de EHT de hasta 10% durante 24 y 48h. No se observaron diferencias significativas en los niveles de lactato deshidrogenasa del sobrenadante en comparación con el grupo control.

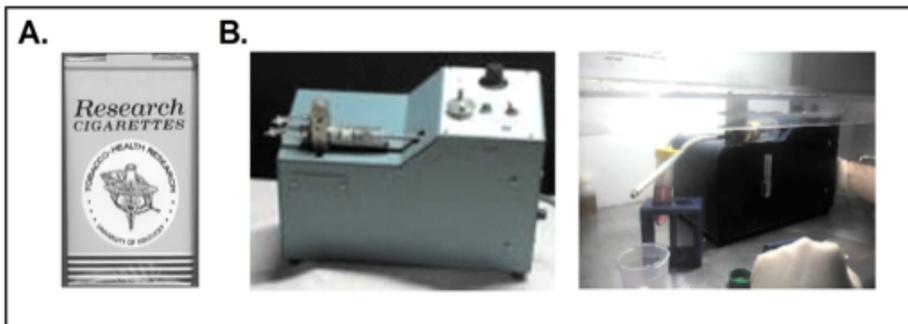


Figura 30. A. Cigarros de investigación 2R4F utilizados en los experimentos. B. Bomba de respiración de animales utilizada para generar el extracto de humo de tabaco (EHT) y burbujearlo en el medio de cultivo.

6. CÁLCULO DE LA CONCENTRACIÓN INTRACELULAR DE CALCIO CON UN MICROSCOPIO DE EPIFLUORESCENCIA NIKON ECLIPSE TE-200

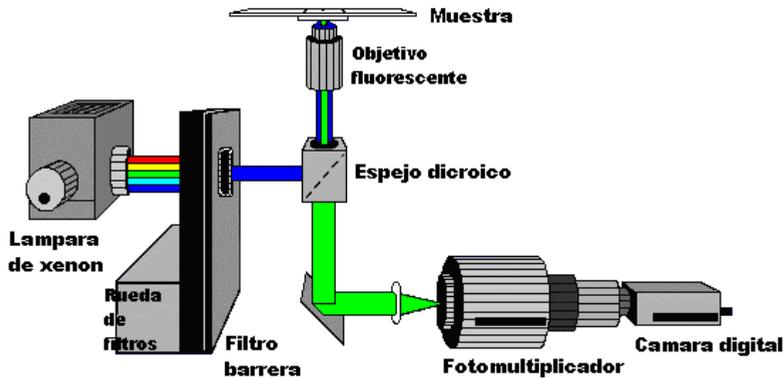
La concentración intracelular de calcio libre ($[Ca^{2+}]_i$) se realizaron con un microscopio invertido de epifluorescencia Nikon Eclipse TE-200 con un objetivo de fluorescencia Nikon Japan S fluor 40x de inmersión con una apertura numérica de 1.3. Se utilizaron filtros de excitación Nikon de 340 nm y de 380 nm acoplados a una rueda de filtros controlada por un sistema Lambda 10-2 (Sutter Instrument, CO).

La fuente de iluminación utilizada fue una lámpara de arco de xenon modelo Nikon XB0 100, con una potencia de 100 w y una frecuencia de radiación de 50/60 Hz.

El filtro de emisión utilizado fue de la marca Nikon con un ancho de banda de 510 nm / 520 nm montado en un ángulo de 45° con un espejo dicroico de 400 nm. Para reducir el fenómeno de fotoblanqueado se utilizó un filtro neutro ND 8.

Para recoger las imágenes de las diferentes muestras se utilizó una cámara digital photometrics CoolSNAP fx acoplada a un fotomultiplicador y a un ordenador Pentium III con sistema operativo windows 2000 profesional.

Tanto la cámara digital, la rueda de filtros y los experimentos realizados fueron controlados por un programa informático Metafluor® versión 5.



Configuración de un microscopio invertido para la realización de imágenes ratiométricas fluorescentes

Figura 31. Esquema del funcionamiento de un microscopio de epifluorescencia con los componentes necesarios para captar imágenes dinámicas de concentraciones de calcio.

Las medidas de calcio se realizaron optimizando primero las condiciones de la cámara digital. Para ello se controló la rueda de filtros de excitación para que cambiase el filtro de 340nm por el de 380nm a una velocidad de 100ms.

Este cambio de excitación se realizó con un obturador de luz o *shuter* para minimizar el tiempo de exposición a la radiación ultravioleta. El tiempo en tomar cada par de imágenes fue de 3 segundos.

La ganancia de la cámara fue de 20Hz para un campo de 1300 x 1030mm. La cámara digital utilizada permitió captar un total de 12bit, correspondiente a un nivel de grises de 0 a 4098. Por otra parte se utilizó un binning de 2x2 para mejorar la relación señal/ruido y así conseguir imágenes más nítidas y con menor ruido de fondo.

Metafluor® también permitió sustraer la señal de fondo de la imagen (*background*) para corregir la luz dispersa y la autofluorescencia.

En las experiencias realizadas se tomaron 3 tipos de imágenes: una imagen correspondiente a la excitación de 340nm, otra correspondiente a la excitación de 380nm y una última imagen correspondiente al ratio entre las dos imágenes anteriores. Esta última imagen ratiométrica se tomó en modo de exposición modulada de intensidad o IMD, la cual presenta una mejor definición de la célula y de sus estructuras así como una diferenciación de la fluorescencia del fondo de la imagen.

Una vez elegidas todas las variables correspondientes a la imagen tomada por la cámara se procedió a preparar los diferentes tipos celulares para realizar las mediciones de calcio.

6.1. PREPARACIÓN MICROSCÓPICA DE LAS CÉLULAS DE MÚSCULO LISO Y LAS CÉLULAS ENDOTELIALES DE ARTERIA PULMONAR HUMANA

Una vez obtenidos los cultivos celulares, del primer al sexto pase, se procedió a tripsinizar las células y a depositarlas sobre cubreobjetos de 22mm depositados a su vez en placas de cultivo celular de 33mm x 10mm.

Se adicionó una cantidad de células tal que presentasen una confluencia del 50% sobre el cubreobjetos.

Una vez transcurridos de 1 a 2 días y depositadas las células sobre el cubreobjetos se cambió el medio de cultivo 24-48 horas antes de la realización de las experiencias adicionando el mismo medio DMEM

suplementado pero sin suero bovino fetal. De esta manera se consiguió que las células estuvieran en el mismo ciclo celular.

Antes de realizar los experimentos se cambió el medio de cultivo por un medio fisiológico de Krebbs (con una composición en mM de: NaCl 137, KCl 5.4, D-glucosa 11, KH_2PO_4 1.47, Na_2HPO_4 2.8, NaHCO_3 1.4, albúmina sérica bovina al 0.25% peso / volumen), realizándose 2 lavados. Posteriormente se adicionó 1ml de medio fisiológico de Krebbs con 5mM de fura-2 acetoximetil éster y se dejó incubar a 37°C durante 35-45 minutos en oscuridad. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se lavaron las células 3 veces con medio fisiológico Krebbs, se cogió el cubreobjetos con las células adheridas y se acopló a la cámara termostatzada a la cual se le adicionó 1ml de medio fisiológico de Krebbs. Se esperó unos 5 minutos a que la solución alcanzase los 37°C y se procedió a la realización de las experiencias.

6.2. MEDIDA Y CALIBRACIÓN DE LAS SEÑALES DE CALCIO INTRACELULAR

La medida y calibración de la señal de calcio intracelular difiere considerablemente de la realizada con un espectrofluorímetro, ya que en este caso consideramos cada célula como un experimento diferente debido a que su comportamiento no siempre es igual que el de las células adyacentes. Así cada célula será analizada por separado seleccionando un campo aleatorio de la preparación. Cada campo escogido presentó una media de 15 células.

Los experimentos se consideraron como válidos en aquellos casos en que la respuesta celular a un estímulo determinado alcanzó al 90% de las células contenidas en el campo visual.

Para realizar la medida de calcio primero se selecciono el campo visual de interés, se ajustaron los niveles de grises y se seleccionaron las células una por una. Posteriormente se seleccionó los tipos de gráficos a analizar y los datos a registrar. En nuestro caso fueron los datos correspondientes a la gráfica de intensidad de emisión fluorescente al excitar a 340nm y a 380nm, la gráfica correspondiente a la representación del ratio entre las intensidades a las longitudes de onda 340 y 380nm. Por otro lado se seleccionaron las imágenes correspondientes a 340nm, a 380nm, y las correspondientes al ratio en formato IMD.

Una vez seleccionadas todas estas opciones en la misma pantalla del ordenador se inició el experimento, esperando de 20-40 segundos hasta visualizar la estabilidad en los niveles de ratio. Posteriormente se adicionó 100ml del estímulo correspondiente y se observó la reacción de las células. Una vez estabilizadas las células tras la adición del estímulo se procedió a la calibración de la medida de calcio, adicionando en primer lugar 100 ml de ionomicina 100mM (un ionóforo de calcio no fluorescente que permite la salida de calcio de los depósitos intracelulares hacia el citoplasma celular y la entrada de calcio extracelular por apertura de canales de la membrana plasmática) suplementada con 100mM de Cl_2Ca [238, 239], que dio lugar a la saturación del indicador fura-2 produciéndose un aumento de intensidad de fluorescencia correspondiente a 340nm y una disminución de la intensidad de fluorescencia correspondiente a 380nm. Una vez estabilizada

la señal fluorescente se procedió a adicionar EDTA 0.5 M el cual penetró en el interior celular desplazó al indicador fura-2 de su unión al calcio y lo queló para producir un mínimo de calcio que se observó en el aumento de intensidad fluorescente correspondiente a 380nm y la disminución en la intensidad fluorescente a 340nm.

Un esquema de los procesos ocurridos al realizar un experimento de medida de calcio intracelular se representa a continuación con los correspondientes gráficos e imágenes.

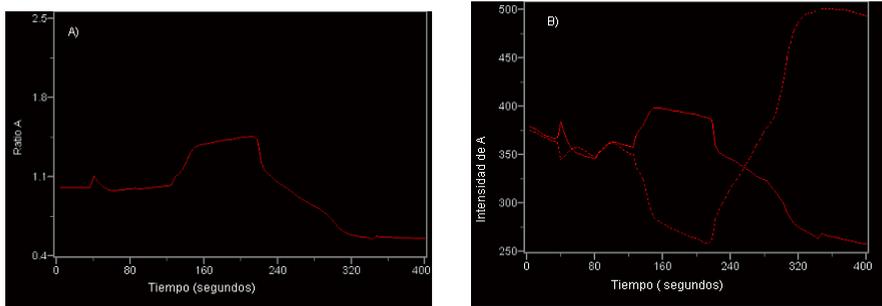
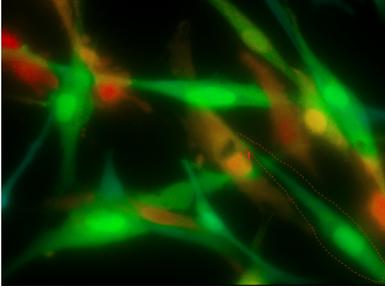


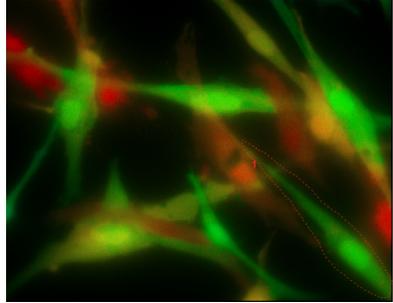
Figura 32. El cuadro A) representa el ratio entre las intensidades de emisión fluorescente correspondientes a longitudes de onda de 340nm / 380nm (ratio A). En el segundo 40 se adicionó como estímulo 100ml de endotelina $5 \cdot 10^{-9}$ M produciéndose un incremento de ratio. Una vez estabilizado el ratio, en el segundo 120 se adicionó 100 ml de ionomicina 100 mM con 100mM de Cl_2Ca , produciéndose un máximo en la concentración de calcio traducido en un máximo de ratio. Posteriormente se adicionó EDTA 0.5M en el segundo 220 produciéndose una disminución del ratio correspondiente a una concentración de calcio igual a cero. El cuadro B) representa en líneas discontinuas la intensidad fluorescente correspondiente a 380 nm y en línea continua la correspondiente a 340 nm, produciéndose aumentos de intensidad al excitar a 340 nm cuando aumenta el calcio citoplasmático y disminuciones de intensidad al excitar a 380 nm cuando aumenta el calcio. Estos datos fueron sacados de células de músculo liso de bronquio humano.

A continuación se muestran las imágenes ratiométricas con la célula seleccionada correspondiente a las gráficas de la figura anterior:

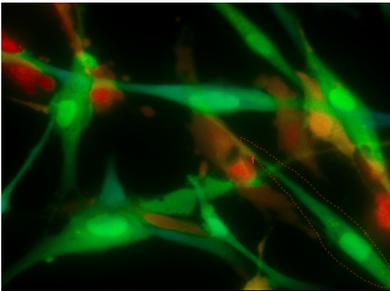
1)



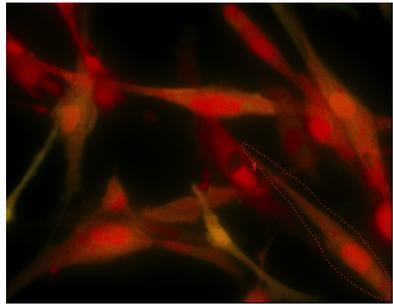
2)



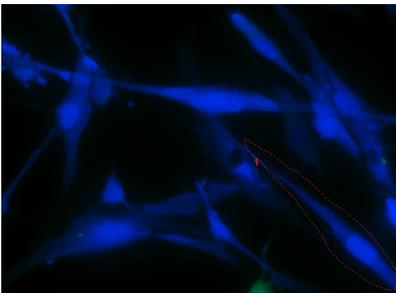
3)



4)



5)





Escala colorimétrica de Ratio

Figura 33. Conjunto de imágenes ratiométricas de células de músculo liso de bronquio humano, correspondientes a niveles basales de calcio (imagen 1) picos de concentración de calcio correspondientes al estímulo con endotelina $5 \cdot 10^{-9}$ M (imagen 2), niveles basales de calcio tras la adición del estímulo (imagen 3), máximos de calcio producidos al calibrar con ionomicina 100mM con 100mM de Cl_2Ca (imagen 4), y niveles mínimos de calcio correspondientes a la calibración con EDTA 0.5M (imagen 5).

Además de las imágenes ratiométricas, Metafluor® presenta imágenes correspondientes a la intensidad de fluorescencia producida al excitar a 340nm y a 380nm:

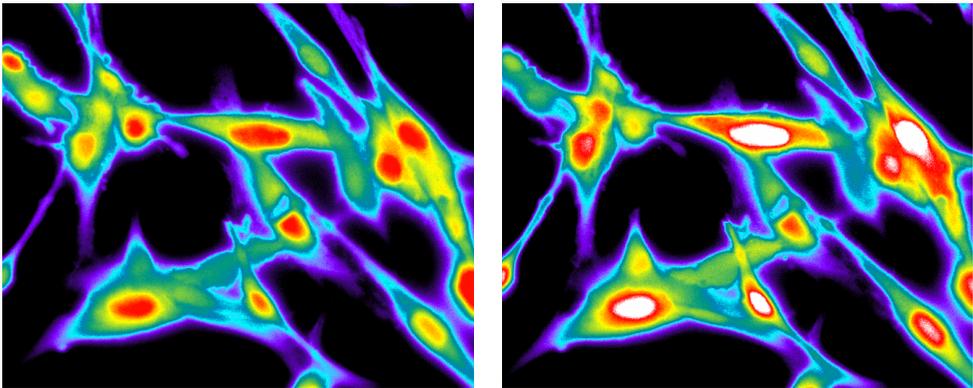


Figura 33. Las células de la imagen de la izquierda se corresponden con una excitación a 340nm. Las células de la imagen de la derecha se corresponden con una excitación a 380 nm. Las imágenes fueron tomadas en el nivel basal de calcio antes de adicionar el estímulo. Las células pertenecen a músculo liso de bronquio humano y fueron tomadas en formato de pseudocolor con una graduación de mínimo de calcio en azul y máximo de calcio en blanco.

Posteriormente se seleccionaron los datos de los ratios a cada tiempo determinado correspondientes a una célula concreta, y aplicando la ecuación de Grynkiewicz [240] para una K_d de 240nM y un cociente de intensidad máxima correspondiente a la excitación a 380nm / intensidad mínima a 380nm igual a 2.34.

La siguiente fórmula se utilizó para convertir la señal de fluorescencia en $[Ca^{2+}]_i$.

$$[Ca^{2+}]_i = b \cdot Kd (R - R_{min} / R_{max} - R)$$

Siendo : R es la relación entre la fluorescencia (F340 / F380) a 340 y 380nm.

b es la relación de 380 intensidades Nm a cero Ca^{2+} sobre maximal Ca^{2+} .

Kd es la constante de disociación a 224nm.

7. CONTRACCIÓN CELULAR

La contracción de CMLAPhs y CEAPhs en respuesta a ET-1 se estudió por tracción microscópica. Se usaron geles de poliacrilamida forrados con colágeno y que a su vez tienen embebidas micro-bolas forradas con fluorescencia de 200nm de diámetro.

Se incubaron discos de gel con las CMLAPhs y CEAPhs cultivadas durante 24h en ausencia de EHT 10% (control) o en presencia del mismo solo o en combinación con Bosentan (10 μ M) (30min antes del CSE), BQ788 (10 μ M),

BQ123 ($10\mu\text{M}$), ML-7 ó Y27632. Posteriormente, se visualizan los discos de gel con las CMLAPhs y CEAPhs cultivadas usando un microscopio de campo brillante. Después de 7 minutos del inicio de la grabación, se añadió ET-1 (10nM), y a los 12 minutos se tomaron las imágenes fluorescentes. Las fuerzas de tracción ejercida por la célula en el sustrato se calcularon a partir del desplazamiento sufrido en el gel sustrato.

Las medidas se realizaron con un $n=10$ de células provenientes de diferentes muestras células-gel para diferentes condiciones.

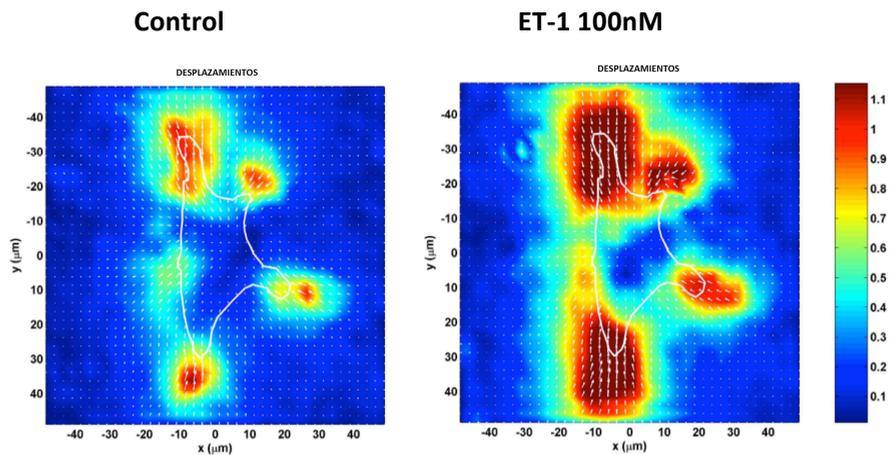


Figura 34. Las fuerzas de tracción ejercida por la célula en el sustrato se calcularon a partir del desplazamiento sufrido en el gel sustrato.

Estos experimentos fueron realizados con la ayuda del Departamento de Biofísica de la Facultad de Medicina de Barcelona.

8. ENSAYO DE PROLIFERACIÓN CELULAR

La proliferación de CMLAPhs se midió mediante técnica de inmunoensayo colorimétrico basado en la incorporación de 5-bromo-2-deoxiuridina (BrdU) durante la síntesis de ADN utilizando el kit *cell proliferation enzyme-linked immunosorbent assay BrdU kit* (Roche, Mannheim, Germany; Catalogue no.11647229001) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

Las células fueron sembradas en con densidad de $3 \cdot 10^3$ células/pocillo en placa de 96 pocillos. Posteriormente se incubaron 24h. Después del tiempo de incubación se expusieron las células a las diferentes condiciones experimentales.

La absorbancia a 490nm se cuantificó usando un Espectrofotómetro microplaca (Victor 1420 Multilabel Counter, PerkinElmer).

Los datos de proliferación hacen referencia a los valores de absorbancia del DNA celular marcado con BrdU por pocillo.

La estimulación está expresada como X-veces la proliferación sobre el crecimiento basal del control sin tratar como unidad.

9. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD Rho

Después de los diferentes tratamientos, medimos la actividad relativa de la *Ras Homolog family member A* (RhoA) de las CMLAPhs y CEAPhs en ayuno de suero mediante un kit de ELISA (*enzyme-linked immun-osorbent assay*) disponible a nivel comercial basado en un ensayo de actividad RhoA (G-LISA; Cytoskeleton, Denver, CO).

El total de las células lisadas se procesó con el protocolo G-LISA usando el buffer de lisis que es proporcionado en el kit. Incubamos dichas células en micropocillos cuya base está forrada con la proteína rotequina. La forma activa de RhoA fue detectada usando inmunodetección indirecta seguida por una reacción colorimétrica medida con absorbancia de 490nm.

10. ENSAYO DE ENDOTELINA

Para medir los niveles de Endotelina utilizamos los sobrenadantes de los cultivos de las CMLAPhs y CEAPhs y utilizamos un kit de ensayo inmunológico enzimático (Endothelin EIA (Enzyme immunoassay) kit ó ET ELISA kit, Cayman Chemical, EE.UU.). El protocolo se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante.

11. ÓXIDO NÍTRICO Y PRODUCCIÓN DE TxA₂

El monóxido de nitrógeno u óxido nítrico (NO , por sus siglas en inglés *Nitric Oxide*) se midió como nitritos en las muestras de sobrenadante de cultivo de CEAPhs mediante el uso de un kit de óxido nítrico disponible comercialmente (Calbiochem-Novabiochem, San Diego, CA) de acuerdo con el protocolo indicado por el fabricante.

El tromboxano A₂ (TxA₂) fue medido como TxB₂ (metabolito inactivo, pero más estable del TxA₂) en el sobrenadante del cultivo de las CEAPhs mediante el kit de inmuno-ensayo enzimático (Cayman chemical, USA) tal y como indica el fabricante en el protocolo del kit.

12. MEDICIÓN POR DCFDA DE LA FLUORESCENCIA DE LAS ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO

El compuesto 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (H_2DCFDA) es un indicador no fluorescente, permeable a las células, que en presencia intracelular de O_2^- y H_2O_2 , sufre un proceso combinado de hidrólisis y oxidación dando lugar al compuesto fluorescente 2',7'-diclorofluoresceína (DCF). Por tanto, esta reacción con H_2DCFDA puede ser utilizada para monitorizar la generación intracelular de especies reactivas de oxígeno.

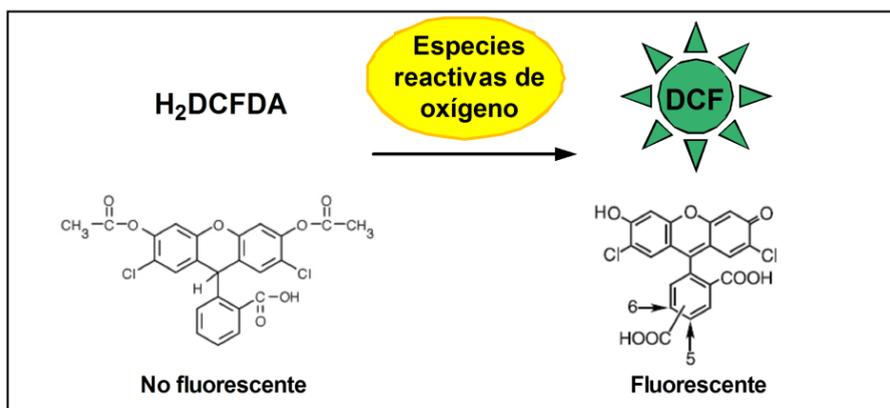


Figura 35. Reacción con H_2DCFDA y DCF para monitorizar la generación intracelular de especies reactivas de oxígeno.

Para cuantificar los niveles de ERO, se sembraron las CMLAPhS y las CEAPhS en placas de 96 pocillos con paredes negras y fondo transparente, se lavaron dos veces con PBS y fueron incubadas durante 30 minutos con 50mM DCFDA diluida en Opti-MEM con 10% de SFB.

Posteriormente las células se trataron con bosentan, BQ788 ó BQ123 durante 30 min. Después de este periodo las células se volvieron a lavar con

PBS dos veces y se les estimuló con EHT al 10% o con ET, y se mantuvieron juntos durante 24 horas.

Al final del período de incubación, las células se lavaron dos veces con PBS y la fluorescencia se midió utilizando un espectrofotómetro de microplacas (Victor 1420 Multilabel Counter, PerkinElmer) con filtro de excitación de 485nm y de emisión de 528nm a intervalos de 5 minutos para un total de 45 minutos. Los resultados se expresaron como DFC fluorescencia en unidades de fluorescencia relativa (RFU) frente a tiempo (minutos).

Las imágenes representativas de cada condición se tomaron a través de microscopía de fluorescencia (x200; Nikon eclipse TE200) con un filtro establecido para isotiocianato de fluoresceína (FITC). La captura y análisis de las imágenes se realizó utilizando el software *Metafluor*[®] 5.0 (Analytical Technologies, EEUU).

13. INMUNOFLUORESCENCIA

13.1 ESTUDIO 1

Las CEAPHs se lavaron tres veces con PBS y se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de otros tres lavados con PBS, las CEAPHs se permeabilizaron con (20mM HEPES pH 7.6, 300mM sacarosa, 50mM NaCl, 3mM MgCl₂, 0.5% Triton X-100, se bloquearon (10% suero de cabra en PBS) y se incubaron con el anticuerpo primario, anti-humano ET_B (1:100, cat. n°: E9905, Sigma) durante toda la noche a 4°C, seguido por el anticuerpo secundario anti-raton rodamina

(1:100, Molecular Probes) y DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride) (2mg/mL) para marcar el núcleo (Molecular Probes, Leiden, The Netherlands). Las células se visualizaron mediante microscopía de epifluorescencia (X200; Nikon eclipse TE200 microscopio invertido, Tokyo, Japan).

13.2. ESTUDIO 2

Se incubaron cortes de precisión de pulmón humano en presencia y ausencia de bosentan, BQ788 o BQ123 durante 1 hora y los estimulados con EHT 10% durante 24h. Tras el periodo de incubación, los cortes se lavaron tres veces con PBS y se fijaron (con un 4% de paraformaldehído, durante 4h a temperatura ambiente).

Posteriormente dichos cortes se incluyeron en el compuesto OCTTM (Tissue-Tek®, Sakura, EE.UU.) y se incubaron con los anticuerpos primarios ET_A Y ET_B seguido por la aplicación del anticuerpo secundario unido a Rodamina. El estudio comparativo de la autofluorescencia de la lámina elástica interna y la lámina elástica externa permitió la distinción entre las células endoteliales y de músculo liso en las pequeñas arterias intrapulmonares.

14. PREPARACIÓN DE CORTES PULMONARES DE PRECISIÓN A PARTIR DE RESECCIONES DE PULMÓN HUMANO

En primer lugar se procedió a pesar y lavar el tejido de unos 3-10g que habíamos obtenido, tal y como se reseña anteriormente, a partir de piezas

quirúrgicas humanas que provenían de resección pulmonar debida a carcinoma de pulmón.

El tejido se lavó 3 veces con 3 volúmenes de solución fisiológica a 4°C (solución salina de Hanks (HBSS) que contenía 100 unidades/ml penicilina y 0.1mg/ml estreptomycin). Inmediatamente antes de la preparación, el tejido fue sumergido en un depósito con HBSS a 4°C para enfriar la pieza en todo su espesor. Posteriormente se inyectó agarosa de bajo punto de fusión al 3% (masa/volumen) a 37°C en estado líquido (Sigma, UK) mediante la utilización de una aguja de calibre fino (NR18, Microlance; BD Biosciences, San Jose, CA). La inyección de las alícuotas de agarosa (de aproximadamente 20µl) se realizó lo más uniformemente posible a través de toda la pieza y se continuo hasta que el total del volumen de agarosa fue de 3 a 4ml/g (peso húmedo del tejido). Posteriormente dejamos la pieza durante unos 15 minutos a 2°C para solidificar la agarosa en el interior del tejido, momento en el que se realizaron cortes de precisión en diferentes planos del mismo usando un microtomo (Krumdieck modelo MD4000; Alabama Investigación, AL) con un grosor de corte fijado en 260 a 300 micras. Los cortes fueron transferidos, en orden de preparación, en placas de cultivo de 12 pocillos que contenían 1ml/pocillo de RPMI (buffer de incubación) con 100 unidades/ml de penicilina, 0,1mg/ml de estreptomycin, y 4mM de L-glutamina). La placa de cultivo se colocó en un dispositivo de brazo oscilante dentro de un incubador humidificante (37°C, 5%CO₂) durante toda la noche (*overnight*). Hicimos cambios del medio a la hora, 3h y 6h, y antes de la incubación *overnight*. Este paso permite que la agarosa se disuelva y salga fuera del corte de pulmón.

Para asegurarnos de que los explantes eran viables, examinamos el epitelio de las vías aéreas mediante la utilización de un microscopio invertido, con el fin de detectar batido ciliar antes de utilizar estos explantes para estudios vasculares. Posteriormente, dichos explantes se inspeccionaron para encontrar vasos que hubieran sido seccionados en plano transversal. Cuidadosamente, elegimos las piezas en el que se encontraron las arterias pequeñas que se encuentran situadas junto a las vías aéreas pequeñas, ya que estas son las que se encuentran implicadas en el proceso de HP. Aproximadamente, el diámetro interno de las arterias no tratadas fue de 200-400 μ m.

Posteriormente, colocamos los cortes elegidos en medio fresco DMEM y se incubaron en presencia o ausencia de Bosentan, BQ788 o BQ123 durante 1 hora antes de la estimulación con o sin EHT 10% durante 24 horas. Utilizamos dos cortes (n=2) por condición en un total de tres pacientes diferentes (p=3).

Cada corte se colocó, de forma individual, en una placa de microscopio con un termostato que la mantiene a 37°C (*Harvard apparatus, USA, cat. nº PH-6D*), acoplada a una cámara de perfusión de gas (5% CO₂) (*Harvard apparatus, cat. nº RC-29*) y sujeta usando un peso de platino y un acople de nylon. Cada corte fue perfundido mediante un sistema de perfusión multi-válvula (*Harvard apparatus; cat. nº VC-66CS*) y controlado con una válvula de flujo (*Harvard apparatus; cat. nº FR-50*) a 0,5ml/min.

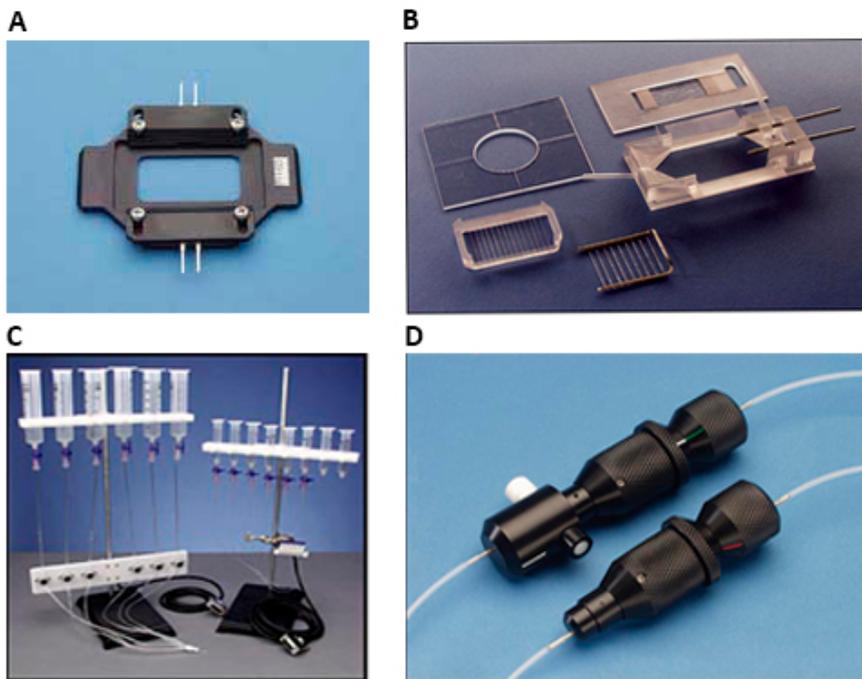


Figura 36. Aparatos utilizados para la preparación de las muestras. A: Plataforma de aluminio anodizado, modelo PH-6D. B: Cámara de perfusión de gas, modelo RC-29. C: Sistema de perfusión multiválvula, modelo VC-66CS. D: Válvula de flujo, modelo FGR-50. (Imágenes obtenidas de Harvard Bioscience, Inc.)

Los cortes se visualizaron usando el microscopio (Nikon Eclipse TE200, ampliación, x40) conectado a una cámara fotométrica CCD CoolSNAPfx .

Seguidamente pasamos a realizar un lavado (30min) con DMEM y procedimos a perfundir KCl 80mM durante 5min a fin de establecer la respuesta máxima contráctil (100%). Después de enjuagar y equilibrar (normalmente 10 minutos de perfusión) se administró la concentración más baja de ET-1 necesaria para obtener respuesta (10^{-9} a 10^{-6} M) .Cada concentración de ET-1 se perfundió durante 5 minutos (tiempo necesario para que el área sea constante).

Se monitorizó de forma continua la contracción de la arteria pulmonar midiendo el área de la luz arterial mediante videomicroscopía y ésta se expresó como porcentaje de la máxima reducción de área obtenida con KCl. Las áreas se midieron al final y antes de comenzar cada concentración de ET-1. El área de la luz arterial se midió utilizando el software MetaMorph (Molecular Devices, EE.UU.) y utilizando unidades de micrómetros cuadrados.

Los resultados se expresaron como porcentaje del área de KCl. El valor de $\log EC_{50}$ y el valor del efecto máximo del fármaco (E_{max}) para cada arteria se obtuvo a partir de una curva dosis-respuesta.

15. TINCIÓN DE ACTINA

Las CEAPHs de no fumadores, fumadores y pacientes EPOC se lavaron tres veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se fijaron con una solución de formaldehído-PBS 3,7% durante 10min a temperatura ambiente. Después de dos lavados adicionales con PBS, las células se permeabilizaron con una solución de 0,1% de Triton X-100 en PBS durante 3-5min y las volvimos a lavar de nuevo con PBS. Se utilizó isotiocianato de tetrametilrodamina (TRITC) conjugado a faloidina (0,2 μ g/mL) y Alexa Fluor 488 conjugado con DNasa I (9mg/ml) para localizar F-actina y G-actina, respectivamente. El marcaje fluorescente utilizado se diluyó en una solución de bloqueo (1% BSA y 0,025% saponina en PBS) y se adicionó a los cubreobjetos durante 40 minutos a temperatura ambiente. Tras 3 lavados con PBS se procedió al montaje de los cubreobjetos en un portaobjetos de

microscopía con el medio de montaje Mowiol (Mowiol; Calbiochem, La Jolla, CA).

El ratio de intensidad de fluorescencia de F-actina-G-actina fue cuantificado usando campos que contienen >30 células fotografiadas con un microscopio de fluorescencia invertido (Eclipse TE200, Nikon) y una cámara de 12 bits de resolución (fotometría CoolSNAPfx) y con un aumento de x10. El tiempo de adquisición y aumento de intensidad de la imagen se ajustó de forma óptima y se mantuvo constante para todos los experimentos con el software Metafluor® 5.0.

RESULTADOS

ESTUDIO I

LA EXPOSICIÓN AL HUMO DE TABACO PROVOCA LA SOBRE-EXPRESIÓN DEL RECEPTOR DE ENDOTELINA B EN CÉLULAS ENDOTELIALES DE ARTERIA PULMONAR HUMANA: CONSECUENCIAS MOLECULARES Y FUNCIONALES.

1. BOSENTAN INHIBE LA EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES DE ENDOTELINA B INDUCIDA POR EL HUMO DE TABACO EN CÉLULAS ENDOTELIALES DE ARTERIA PULMONAR HUMANA

El extracto de humo de tabaco incrementó de forma concentración-dependiente la expresión de proteína y el ARNm del receptor ET_B tras un periodo de 24h de incubación (Figura 37A).

Observamos también como la sobre expresión de receptores ET_B inducida por el EHT fue inhibida por el Bosentan de forma concentración-dependiente (10nM-10μM; Figura 37B), alcanzando significación estadística a 100nM (figura 1B, p<0,05 frente a EHT 10%).

Además, el antagonista selectivo del receptor ET_B BQ788 también redujo, de manera concentración-dependiente, la sobre expresión de receptor ET_B (10nM- 10μM; Figura 37C), sugiriendo un mecanismo de retroalimentación positiva mediado vía receptores ET_B.

Estos resultados se confirmaron al hacer una inmunofluorescencia con un anticuerpo para el receptor ET_B (Figura 37D). La incubación sólo con Bosentan o BQ788 no mostró ningún efecto en la expresión basal de receptor ET_B.

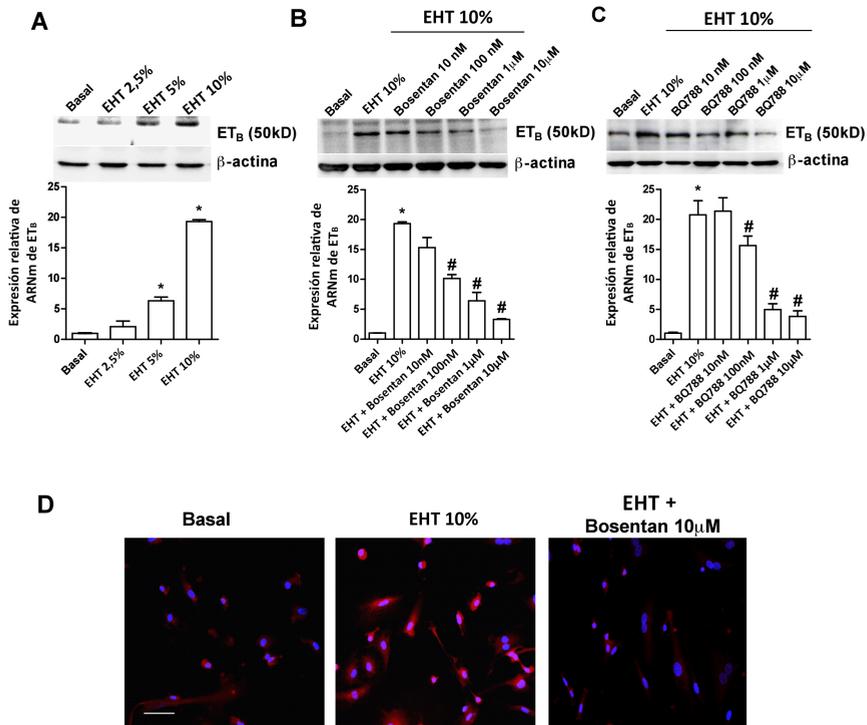


Figura 37. La expresión de receptor de endotelina B (ET_B) inducida por el extracto de humo de tabaco (EHT) en células endoteliales de arteria pulmonar humana (CEAPHs) es atenuada por la adición de bosentan. Las CEAPHs fueron incubadas con diferentes concentraciones de EHT por un periodo de 24h. (A) Posteriormente, el ácido ribonucleico mensajero (ARNm) y proteínas para receptores ET_B fueron cuantificadas mediante RT-PCR a tiempo real y Western blot respectivamente. (B, C) Se incubaron las CEAPHs con bosentan (10nM–10 µM) o BQ788 (10nM–10µM) durante 1h, antes de adicionar el EHT. Bosentan y BQ788 atenuaron de forma dosis-dependiente la expresión de ARNm y de proteínas de receptor ET_B, tal y como se había medido mediante RT-PCR a tiempo real y Western blot. (D) La inmunofluorescencia realizada para receptores de ET_B mostraron un incremento de la expresión de dicho receptor (color rojo) en células expuestas a EHT, lo cual fue impedido con Bosentan (el color azul-DAPI representa los núcleos). Escala: 10µm. Los resultados se expresan como media±EEM (siendo EEM el Error Estándar de la Media) para los cuatro experimentos diferentes de tres pacientes diferentes por condición.*p < 0.05 frente a condiciones basales; #p < 0.05 frente a EHT 10%.

Para esclarecer más a fondo el mecanismo implicado en la sobre-expresión de ET_B inducida por el EHT, medimos la cantidad de ET en el sobrenadante de los cultivos celulares.

El EHT produjo una liberación de ET de forma concentración-dependiente, alcanzando una máxima liberación a concentraciones de 5%-10% (Figura 38A) ($p < 0,05$ frente a condiciones basales).

Además, la adición de un anticuerpo monoclonal (mAb) anti-ET-1 (10 μ g/mL), redujo significativamente la sobre-expresión de receptores ET_B inducidos por el EHT sugiriendo que la ET-1 liberada por la acción del EHT estaba implicada en este proceso (Figura 38B) ($p < 0,05$ frente a EHT 10%).

También resultó interesante comprobar que la adición de ET-1 exógena aumentó la expresión de ET_B de forma concentración-dependiente (100pM-100nM) (Figura 38C).

Estos resultados demuestran que el EHT provoca la sobre-expresión de ET_B por un mecanismo que implica, al menos en parte, la liberación e interacción de la ET-1 con sus receptores.

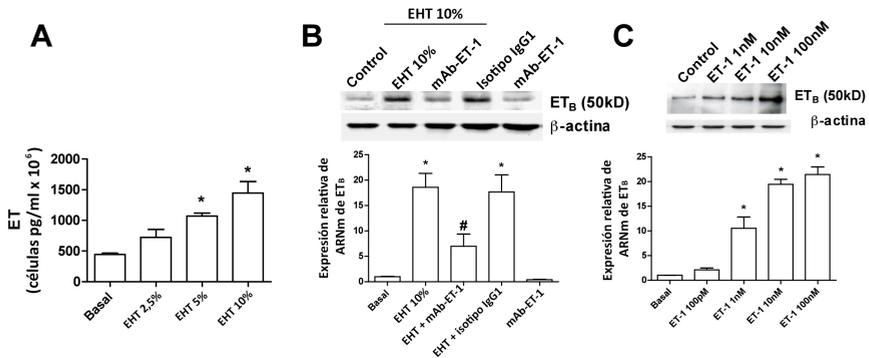


Figura 38. La sobre expresión de receptor de endotelina B (ET_B) inducida por el extracto de

humo de tabaco (EHT) está parcialmente mediada por la endotelina (ET) en el sobrenadante de cultivo celular. (A) El EHT produce una liberación dosis-dependiente de ET al sobrenadante del cultivo celular tras 24h de exposición al EHT. (B) La sobre expresión de receptor ET_B inducida por el EHT fue parcialmente inhibida por un anticuerpo monoclonal (mAb) unido a ET-1 (10 µg·mL⁻¹) y no por el isotipo control IgG1 (10µg·mL⁻¹). (C) Además, la incubación de células endoteliales de arteria pulmonar humana (CEAPHs) con ET-1 por un periodo de 24h aumentó de forma dosis-dependiente la expresión de ácido ribonucleico mensajero (ARNm) y proteína del receptor ET_B. Los resultados se expresan como media±EEM (siendo EEM el Error Estándar de la Media) para los cuatro experimentos diferentes de tres pacientes diferentes por condición.*p< 0.05 frente a condiciones basales; #p < 0.05 frente a EHT 10%.

2. LA SOBRE EXPRESIÓN DE RECEPTORES DE ENDOTELINA B INDUCIDA POR EL EXTRACTO DE HUMO DE TABACO ESTÁ PARCIALMENTE MEDIADA POR LA ACTIVACIÓN DE RECEPTORES DE ENDOTELINA B , Rho QUINASA Y POR LAS ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO

Ya que el EHT es conocido por promover la activación de Rho, MCLK (miosina cadena ligera quinasa) y la producción de ERO, decidimos estudiar el efecto de estos mediadores sobre expresión de receptores ET_B inducidos por el EHT.

El inhibidor de Rho quinasa, Y27632 (10µM), y el antioxidante NAC (1mM) revirtieron de forma efectiva la estimulación inducida por EHT del ARNm y proteína de los receptores ET_B. Por el contrario, el inhibidor selectivo de la MCLK, ML-7, no mostró ningún efecto significativo (Figura 39A).

Cuando utilizamos la ET-1 (10nM) para inducir la expresión del receptor ET_B, bosentan (10µM), BQ788 (1µM), Y27632 (10µM) y el antioxidante NAC (1mM) inhibieron parcialmente la sobre-expresión de dicho receptor, mientras que ML-7 no lo hizo (Figura 39B). Esto sugiere que la ET-1 juega un papel importante en la sobre-expresión del receptor ET_B inducida por el

EHT.

En otros experimentos exploramos la posible suma de efectos de bosentan, Y27632 y NAC. Para ello seleccionamos concentraciones de bosentan (100nM), Y27632 (1 μ M) y NAC (100 μ M), los cuales causaron aproximadamente el 50% de inhibición del efecto máximo del EHT (Figura 39C). La combinación de estos tres inhibidores mostraron un efecto aditivo reduciendo la sobre-expresión del receptor ET_B (figura 39C) ($p < 0,05$ frente a grupos bosentan, Y27632 y NAC).

Con el fin de investigar más a fondo el papel de RhoA en nuestro modelo, suprimimos selectivamente el ARN de RhoA. El siARN para RhoA produjo una marcada inhibición de la expresión de ARNm y proteínas tras 48h de exposición a siARN-RhoA 50nM (Figura 39D) ($p < 0,05$ frente a control de siARN). Este tratamiento también frenó la sobre expresión de receptores ET_B inducida por el EHT, confirmando los resultados observados con Y27632 (10 μ M) (Figura 39E) ($p < 0,05$ frente a control siARN más EHT 10%).

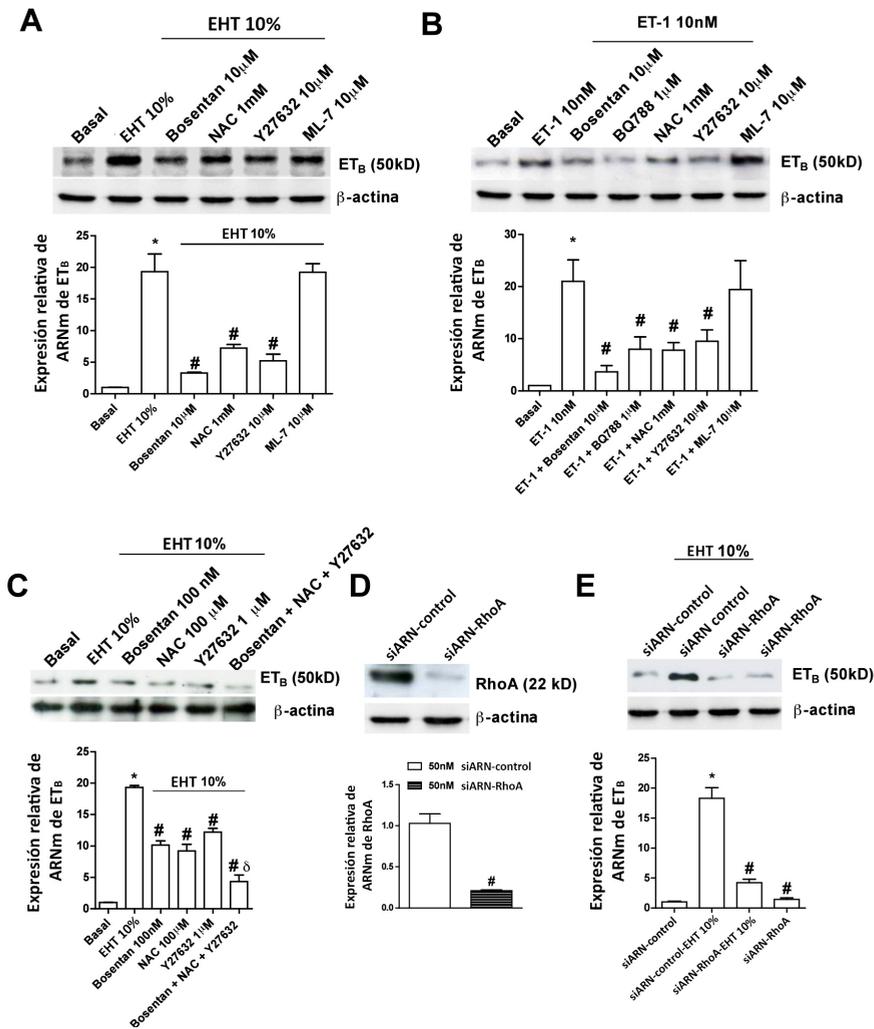


Figura 39. La sobre expresión de receptor de endotelina B (ET_B) inducida por el extracto de humo de tabaco (EHT) es atenuada por el bloqueo de los receptores ET_B, y por la inhibición de Rho quinasa y especies reactivas de oxígeno (ERO). (A) Las células endoteliales de arteria pulmonar humana (CEAPHs) fueron incubadas con bosentan, Y27632, NAC o ML-7 durante 1h anteriormente a la adición de EHT 10%. Tras 24h de incubación, se cuantificó el ácido ribonucleico mensajero (ARNm) y las proteínas del receptor ET_B mediante RT-PCR a tiempo real y Western blot respectivamente. (B) Las CEAPHs se incubaron con bosentan, BQ788, Y27632, NAC o ML-7 por periodo de 1 h antes de la adición de ET-1 (10nM). Tras 24h de

incubación, se cuantificó el ARNm y proteínas del receptor ET_B. (C) Los efectos aditivos de bosentan, Y27632 y NAC, a concentraciones efectivas que causaron ~50% de inhibición que el EHT, mostraron efecto aditivo reduciendo la sobre-expresión de receptor ET_B. (D) El ácido ribonucleico de silenciamiento (siARN) específico de RhoA suprimió de forma eficaz la expresión de mRNA y proteínas de RhoA en CEAPhs. (E) siARN-RhoA suprimieron la sobre expresión de receptores ET_B en CEAPhs inducidos por el EHT (mostrado como expresión de ARNm y proteína), comparado con células transfectadas con un control negativo de siARN. Los resultados se expresan como media±EEM (siendo EEM el Error Estándar de la Media) para los tres experimentos diferentes de tres pacientes diferentes por condición.*p< 0.05 frente a control; #p < 0.05 frente a EHT 10%.

3. LA EXPOSICIÓN DE LAS CÉLULAS ENDOTELIALES DE ARTERIA PULMONAR HUMANA AL EXTRACTO DE HUMO DE TABACO AUMENTA LA SENSIBILIDAD DEL [Ca²⁺]_i AL ESTÍMULO ET-1

El [Ca²⁺]_i modula muchos procesos celulares como la contracción y permeabilidad, proliferación e inflamación de células endoteliales [241]. Sabiendo que el EHT aumenta la expresión de receptor ET_B, decidimos investigar los efectos de una exposición aguda a ET-1 sobre el [Ca²⁺]_i en CEAPhs pre-tratadas durante 24h con y sin EHT en presencia o ausencia de bosentan (10μM) o BQ788 (1μM).

Los experimentos preliminares mostraron que la ET-1 aumenta la [Ca²⁺]_i en CEAPhs de forma dosis-dependiente (-logEC₅₀= 7,62±0,06). Debido a estos resultados, en los experimentos ulteriores utilizamos una concentración de ET-1 de 10nM.

Al estimular la CEAPhs con EHT (10%) por un periodo de 24h se observó un nivel basal de [Ca²⁺]_i de 120±5nM, valor significativamente mayor que el observado por células no estimuladas (nivel basal de [Ca²⁺]_i de 93±3nM; p<0,05). Además, la estimulación con ET-1 (10nM, durante 3-4 minutos)

aumentó el $[Ca^{2+}]_i$ (mostrado como $\Delta[Ca^{2+}]_i$) en células tratadas con EHT en mayor proporción que en las células no tratadas ($p < 0,05$) (Figuras 40A y 40B, y Tabla 10).

En otros experimentos, se añadió bosentan (0,1-10 μ M) o BQ788 (1 μ M) 1h antes de la incubación con EHT al 10% durante 24 h.

Bajo estas condiciones el bosentan (1-10 μ M) y BQ788 (1 μ M) redujeron significativamente el efecto de la posterior estimulación con ET-1 exógena sobre el $[Ca^{2+}]_i$. (Figuras 40A y 40B, y Tabla 10) ($p < 0,05$).

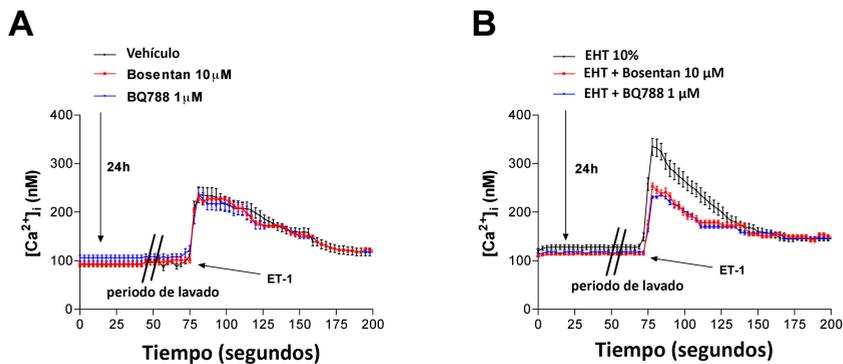


Figura 40. La exposición de las células endoteliales de arteria pulmonar humana (CEAPHs) al extracto de humo de tabaco (EHT) por un periodo de 24h incrementa el aumento de $[Ca^{2+}]_i$ inducido por ET-1. (A) Las CEAPHs fueron expuestas a vehículo, bosentan o BQ778 durante 24 h. Posteriormente, las células fueron lavadas tres veces con tampón fosfato salino (PBS por sus siglas en inglés, *phosphate buffered saline*) e incubadas con Fura 2AM. El incremento de $[Ca^{2+}]_i$ tras la estimulación aguda con endotelina-1 (ET-1) (10nM), fue la misma para cada una de las condiciones. (B) Las CEAPHs fueron expuestas a 10% de EHT, en presencia o ausencia de bosentan o BQ778 durante 24 h. Tras este periodo, las células fueron lavadas tres veces con PBS e incubadas con Fura 2AM. El incremento de $[Ca^{2+}]_i$ tras la estimulación aguda con ET-1 (10nM) fue mayor en las células expuestas al EHT 10%. Los resultados están expresados como media \pm EEM (siendo EEM el Error Estándar de la Media) de $[Ca^{2+}]_i$ nM en 12 células por experimento en un total de cuatro experimentos por

condición. * $p < 0,05$ frente control; # $p < 0,05$ frente EHT 10%.

Pretratamiento 24h	Estimulación aguda con ET-1 $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ (nM)	ABC $[[\text{Ca}^{2+}]_i$ (nM) x segundos]
Control	143 \pm 6	20730 \pm 997
EHT 10%	215 \pm 13*	25056 \pm 994*
Bosentan 10 μ M + EHT 10%	133 \pm 11 [#]	20221 \pm 803 [#]
Bosentan 1 μ M + EHT 10%	154 \pm 8 [#]	21311 \pm 925 [#]
Bosentan 0,1 μ M + EHT 10%	201 \pm 12	24311 \pm 1032
BQ788 1 μ M + EHT 10%	144 \pm 7 [#]	20855 \pm 1090 [#]
Bosentan 10 μ M	135 \pm 6	20337 \pm 1175
BQ788 1 μ M	132 \pm 16	20968 \pm 488

Tabla 10. La exposición de células endoteliales de arteria pulmonar humana (CEAPHs) al extracto de humo de tabaco (EHT) por un periodo de 24h incrementa el aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducido por una estimulación aguda con endotelina-1 (ET-1) exógena. Las CEAPHs fueron incubadas durante 24h en presencia y ausencia de EHT 10%, bosentan, BQ788 y sus diferentes combinaciones. Después de 24h, el medio de cultivo se desechó y las células fueron lavadas tres veces con tampón fosfato salino (PBS por sus siglas en inglés, *phosphate buffered saline*). Posteriormente se les añadió Fura 2AM y el $[\text{Ca}^{2+}]_i$ fue monitorizado tras la estimulación con ET-1 (10nM). Los resultados están expresados como media \pm EEM (siendo EEM el Error Estándar de la Media) del incremento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ($\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$; nM) o área bajo la curva (ABC; nM x segundos) de $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ en 12 células por experimento en un total de 4 experimentos por condición. * $p < 0,05$ frente a control; # $p < 0,05$ frente a EHT 10%.

4. LA ENDOTELINA-1 AUMENTA LA CONTRACCIÓN CELULAR Y EL DESEQUILIBRIO F/G-ACTINA EN CÉLULAS ENDOTELIALES DE ARTERIA PULMONAR HUMANA PRETRATADAS CON EXTRACTO DE HUMO DE TABACO

Con el fin de evaluar si el aumento de sensibilidad a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducida por la

ET-1 se traducía en una contracción celular, utilizamos la técnica microscópica de tracción. La ET-1 (10nM) produjo un aumento rápido y prolongado de la contracción celular, que fue significativamente mayor en aquellas células que fueron expuestas al EHT (10%) durante 24h frente a las que no fueron expuestas al mismo (Figura 41A)($p < 0,05$). Además, aquellas células que fueron pre-tratadas con el EHT en presencia de bosentan (10 μ M), BQ788 (1 μ M), Y27632 (10 μ M) o ML-7 reprimieron su contracción hasta prácticamente los niveles de control (Figura 41A). La reestructuración del citoesqueleto es un marcador directo de la contracción celular y la polimerización de las fibras solubles de G- a fibras polimerizadas de F-actina es parte de esta reestructuración [242].

El valor de ratio de fluorescencia de F/G-actina de las CEAPs que fueron expuestas a EHT 10% durante 24h no fue diferente de el de aquellas células que no fueron tratadas con él (Figura 41B). Por el contrario, las células tratadas con EHT mostraron un aumento del ratio F/G-actina en respuesta a una estimulación aguda con ET-1 (10nM; 30min) (Figura 41C) ($p < 0,05$). La adición de bosentan (0,1-10 μ M), BQ788 (1 μ M), Y27632 (10 μ M) o ML-7 (10 μ M) 1h antes de adicionar el EHT (10%) redujo significativamente el aumento del ratio de F/G-actina inducido por ET-1 (Figura 41C) ($p < 0,05$ frente a EHT).

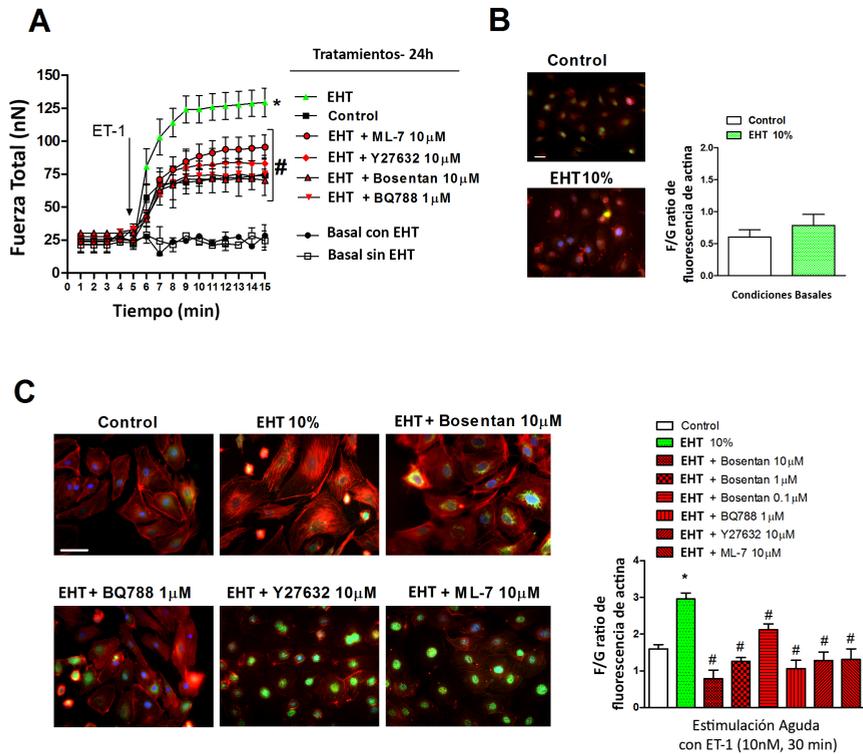


Figura 42. La endotelina-1 (ET-1) incrementa la contracción celular y el desequilibrio F/G-actina en células endoteliales de arteria pulmonar humana (CEAPHS) pre-tratadas con extracto de humo de tabaco (EHT). (A) Las CEAPHS cultivadas fueron incubadas durante 24h en ausencia (control) o presencia de EHT (10%) sólo o en combinación (1h antes del EHT) con bosentan, BQ788, ML-7 o Y27632. Posteriormente, el disco con el gel que contiene las CEAPHS cultivadas fue situado en el microscopio y las células fueron captadas con un campo luminoso. La gráfica muestra el transcurso de la respuesta contráctil de las CEAPHS estimuladas con ET-1 (10 nM). Los valores están expresados como el total de fuerza ejercida por la célula en el sustrato. (B) Las CEAPHS fueron tratadas en presencia o ausencia de EHT por un periodo de 24h. Posteriormente, las células fueron fijadas con formaldehído 3,7%, y Phalloidin-TRITC y Alexa Fluor 488 DNasa I conjugada se añadieron para marcar F- y G-actina respectivamente. Se añadió DAPI para marcar los núcleos celulares. Las imágenes representan el teñido de F-actina (color rojo) y G-actina (color verde), y la gráfica muestra el ratio de fluorescencia basal F/G-actina tras estas condiciones experimentales. (C) En otros experimentos, se añadió al cultivo celular bosentan, BQ788, Y27632 o ML-7 1h antes que el EHT. Tras 24h de incubación, las células fueron lavadas tres veces con tampón fosfato salino (PBS por sus siglas en inglés, *phosphate buffered saline*) y estimuladas con ET-1 (10nM)

durante 30 minutos. Posteriormente, las células fueron tratadas para marcar F- y G-actina. Se añadió DAPI con el fin de marcar los núcleos celulares (color azul). Las imágenes de CEAPHs muestran experimentos representativos bajo estas condiciones experimentales. Escala: 10 μ m. La gráfica muestra la media \pm EEM (siendo EEM el Error Estándar de la Media) de la intensidad de fluorescencia de la F-actina (rojo) frente a G-actina (verde) en un total de tres experimentos diferentes de tres pacientes diferentes por condición.* $p < 0,05$ frente control; # $p < 0,05$ frente EHT.

Debido a que Y27632 y ML-7 atenúan los efectos del EHT en la contracción celular inducida por ET-1, exploramos la activación de RhoA y la fosforilación de MLC en aquellas células que fueron expuestas al EHT. En CEAPHs, la actividad basal de RhoA y la fosforilación de MLC no se vio afectada por el EHT (10%; 24h) (Figura 43A y 43B). A pesar de ello, la ET-1 exógena (10nM, 30min.) aumentó más la actividad RhoA en células expuestas al EHT que en aquellas que no habían estado expuestas al mismo (Figura 43C) ($p < 0,05$). Además, cuando bosentan (1 y 10 μ M), BQ788 (1 μ M) y Y27632 (10 μ M) fueron añadidos antes del EHT (24h), la actividad RhoA inducida por ET-1 decreció (Figura 43C) ($p < 0,05$ frente a EHT). De la misma manera, el EHT (10%) aumentó el efecto de ET-1 en la fosforilación MLC, y este efecto fue atenuado por bosentan (10 μ M), BQ788 (1 μ M), Y27632 (10 μ M) o ML-7 (10 μ M) (Figura 43D).

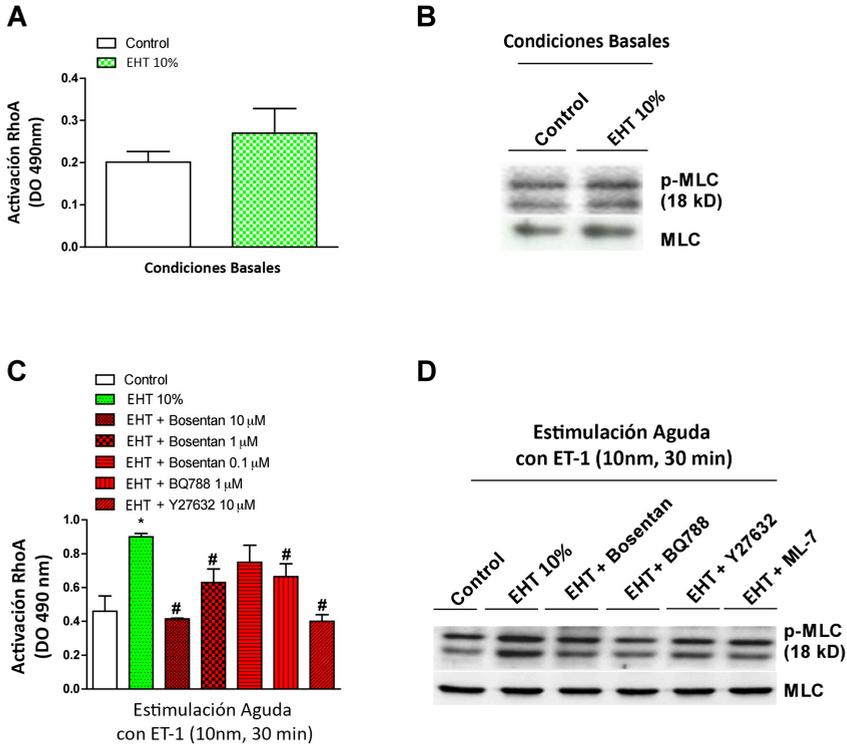


Figura 43. La exposición de las células endoteliales de arteria pulmonar humana (CEAPHs) al extracto de humo de tabaco (EHT) las sensibiliza a la activación de la RhoA inducida por endotelina-1 (ET-1) y la fosforilación de la miosina de cadena ligera (MLC por sus siglas en inglés, *myosin light chains*). (A) Se midió la activación de RhoA en CEAPHs, en presencia o ausencia de tratamiento con EHT (10% durante 24h) mediante un kit calorimétrico comercial. (B) Tras 24h de exposición al EHT se midió la fosforilación de MLC mediante Western blot. (C, D) Se incubaron las CEAPHs con EHT durante 24h. Tras el tratamiento con EHT, las células fueron lavadas tres veces con tampón fosfato salino (PBS por sus siglas en inglés, *phosphate buffered saline*) y estimuladas con ET-1 (10nM) por un periodo de 30 minutos, y se midió la actividad RhoA (C) y la fosforilación MLC (D). Las células expuestas al EHT mostraron un incremento de la actividad RhoA y de la p-MLC comparado con las células no expuestas. Además, la incubación 1h antes de la adición del EHT con bosentan, BQ788, Y27632 o ML-7 (sólo en experimentos de p-MLC), atenuó la activación de RhoA y la fosforilación de ML-7 inducida por ET-1. Los resultados están expresados como media±EEM (siendo EEM el Error Estándar de la Media) de la absorbancia correspondiente a la RhoA activa y un Western blot representativo para p-MLC en un total de tres experimentos diferentes de tres pacientes diferentes por condición. * $p < 0,05$ frente a control; # $p < 0,05$

frente a EHT 10%.

5. LA ENDOTELINA-1 REDUCE LA LIBERACIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO E INCREMENTA TxA₂ EN CÉLULAS ENDOTELIALES DE ARTERIA PULMONAR HUMANA PRETRATADAS CON EXTRACTO DE HUMO DE TABACO

Está demostrado que el Humo de Tabaco (HT) reduce la liberación de NO y aumenta la de TxA₂; sin embargo, no existe ningún dato sobre la influencia del HT en la liberación de NO y TxA₂ inducida por ET-1.

Como el EHT aumenta la expresión de receptor ET_B, los efectos de la ET-1 en la liberación de NO y TxA₂ pueden ser diferentes. Debido a esto, decidimos exponer las CEAPHs a EHT durante 24h y después fueron estimuladas con ET-1 (10nM) durante 1h. Tras esta estimulación, se midió en el sobrenadante del cultivo celular los derivados estables de NO y TxA₂ (denominados nitritos y TxB₂). De esta forma observamos que el tratamiento con EHT reduce la liberación de nitritos inducida por ET-1 en un ~50% comparando con células no tratadas (Figura 44A)(p<0,05). Además, la adición de bosentan (1 y 10µM), BQ788 (1µM), Y27632 (10µM) o el antioxidante NAC (1mM) aumentó significativamente la liberación de nitrito tras la aplicación de ET-1 (Figura 44A) (p<0,05 frente EHT). Por el contrario, ML-7 (10µM) no modificó la liberación de NO. Por otra parte, en CEAPHs tratadas con EHT, la liberación de TxB₂ inducida por ET-1, fue incrementada en aproximadamente el doble (Figura 44B) (p<0,05 frente a células no expuestas a EHT). La administración de bosentan (1 y 10µM), BQ788 (1µM), Y27632 (10µM) y NAC (1mM) redujeron significativamente la liberación de

TxB₂ inducida por ET-1 (Figura 44A) ($p < 0,05$ frente EHT), mientras que ML-7 no mostró ningún efecto.

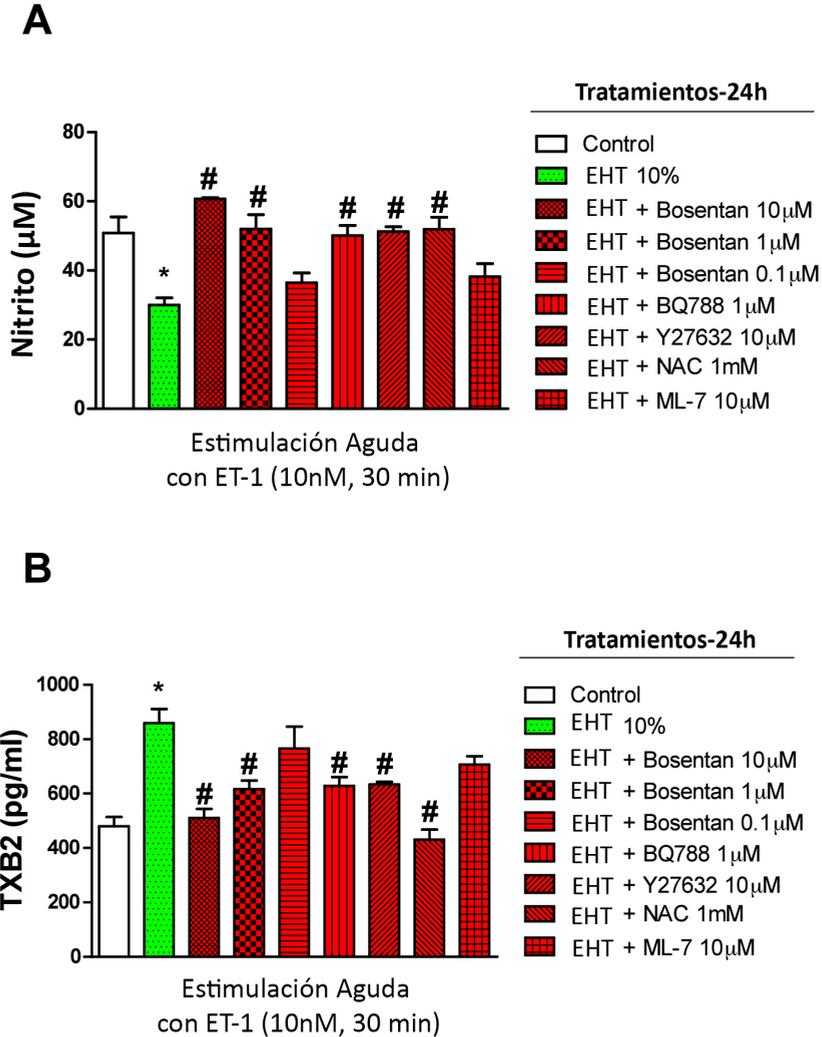


Figura 44. La exposición de las células endoteliales de arteria pulmonar humana (CEAPHs) al extracto de humo de tabaco (EHT) incrementa el desequilibrio entre la liberación del

óxido nítrico (NO) y el TxA_2 en respuesta a una estimulación aguda con endotelina-1 (ET-1). Las CEAPHs fueron cultivadas en placas de seis pocillos hasta obtener una confluencia de ~95%. Posteriormente, las células fueron incubadas en presencia o ausencia de EHT 10% por un periodo de 24h. En experimentos paralelos, bosentan, BQ788, Y27632, NAC o ML-7 fueron añadidos al cultivo celular 1h antes que el EHT. Tras 24h de incubación, se lavaron las células tres veces con tampón fosfato salino (PBS por sus siglas en inglés, *phosphate buffered saline*) y se estimularon con ET-1 durante 30 minutos. Las células tratadas con EHT liberaron menos NO (medido como nitritos) (A) y más TxA_2 (medido como TxB_2) (B), en respuesta a la estimulación aguda con ET-1. Además, la incubación de estas células con bosentan, BQ788, Y27632 o NAC atenuaron el efecto del EHT dando lugar a un descenso de NO y el aumento de TxA_2 inducido por ET-1. Los resultados se expresan como $\text{media} \pm \text{EEM}$ (siendo EEM el Error Estándar de la Media) del total de tres experimentos diferentes de tres pacientes diferentes por condición. * $p < 0,05$ frente a control; # $p < 0,05$ frente el EHT 10%.

6. LA ENDOTELINA-1 INCREMENTA LA PRODUCCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO INTRACELULAR EN CÉLULAS ENDOTELIALES DE ARTERIA PULMONAR HUMANA PRETRATADAS CON EXTRACTO DE HUMO DE TABACO

Las ERO son uno de los principales iniciadores de la reactividad intracelular en células endoteliales expuestas a HT. De este modo, examinamos la producción endotelial de ERO en respuesta al EHT y encontramos que el EHT incrementó ERO de manera tiempo y concentración dependiente, alcanzando el valor cumbre tras 10 minutos de estimulación (Figura 45A). Este valor de respuesta máximo fue seguido por el subsiguiente declive hasta alcanzar meseta por encima de los niveles basales después de ~30 minutos (Figura 45A). El antioxidante NAC (1mM) evitó completamente la generación de ERO (Figura 45A).

En segundo lugar, estudiamos el papel del EHT en la producción de ERO inducida por ET-1 exógena. Como vimos que la ET-1 (10nM) indujo la producción máxima de ERO tras 10 minutos de estimulación (Figura 45B),

seleccionamos estas condiciones experimentales para los experimentos siguientes. Las CEAPHs estimuladas con EHT (10%) durante 24h mostraron un incremento de la producción de ERO en respuesta a ET-1 exógena, que fue significativamente superior que en las CEAPHs no expuestas al EHT (Figura 45C) ($p < 0,05$ frente a células no expuestas). Cuando se añadió bosentan (1 y 10 μM), BQ788 (1 μM), Y27632 (10 μM) y NAC (1 mM) a las dichas células antes del EHT, se suprimió el efecto de la ET-1 en la producción de ERO (Figura 45C) ($p < 0,05$ frente el EHT).

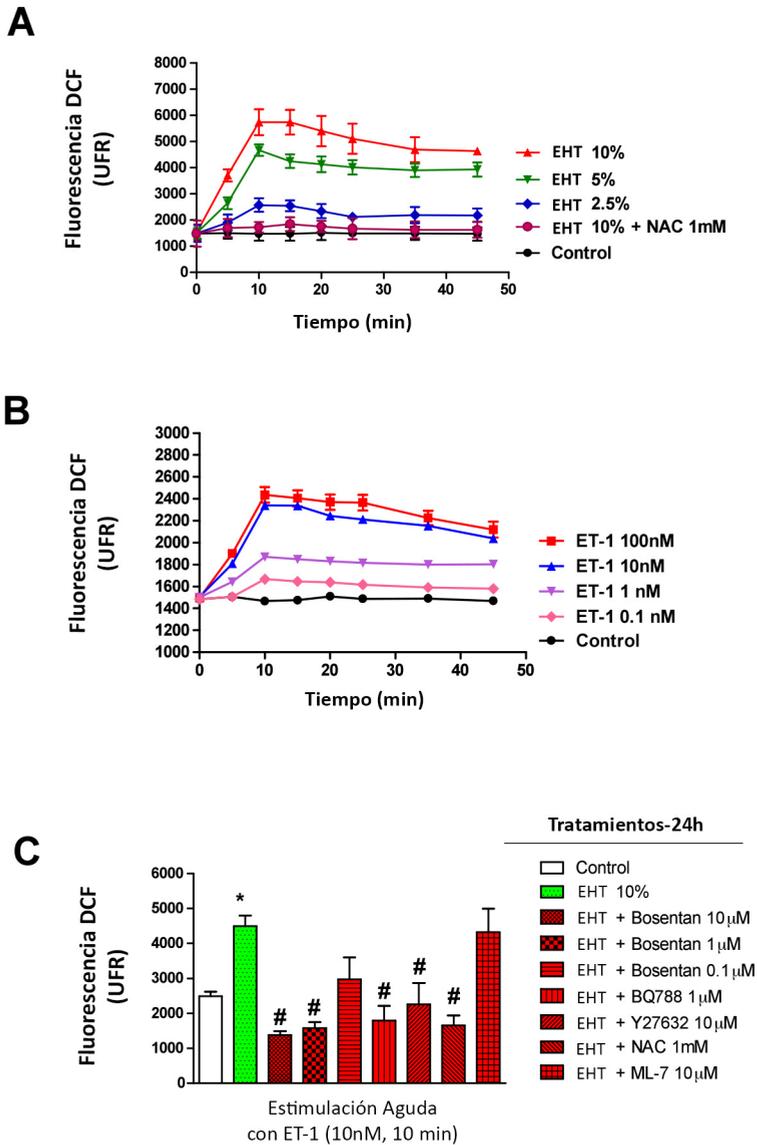


Figure 45. La endotelina-1 (ET-1) aumenta la producción de especies reactivas de oxígeno

(ERO) en las células endoteliales de arteria pulmonar humana (CEAPHs) tratadas con extracto de humo de tabaco (EHT). (A, B) Las CEAPHs confluentes fueron cultivadas en placas de 96 pocillos oscuras con fondo claro, y cargadas con DCFDA durante un periodo de 30 minutos. Tras este periodo de tiempo, las células fueron expuestas a (A) EHT (2,5%-10%) o (B) ET-1 (0,1-100nM) y la fluorescencia de DCF fue monitorizada cada 5 minutos durante 45 minutos. (C) En otros experimentos, las células fueron incubadas con y sin EHT 10% en presencia y ausencia de bosentan, BQ788, Y27632, NAC o ML-7 durante 24h. Posteriormente, las células fueron lavadas tres veces con tampón fosfato salino (PBS por sus siglas en inglés, *phosphate buffered saline*) y cargadas con DCFDA durante 30 minutos. Las células fueron estimuladas con ET-1 (10nM) y la fluorescencia de DCF fue medida tras 10 minutos de estimulación. Los resultados están expresados como media±EEM (siendo EEM el Error Estándar de la Media) de un total de seis experimentos diferentes de tres diferentes pacientes por condición. *p<0,05 frente control; #p<0,05 frente EHT 10%.

ESTUDIO II

BOSENTAN INHIBE LA EXPRESIÓN DEL RECEPTOR DE ENDOTELINA EN ARTERIAS PULMONARES INDUCIDA POR EL HUMO DE TABACO.

1. LA SOBRE-EXPRESIÓN DE RECEPTORES DE ENDOTELINA A Y B INDUCIDA POR LA EXPOSICIÓN AL HUMO DE TABACO ES ATENUADA POR BOSENTAN

La exposición *in vitro* de las CMLAPhs al humo de tabaco dio lugar a aumentos dosis y tiempo dependientes de la proteína ET_A y ET_B y de la expresión de ARNm (Figuras 46A y 46B), alcanzando un valor máximo de expresión al 10% EHT tras 24h de estimulación. Basándonos en estos resultados seleccionamos el 10% EHT durante 24h como condición de estimulación para posteriores estudios. La preincubación dosis-dependiente de las CMLAPhs con bosentan (10nM a 10μM) previno la sobre-regulación de la proteína ET_A y ET_B (Figura 46C).

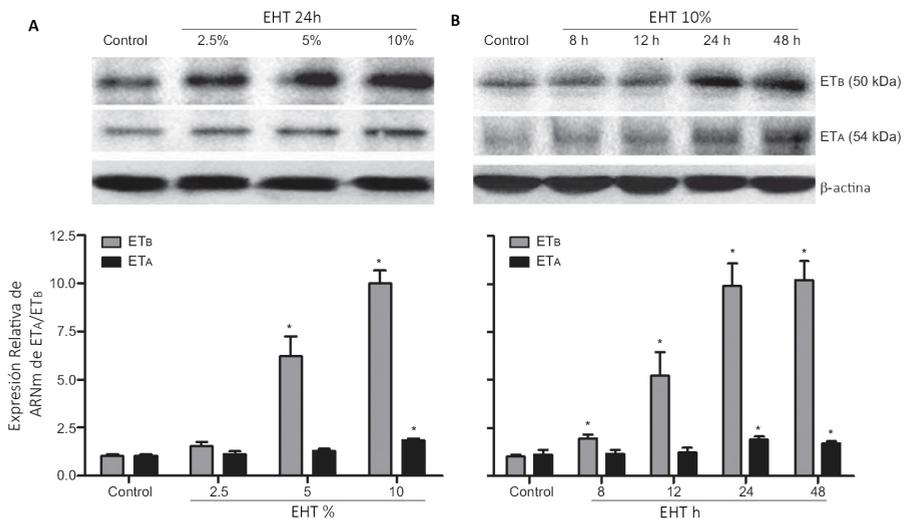


Figura 46 A y B. El humo de tabaco aumenta los niveles de receptor de endotelina A y B (ET_A y ET_B, respectivamente). El Extracto de Humo de Tabaco (EHT) A) dosis y B) tiempo-dependiente aumenta los niveles de proteína ET_A y ET_B y da lugar a un aumento en la

expresión de ácido ribonucleico mensajero (ARNm) en células de músculo liso de arteria pulmonar humana (CMLAPHs).

El fármaco BQ788, antagonista selectivo de ET_B, previno la sobre-regulación de ET_B inducida por EHT a concentraciones de 1μM y 10μM, mientras que no se observó ningún efecto en la sobre-regulación de ET_A inducida por EHT (Figura 46D).

En contraposición, el fármaco BQ123, antagonista selectivo de ET_A, previno satisfactoriamente la sobre-regulación de ET_A a concentraciones de 100nM a 10μM y de ET_B a concentraciones de 1μM a 10μM (Figura 46E).

Los estudios realizados sobre la de ARNm mostraron los mismos resultados que los observados para la expresión de proteínas (Figura 46F y G).

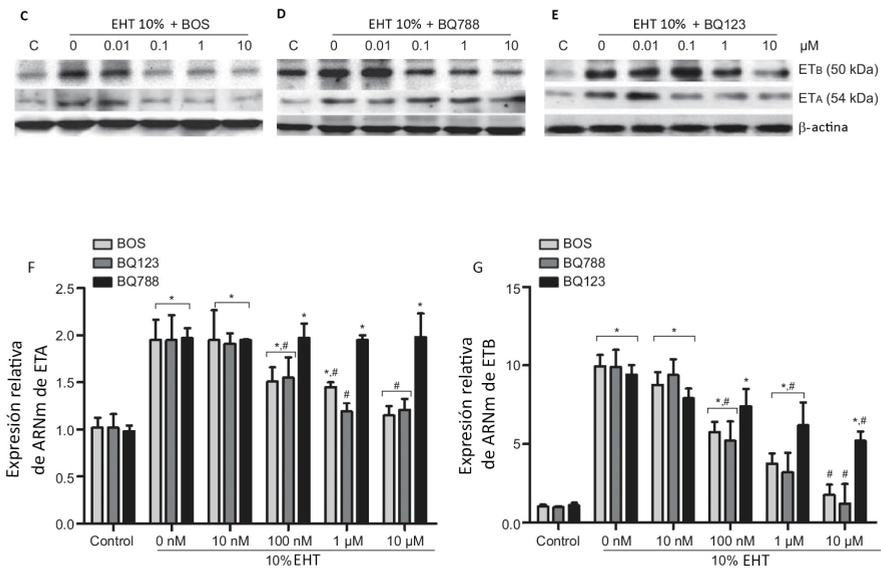


Figura 46 C, D, E, F y G. C) Bosentan (BOS), D) BQ788 y E) BQ123 previnieron de forma dosis-dependiente la expresión de proteína de receptor de endotelina B (ET_B) inducida por el EHT, mientras sólo BOS y BQ123 de manera dosis-dependiente previnieron la expresión de receptor de endotelina A (ET_A). F) El BOS y el BQ123 de forma dosis-dependiente previnieron la expresión génica de ET_A y ET_B inducida por el extracto de humo de tabaco (EHT). G) BOS,

BQ123 y BQ788 de manera dosis-dependiente previnieron la expresión de ET_A inducida por el EHT. Los datos están expresados como media±EEM (siendo EEM el Error Estándar de la Media) de tres experimentos independientes por condición. *: p<0,05 comparado con la respectiva condición control (C) #: p<0,05 comparado con el grupo EHT.

2. LA EXPRESIÓN DE RECEPTORES DE ENDOTELINA A Y B INDUCIDA POR EL EXTRACTO DE HUMO DE TABACO ESTÁ PARCIALMENTE MEDIADA POR ERK1/2, RhoA-GTP Y ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO, ASÍ COMO POR UN MECANISMO DE RETROALIMENTACIÓN POSITIVA MEDIADO POR ENDOTELINA-1

La incubación de CMLAPhs con el inhibidor de ERK1/2, PD98059 (10µM), el inhibidor de la Rho-quinasa, Y27632 (10µM), o con el antioxidante N-acetilcisteína (NAC) (1mM), efectivamente previno la sobre-expresión de proteína ET_A y ET_B inducida por el EHT (Figura 47A). Del mismo modo la incubación de CMLAPhs con un anticuerpo monoclonal para ET-1 (10 µg.ml⁻¹) también suprimió la sobre-expresión de ET_A y ET_B inducida por el EHT (Figura 47A). En otros experimentos, la adición de ET-1 (10nM) (24h) aumentó la expresión de proteína ET_A y ET_B (Figura 47B). Bosentan (10 µM), BQ123 (10µM), PD98059, Y27632 o NAC previnieron parcialmente la sobre-expresión de ET_A y ET_B inducida por ET-1, mientras que BQ788 (10µM) sólo impidió la de ET_B (Figura 47B). Estos resultados están en consonancia con la expresión génica de ET_A y ET_B (Figura 47C). Curiosamente, el EHT al 10% (24h) aumentó significativamente los niveles de ET en el sobrenadante celular (p<0,05 frente control; Figura 47D), lo cual

fue impedido por bosentan BQ788, BQ123, PD98059, Y27632 y NAC (1mM) (Figura 47D).

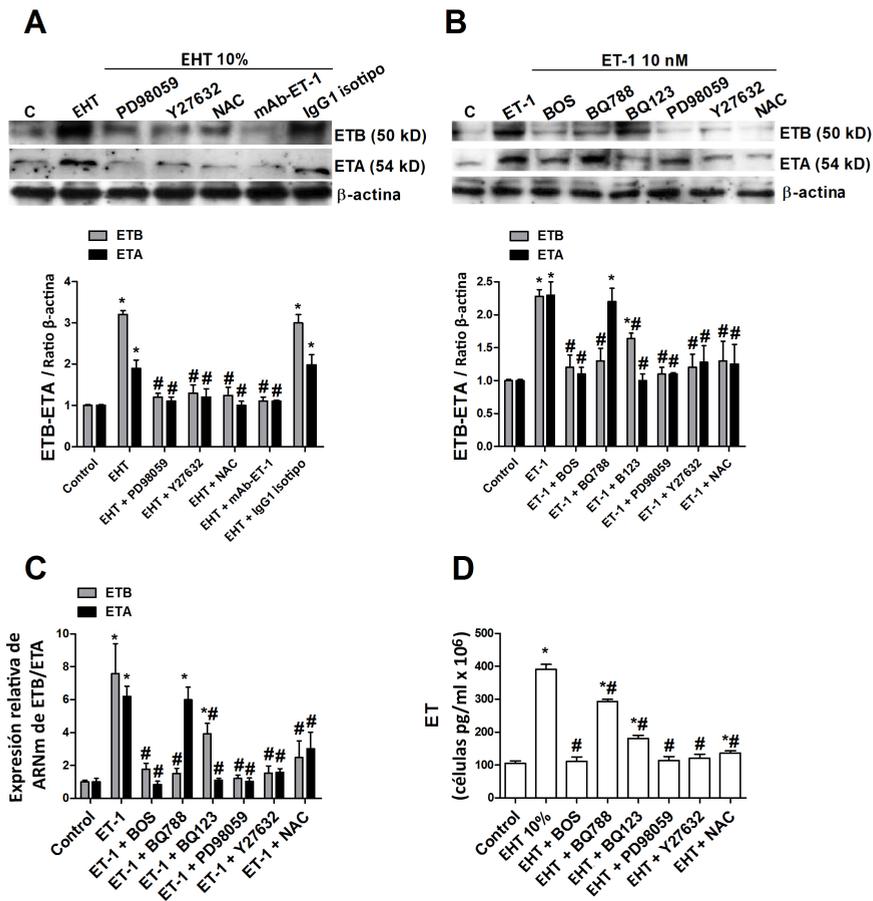


Figura 47. El Humo de Tabaco aumenta la expresión de receptores de endotelina A y B (ET_A y ET_B respectivamente) mediante un mecanismo que implica a las especies reactivas del oxígeno (ERO), la ERK 1/2, RhoA-GTP y un mecanismo de alimentación autocrino mediado por endotelina. A) El incremento de ET_A y ET_B inducido por el extracto de humo de tabaco (EHT) 10% (24h de incubación) fue reducido por PD98059 (10μM), Y27632 (10μM) o NAC (1mM) en células de músculo liso de arteria pulmonar humana (CMLAPh). La incubación anticuerpo monoclonal (mAb) para la endotelina-1 (ET-1) (10μg.mL⁻¹) 30 minutos antes de la adición de EHT también frenó la sobre-regulación de ET_A y ET_B, a diferencia del isotipo IgG1 control. La incubación con ET-1 10nM durante 24h aumentó significativamente

la expresión proteica B) de ácido ribonucleico mensajero (ARNm) C) y de ET_A y ET_B. Dicho aumento fue frenado mediante la adición de bosentan (BOS) (10μM), BQ123 (10μM), PD98059, Y27632 y NAC, mientras que el BQ788 (10μM) sólo frenó el aumento de la expresión en el caso de ET_B y no en ET_A. D) El EHT 10% aumenta la liberación de ET, lo cual fue atenuado por bosentan, BQ123, BQ788, PD98059, Y27632 y NAC. Los datos se muestran como media±EEM (siendo EEM el Error Estándar de la Media) para los tres experimentos diferentes por condición.*: p<0,05 comparado con su respectiva condición; #: p<0,05 comparado con el grupo EHT.

3. BOSENTAN INHIBE LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO INTRACELULARES, LA FOSFORILACIÓN DE ERK1/2 Y LA ACTIVACIÓN RHO-GTP INDUCIDAS POR EL EXTRACTO DE HUMO DE TABACO

El EHT aumentó la intensidad de fluorescencia intracelular, derivada de la formación de DCF, en 2,73 veces después de 24h. Bosentan y BQ123 redujeron significativamente la formación de ERO inducida por el EHT en 1,17 y 1,5 veces respectivamente, mientras que el fármaco BQ788 no alcanzó una reducción significativa (2,23 veces) (Figuras 48A y 48B) sobre el grupo control.

Además, el EHT aumentó la fosforilación ERK1/2 y la activación de RhoA-GTP después de 24h, lo cual fue impedido eficazmente por bosentan, BQ123 y, en menor medida, por el fármaco BQ788 (Figuras 48C y 48D).

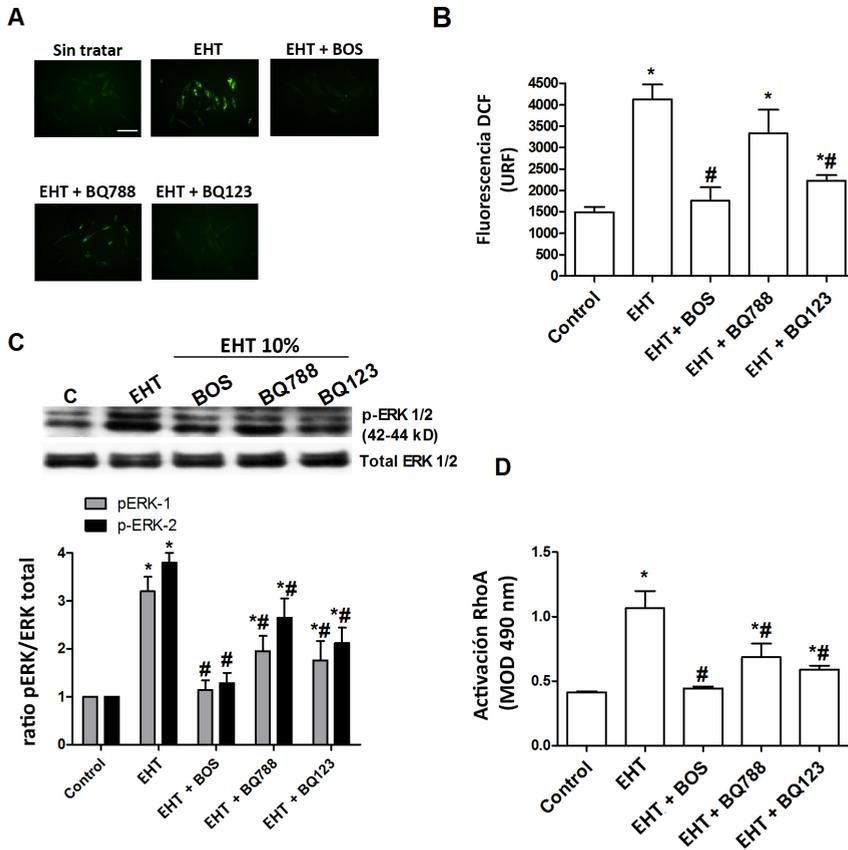


Figura 48. El antagonismo al receptor de Endotelina atenúa la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) inducidas por el extracto de humo de tabaco (EHT), la fosforilación de la ERK (*extracellular signal-regulated kinase*) 1/2 y la activación de la RhoA-GTP. (A, B) El EHT 10% aumenta la generación de ERO intracelular tras 24h de exposición tal y como muestra el incremento de intensidad fluorescente con diclorofluoresceína (DCF) en células de músculo liso de arteria pulmonar humana (CMLAPhs). La generación de ERO inducida por el EHT fue suprimida con bosentan (BOS) (10 μ M) pero no por el BQ788 (10 μ M). (A) Se muestran las imágenes representativas de la fluorescencia de ERO intracelular. Escala=20 μ m. (C) El EHT 10% consiguió la fosforilación de ERK1/2 tras 24h de exposición, la cual fue suprimida por el bosentan, atenuada por BQ123 y, en menor medida, por el BQ788. (D) El EHT aumentó la activación de RhoA-GTP que fue también suprimida por bosentan, atenuada por BQ123 y, en menor medida, por el BQ788. Los datos están representados como media \pm EEM (siendo EEM el Error Estándar de la Media) para tres experimentos independientes por condición. URF:

unidad relativa de fluorescencia; pERK: ERK fosforilada; MOD 490: medida óptica de densidad a 490nm. *: p<0,05 comparado con la respectiva condición control; #: p<0,05 comparado con el grupo de EHT.

4. BOSENTAN IMPIDE LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS DE MUSCULO LISO DE ARTERIA PULMONAR HUMANA INDUCIDA POR EL EXTRACTO DE HUMO DE TABACO

El EHT provocó un aumento de la proliferación celular del doble de los valores iniciales (Figura 49A). Bosentan inhibió la proliferación celular, mientras que los fármacos BQ123 y BQ788 redujeron la proliferación en un 1,31 y 1,6 veces respectivamente frente al control (Figura 49A). Por otra parte, los fármacos PD98059, Y27632 y NAC (1mM) también evitaron la proliferación celular.

Puesto que se ha demostrado que el EHT aumenta los niveles de ET en el sobrenadante, bloqueamos selectivamente la ET-1 con un anticuerpo monoclonal para ET-1, que posteriormente redujo la proliferación celular a niveles basales (Figura 49A).

Dado que la proliferación de CMLAPHS *in vivo* está principalmente mediada por los factores de crecimiento, como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF, por sus siglas en inglés, *platelet-derived growth factor*), las células se trataron con EHT en presencia o ausencia de PDGF-BB (factor de crecimiento de plaquetas tipo B) humano recombinante a 10ng.mL⁻¹. El PDGF-BB aumentó la proliferación celular en 3,1 veces en ausencia de EHT y 3,5 veces en presencia de EHT. Bosentan, BQ123 y BQ788 inhibieron la

proliferación celular inducida por el EHT y el PDGF-BB en 1,6, 1,9 y 2,1 veces respectivamente (Figura 49B).

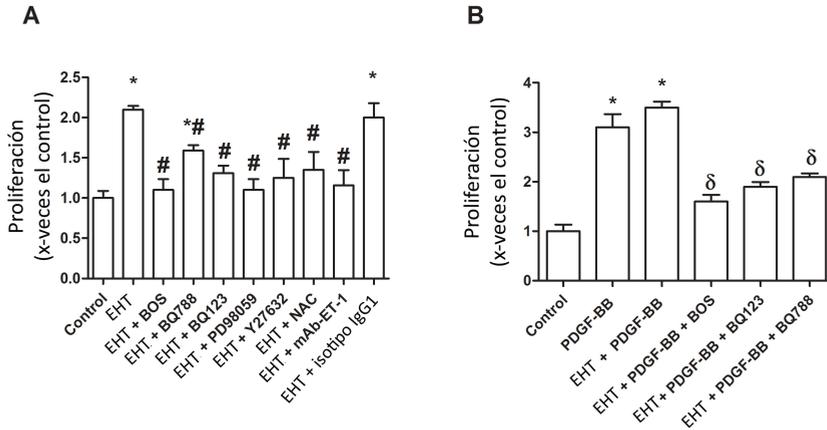


Figura 49. El Humo de Tabaco incrementa la proliferación de células de músculo liso de arterias pulmonares humanas (CMLAPHs). (A) El extracto de humo de tabaco (EHT) 10% aumenta la proliferación de CMLAPHs tras 24h de exposición. Bosentan (BOS) (10 μ M), BQ123 (10 μ M), BQ788 (10 μ M), PD98059 (10 μ M), Y27632 (10 μ M), N- acetylcysteina (NAC) (1mM) y el anticuerpo monoclonal de la Endotelina (mAb-ET-1) (10 μ g.mL⁻¹) frenaron de forma efectiva la proliferación de CMLAPHs inducida por el EHT. (B) El PDGF (*platelet-derived growth factor*) a 10 ng.mL⁻¹ aumentó la proliferación de CMLAPHs en 3,1 veces. En presencia del EHT 10%, el PDGF 10 ng/mL aumentó la proliferación de CMAPHs en 3,5 veces. Dicho aumento de la proliferación fue atenuado por BOS (10 μ M), BQ123 (10 μ M) y BQ788 (10 μ M). Los datos se muestran como media \pm EEM (siendo EEM el Error Estándar de la Media) de tres experimentos independientes por condición. Ig: inmunoglobulina. *: p<0,05 comparado con su respectiva condición control; #:p<0,05 comparado con el grupo EHT; δ : p<0.05 comparado con el grupo EHT+PDGF.

5. LA EXPOSICIÓN DE LAS CÉLULAS DE MÚSCULO LISO DE ARTERIA PULMONAR HUMANA AL EXTRACTO DE HUMO DE TABACO AUMENTA LA $[Ca^{2+}]_i$ INDUCIDA POR ENDOTELINA-1 Y LA CONTRACCIÓN CELULAR.

Las CMLAPhs expuestas a EHT al 10% estaban sujetas a un aumento agudo de $[Ca^{2+}]_i$ inducida por ET-1 10nM con un valor máximo media \pm EEM (siendo EEM el Error Estándar de la Media) de 493 \pm 46 frente a 274 \pm 34nM para las células no tratadas (control) ($p < 0,05$; Figuras 50A y 50B).

Bosentan, BQ788 o BQ123 añadidos antes y durante la exposición al EHT redujeron el aumento agudo de $[Ca^{2+}]_i$ inducido por ET-1 a 304 \pm 41, 395 \pm 36 y 343 \pm 32nM, respectivamente ($p < 0,05$ frente a EHT sólo; Figuras 50A y 50B).

La ET-1 (10nM) aumentó la contracción celular y fue significativamente mayor en aquellas células expuestas a EHT (10%) frente a las no expuestas ($p < 0,05$; Figura 50C).

Las células pre-tratadas con EHT en presencia de Bosentan, BQ123 o BQ788 fueron menos susceptibles a la contracción celular inducida por ET-1, ya que su nivel de contracción celular estuvo próximo a los niveles del control (Figura 50C).

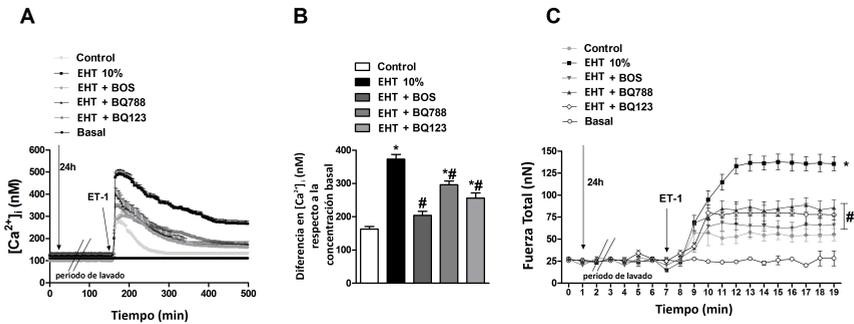


Figura 50. El Humo de Tabaco sensibiliza las células del músculo liso de arterias pulmonares a un estímulo agudo de endotelina-1 (ET-1). Las células de músculo liso de arteria pulmonar humana (CMLAPHs) fueron expuestas a extracto de humo de tabaco (EHT) 10% en presencia o ausencia de Bosentan (BOS) (10 μ M), BQ123 (10 μ M) o BQ778 (10 μ M) durante 24 h. (A, B) Posteriormente las células fueron lavadas tres veces con tampón fosfato salino (PBS por sus siglas en inglés, *phosphate buffered saline*) e incubadas con fura-2 acetoxymetyl eter durante 30 minutos. Después se estimularon las células con ET-1 (10nM). Los datos están representados como concentración nanomolar de calcio libre intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) en 12 células por experimento, en un total de cuatro experimentos por condición. (C) Las placas con CMLAPHs fueron llevadas al microscopio y las células fueron captadas en campo brillante. Se muestra el transcurso de la respuesta contráctil de las CMLAPHs estimuladas con ET-1. Los datos están presentados como el total de fuerza ejercida por la célula en el sustrato en un total de seis células por condición. Los datos están representados como media \pm EEM (siendo EEM el Error Estándar de la Media) *: $p < 0,05$ frente control; #: $p < 0,05$ frente EHT.

6. LA EXPOSICIÓN AL EXTRACTO DE HUMO DE TABACO INCREMENTA LA CONTRACCIÓN INDUCIDA POR ENDOTELINA-1 DE LAS ARTERIAS INTRAPULMONARES HUMANAS PEQUEÑAS, LA CUAL ES IMPEDIDA POR BOSENTAN

Los cortes pulmonares de precisión que incubamos con EHT mostraron un aumento de la expresión de la proteína ET_B, la cual fue impedida de forma significativa por bosentan, BQ123 y BQ788, mientras que la expresión de ET_A inducida por el EHT sólo fue prevenida por bosentan y el BQ123 (Figura 51A). Estos resultados fueron reproducidos de forma cualitativa mediante experimentos de inmunofluorescencia (Figura 51B). En este sentido, la exposición al EHT incrementa la intensidad de fluorescencia de la ET_B en células endoteliales y musculares. La intensidad de fluorescencia de ET_A aumentó sólo en el área de las musculares.

Los cortes pulmonares de precisión que fueron incubados con bosentan mostraron una intensidad de fluorescencia menor, tanto por ET_B como por ET_A (Figura 51B).

Los cortes pulmonares de precisión que fueron incubados con EHT al 10% aumentaron la sensibilidad vascular a ET-1.

El logEC₅₀ calculado para grupo tratado con EHT fue de $-9,36 \pm 0,32M$ frente a $-8,47 \pm 0,16M$ de los controles ($p < 0.05$; Figura 51C y 51D).

Los cortes pulmonares de precisión expuestos a EHT en presencia de bosentan, BQ788 o BQ123 aumentaron significativamente el logEC₅₀ de ET-1 a $-8.76 \pm 0.3M$, $-8.73 \pm 0.17M$ y $-8.64 \pm 0.24M$, respectivamente.

El EHT también aumenta la E_{max} de contracción de la ET-1 frente al grupo control ($184 \pm 5,7\%$ frente $136 \pm 3,6\%$; $p < 0,05$; Figura 51F), la cual fue atenuada por el pre-tratamiento con bosentan, BQ788 o BQ123 a una E_{max} de ET-1 de $127,8 \pm 4,3\%$, $160,9 \pm 3,6\%$ y $145,8 \pm 4,3\%$ respectivamente (Figura 51F).

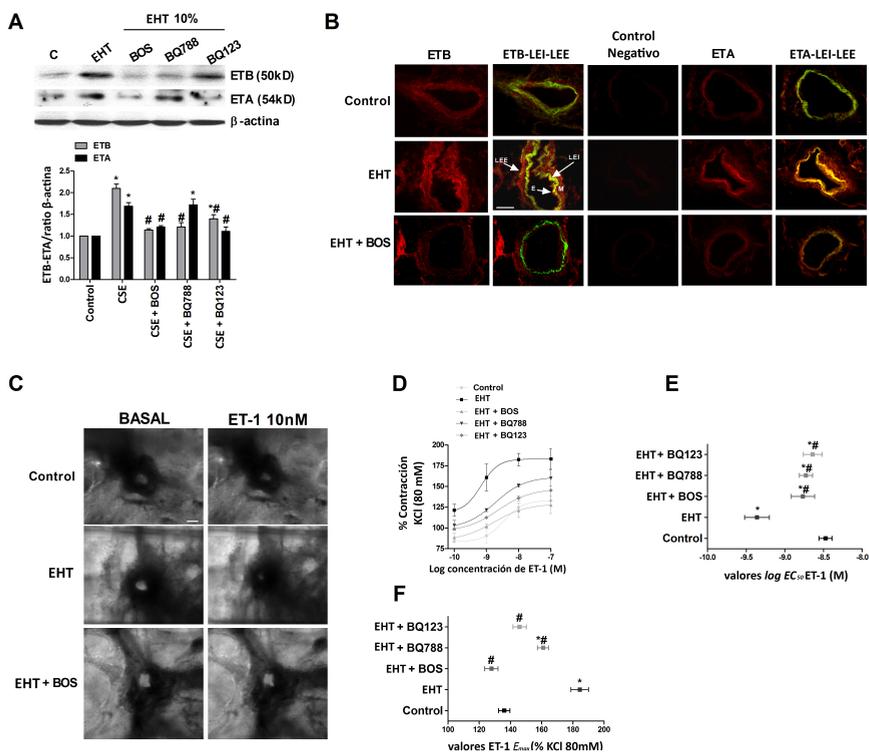


Figura 51. El extracto de humo de tabaco (EHT) incrementa la expresión de los receptores de endotelina A y B (ET_A y ET_B , respectivamente) en las arterias intrapulmonares humanas de pequeño calibre, lo cual aumenta la contractilidad vascular pulmonar en respuesta a una estimulación aguda de endotelina-1 (ET-1). Pequeños cortes de precisión intrapulmonares humanos fueron expuestos a EHT 10% en presencia o ausencia de bosentan

(10 μ M), BQ123 (10 μ M) o BQ788 (10 μ M) durante 24h. (A) Para medir la expresión proteica de ET_A y ET_B se realizó un Western blot. (B) Se fijaron los cortes de precisión y se realizó una inmunofluorescencia para ET_A y ET_B con anticuerpo secundario con rodamina. Las lámina elástica interna (LEI) y lámina elástica externa (LEE) fueron evaluadas con autofluorescencia verde. E: células endoteliales; M: células de músculo liso. Escala= 100 μ m. (C) Imágenes representativas del transcurso de la contracción de pequeñas arterias pulmonares humanas en respuestas a ET-1 bajo un videomicroscopía visible. (D-F) Curvas de contracción ET-1 concentración-dependiente en dos cortes por condición de un total de tres pacientes diferentes por condición. Los datos están presentados como media \pm EEM (siendo EEM el Error Estándar de la Media) de, B) tres cortes y D-F) dos cortes de tres pacientes por condición. EC₅₀: Concentración eficaz 50; Emax: efecto máximo del fármaco. *: p<0,05 frente control; #: p<0,05 frente EHT.

Las arterias pulmonares de pacientes fumadores y pacientes con EPOC mostraron un incremento de la expresión proteica de ET_A y ET_B frente a los pacientes no fumadores (p<0,05; figura 52).

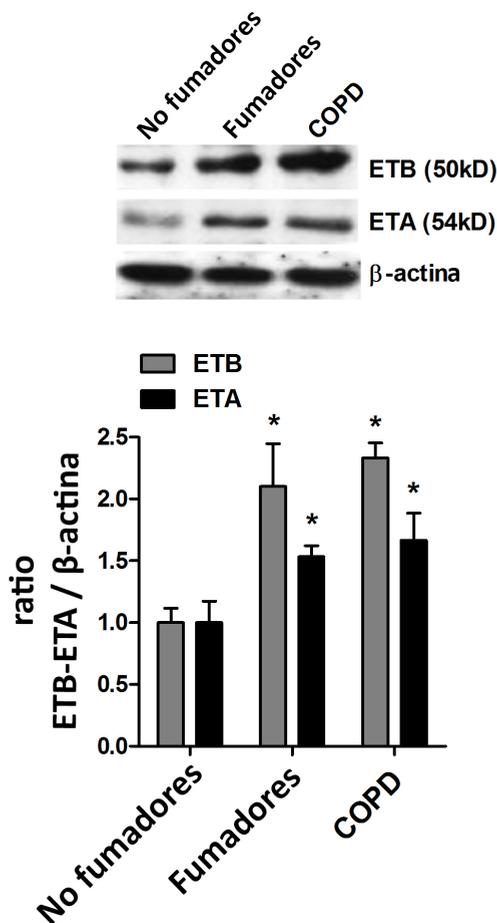


Figura 52. Los receptores de endotelina A y B (ET_A y ET_B) están sobre-expresados en las arterias pulmonares de pacientes fumadores y con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). Las arterias pulmonares de pacientes fumadores, no fumadores y con EPOC fueron aisladas cuidadosamente a partir de piezas quirúrgicas de pulmón humano libre de tumor. Se extrajeron y estudiaron, mediante Western blot, el total de proteínas con anticuerpos para ET_A y ET_B . Los resultados representan la expresión de ET_A , ET_B de seis pacientes no fumadores, siete fumadores y ocho pacientes con EPOC. Los datos densiométricos están mostrados como la expresión de proteína ET_A y ET_B relativa a β -actina y normalizado a la expresión de no fumadores. Los datos están presentados como media \pm EEM (siendo EEM el Error Estándar de la Media) de densitometría de un Western blot por paciente.*: $p < 0.05$ frente a no fumadores.

DISCUSIÓN

ESTUDIO I

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

En este caso el estudio se diseñó con la intención de evaluar el efecto del HT en la expresión de ET_B en CEAPs y sus consecuencias funcionales.

Los resultados presentados en esta tesis doctoral muestran que la exposición a EHT incrementa la expresión del ET_B en CEAPs mediante un mecanismo de alimentación positiva (*feed forward*) a través de la liberación de ET-1. Por otra parte observamos que el bosentan así como el BQ788, inhibidor selectivo de ET_B, evita la sobre-expresión de ET_B inducidos por el EHT. Dicha sobre-expresión sensibiliza a las CEAPs a la posterior estimulación con ET-1, causando de este modo disfunción endotelial, incremento de la contracción celular, reducción de la síntesis de NO y un incremento de la producción de TxA₂ y de ERO. Estos resultados son de potencial importancia para entender la posible utilidad de bosentan en la hipertensión pulmonar asociada a EPOC.

Por otra parte se observó que la sobre-expresión de ET_B inducida por el EHT en parte está mediada por la activación de RhoA y la producción de ERO, y fue completamente bloqueada por el bosentan y el BQ788.

Estos resultados introducen un concepto innovador por el cual, en un contexto inflamatorio como la exposición crónica a humo de tabaco, la

sobre-expresión del ET_B potencia la disfunción endotelial inducida por la endotelina.

Además, encontramos una expresión de ET_B más relevante en el endotelio de las arterias pulmonares de los pacientes fumadores y pacientes fumadores con EPOC en comparación con sujetos sanos, que corrobora el papel del humo de tabaco en la expresión de ET_B *in vivo*.

Hoy en día los estudios centrados en conocer la función de los ET_B en las células endoteliales indican que poseen un papel protector, ya que su estimulación libera vasodilatadores y factores antiangiogénicos como el NO y la PGI₂

Se ha demostrado que los ratones *knock-out* ET_B endotelial desarrollan una fuerte sobre-presión en el ventrículo derecho durante la hipoxia [243] y que los ET_B endoteliales eliminan la ET-1 de la circulación sistémica del tejido pulmonar.

En contraste con los ET_A, los ET_B son proteínas inducibles tanto en células del músculo liso como en células endoteliales [244, 245]. Sin embargo, en la hipertensión pulmonar tromboembólica y en hipertensiones pulmonares derivadas de la esclerosis sistémica, así como en condiciones inflamatorias, la expresión de ET_B está sobre-expresada principalmente en las células pulmonares del músculo liso arterial, donde el ET_B media la contracción y la proliferación de células musculares lisas [246, 247] contribuyendo a la remodelación pulmonar.

Por otra parte, el humo de tabaco también sobre-expresa los ET_B en células pulmonares del músculo liso arterial induciendo la contracción de las

arterias pulmonares [248]. Sin embargo, el papel del humo de tabaco en la expresión de ET_B y sus consecuencias funcionales en la función endotelial está todavía por dilucidar.

En este trabajo nos hemos centrado en el efecto del humo de tabaco como condición inflamatoria, la cual puede representar la disfunción endotelial inicial que podría desarrollar hipertensión pulmonar en pacientes con EPOC. Hemos detectado que el EHT induce la sobre-expresión de ET_B en CEAPHs y que ésta puede ser prevenida por bosentan (antagonista de ET_B/ET_A), el BQ788 (antagonista selectivo del ET_B), así como por la inhibición de la Rho quinasa y ERO. Se sabe que el humo de tabaco induce la activación de la RhoA y la generación de ERO en las células endoteliales dando lugar a una disfunción endotelial [249-251], y que la generación de ERO puede sobre-expresar ET_B [244]. Debido a que el EHT induce la liberación de endotelina [252], y la activación de ET_B induce la producción de ERO [33], parece razonable pensar que bosentán y BQ788 inhiban la sobre-expresión de ET_B inducida por el EHT. De hecho, detectamos un incremento de la concentración de ET tras la exposición al EHT. Es más, la adición de anticuerpos monoclonales anti-ET-1 contuvo la sobre-expresión de ET_B inducida por el EHT. Este hallazgo fue confirmado por la evidencia de que los ET_B fueron sobre-expresados por la ET-1, sugiriendo que la sobre-expresión de los mismos inducida por el EHT está, en parte, mediada por un mecanismo retroalimentación proactiva.

Aunque la expresión de ET_B en células endoteliales está relacionado con

efectos beneficiosos, su sobre-expresión en un contexto inflamatorio ha sido poco examinada. Por este motivo hemos investigado el papel funcional de la sobre expresión de ET_B inducida por EHT en CEAPHs.

La permeabilidad endotelial puede ser un componente importante de la patogénesis de la HP, debido a que ésta aumenta la infiltración de células inflamatorias en la pared de las arterias pulmonares, ensanchando de este modo la túnica íntima y promoviendo el remodelado pulmonar. En este sentido, se ha planteado la hipótesis de que el desarrollo de alteraciones estructurales y funcionales de las arterias pulmonares en pacientes con EPOC está relacionada con la invasión de células inflamatorias en la pared vascular [90].

La GTPasa RhoA y la miosin quinasa MLCK juegan un papel clave en la contracción celular y la permeabilidad [253]. Por estudios anteriores sabemos que la estimulación de ET_B induce la activación de RhoA y la liberación de Ca²⁺ intracelular, y ambos median la fosforilación de MLC, que aumenta la formación de fibras de estrés de F-actina, la contracción celular y la permeabilidad [253, 254]. Además, la activación selectiva de ET_B aumenta la extravasación de albúmina en los pulmones de cobayos [255].

En este estudio hemos observado que la sobre expresión de ET_B inducida por la exposición al EHT en CEAPHs sensibiliza estas células a la exposición posterior con ET-1 exógena. Por lo tanto, las células expuestas al EHT mostraron una respuesta aumentada a una exposición aguda a ET-1 en respuestas asociadas con permeabilidad celular como el incremento de [Ca²⁺]_i, activación de RhoA, fosforilación de MLC, polimerización de F-actina

y contracción celular. Como la preincubación con bosentan, BQ788 e Y27632 reduce estos efectos y previene la sobre expresión con ET_B, sugerimos que la permeabilidad endotelial inducida por la ET-1 en células expuestas al EHT en parte se encuentra mediada por la inducción de la expresión del ET_B.

Posteriormente, nos centramos en el efecto de la exposición al EHT en términos de liberación de NO y TxA₂ inducida por ET-1. El equilibrio entre mediadores vasodilatadores/vasoconstrictores es clave para la función celular endotelial. En condiciones fisiológicas, las CEAPHS liberan principalmente los agentes vasodilatadores y anti-angiogénicos, NO y PGI₂. Sin embargo, en un contexto de daño celular, este balance puede ser alterado promoviendo la liberación de vasoconstrictores [256]. Existen sólidos indicios de que parte de la vasoconstricción inducida por la ET-1 está mediada por el aumento de la producción de TxA₂, que, a su vez, está mediada por los ET_B en el endotelio vascular [257]. Los ET_B endotelial pueden por lo tanto tener una doble función, modulando tanto la vasoconstricción como la vasodilatación, y estos efectos podrían, a su vez, ser modulados por las condiciones patológicas que afectan la función endotelial en sí misma.

En este trabajo observamos que si exponemos las CEAPHS al EHT, éstas quedan sensibilizadas produciendo menos NO y más TxA₂ en respuesta a picos agudos de ET-1. Por otra parte, este efecto fue atenuado por bosentan, BQ788, Y27632 y NAC, lo que sugiere que los receptores ET_B, Rho quinasa y ERO estuvieron involucrados en este proceso.

El hecho de que el HT inhiba la actividad de eNOS y reduzca la biodisponibilidad de NO a través de la interacción del NO con las ERO para formar peroxinitrito está solidamente demostrado. Además, como ya hemos comentado anteriormente, el EHT induce la RhoA y la activación secuencial de la Rho quinasa, que puede fosforilar directamente eNOS en Thr459 para suprimir la producción de NO en el endotelio [251]. Las ERO intracelular producidas por el EHT y ET-1 podrían explicar, en parte, el desequilibrio entre la liberación vasodilatadora / vasoconstrictora.

Por lo tanto, la producción de ERO inducida por ET-1 fue mayor en CEAPHs expuestas al EHT, lo que sugiere que la sobre-expresión del ET_B aumentó la producción de ERO. Además, bosentan, BQ788, Y27632 y NAC bloquearon por completo el efecto del EHT sobre la liberación de ERO inducida por ET-1. Como estos compuestos también frenaron la sobre expresión de receptores ET_B inducida por EHT, deberíamos concluir que las ERO inducidas por ET-1 en las células expuestas al EHT está mediada, al menos en parte, por la sobre expresión de receptor ET_B.

En resumen, nos gustaría proponer un modelo en el que el EHT induce la sobre-expresión de ET_B mediante un mecanismo de alimentación positiva mediada en parte por la liberación de ET por parte de las células, promoviendo la disfunción de CEAPHs, la cual está parcialmente atenuada por el bloqueo de receptores ET_B, Rho quinasa y ERO. Estos resultados pueden aportar la evidencia *in vitro* que apoye el uso del bosentan en las disfunciones endoteliales relacionadas con el humo del tabaco.

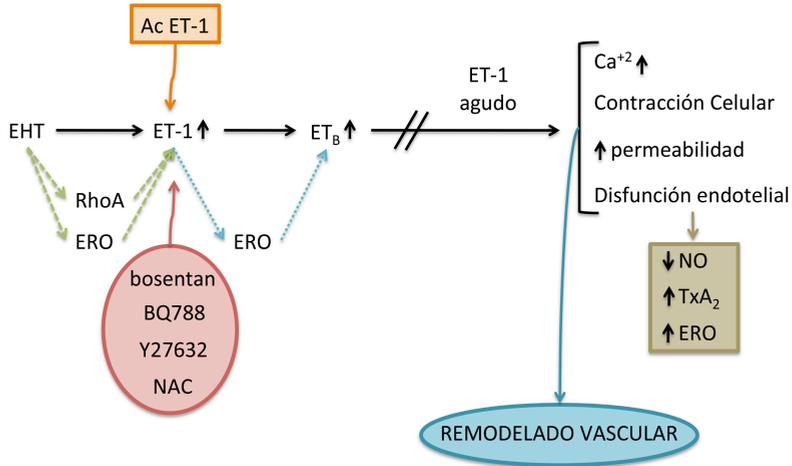


Figura 53. Estudio I: La exposición al extracto de humo de tabaco (EHT) de las células endoteliales de arteria pulmonar humana (CEAPHs) tiene como resultado un aumento de la expresión de receptores de endotelina B (ET_B) a través de la liberación de endotelina-1 (ET-1). Bosentan, BQ788, Y27632 y N-acetilcisteína (NAC), evitan la sobre-expresión de ET_B inducida por el EHT. La sobre-expresión de ET_B sensibiliza a las CEAPHs a la posterior estimulación con ET-1 exógena lo que tiene como consecuencia el aumento de los niveles de Ca²⁺, contracción celular, aumento de la permeabilidad y una disfunción endotelial causada por la disminución de los niveles de óxido nítrico (NO) y aumento de los niveles de tromboxano A2 (TxA₂) y especies reactivas de oxígeno (ERO), lo que desembocará en un aumento del remodelado vascular.

ESTUDIO II

Con respecto al segundo estudio presentado en esta tesis doctoral podemos señalar que su relevancia se basa en dos supuestos principales:

- 1/ la exposición crónica al HT es responsable del remodelado vascular pulmonar y del desarrollo de la HP durante la progresión de la EPOC [99]; y
- 2/ el sistema de ET está directamente implicado en el remodelado pulmonar en pacientes con EPOC [196].

Los resultados de este estudio muestran que el antagonismo a receptores de endotelina podría atenuar la proliferación y contracción de las CMLAPhs que había sido inducida por el EHT, así como la tensión intrapulmonar de pequeñas arterias, por medio de una disminución de la expresión de ET_A y de ET_B. Esto sugiere que bosentan puede ser útil en el tratamiento de ciertas clases de HP en fumadores con EPOC [258, 259]. Por otra parte también aportamos un mecanismo de acción novedoso mediante el cual el EHT incrementa la expresión de los ET_B a través de un mecanismo de alimentación positiva mediado por la liberación de ET y la activación de ERK 1/2, RhoA-GTP y ERO intracelular. Todas estas vías intracelulares fueron atenuadas con el bosentan.

El que nuestros resultados sean aplicables a la inhalación de HT *in vivo* depende de la aceptación de que los componentes del HT alcancen el lecho vascular de las arterias pulmonares más pequeñas. Existen varias observaciones refuerzan esta hipótesis:

- Los componentes del HT son transportados rápidamente al torrente sanguíneo mientras se está fumando (1 min.) (21), lo que sugiere la existencia de un rápido equilibrio a través de la superficie de intercambio de gases.
- Muchos de los componentes del HT son altamente hidrosolubles, como el peroxinitrito (considerado como un potente agente de remodelación de las arterias pulmonares) [260], lo que les permite disolverse fácilmente en el revestimiento alveolar y el líquido intersticial.
- El intercambio gaseoso producido durante el proceso respiratorio se encuentra demostrado en vasos pulmonares de hasta 3mm [261], por lo tanto el HT podría tener acceso a las arterias pulmonares más pequeñas. En nuestros experimentos obtuvimos los mismos resultados tanto en células obtenidas de arterias de 3mm como en pequeñas arterias intrapulmonares de 100 μ m de diámetro interno (experimentos realizados con cortes de precisión).
- Después de fumar, los componentes del HT se encuentran en la circulación sanguínea durante varias horas [262], lo que permite la exposición continua al lecho vascular pulmonar mientras se produce la recirculación.

Es complicado estimar la concentración de componentes del HT en el lecho vascular. En este estudio hemos utilizado EHT a una concentración del 2,5-10%, que aproximadamente debe corresponder a la exposición asociada al consumo de 0,5-2 paquetes de tabaco al día [237]; por lo tanto, nuestro experimento refleja el significado biológico del hábito de fumar.

Parece que el sistema ET tiene una gran importancia en el inicio y el progreso del remodelado vascular pulmonar. De hecho, los niveles de ET-1 en el condensado del aliento exhalado y los niveles de ET-1 circulante están incrementados en pacientes EPOC con HP, y ambos están correlacionados con la presión pulmonar sistólica [263]. Por otra parte, animales expuestos a HT muestran un aumento en los niveles basales de ET-1 y contractilidad vascular, lo que puede contribuir a la patofisiología pulmonar asociada con el HT [264].

Actualmente existen estudios realizados en arterias de ratas procedentes de diferentes tejidos (como cerebro, mesenterio y riñón) que concluyen que el EHT provoca una sobre-expresión de ET_B y ET_A mediante un mecanismo que implica la activación o fosforilación de ERK 1/2, p38, c-Jun N-terminal quinasa (JNK), proteína quinasa C y del factor nuclear kappa B (NF-kB) [248, 265, 266]. Sin embargo, no existen estudios recientes sobre el efecto del HT en la expresión de receptores de ET en arterias pulmonares humanas.

En este estudio hemos observado por primera vez que el aumento de proteína y de la expresión génica de ET_A y ET_B debida a la estimulación con

EHT puede ser contrarrestada por bosentan (antagonista dual) , así como por el antagonista selectivo de ET_A, BQ123. Por el contrario, el antagonista selectivo de ET_B, BQ788, sólo impidió la sobre-expresión de ET_B.

Este proceso lo podemos explicar, en parte, a través de un mecanismo de retroalimentación mediado por la liberación de ET. En este sentido, el EHT fue capaz de aumentar los niveles de ET en el sobrenadante, y éstos fueron consiguientemente suprimidos por el bosentan y el BQ123 y, en menor medida, por el BQ788. Aparentemente estos resultados serían contrarios a los estudios previos consultados donde la exposición a BQ788 y bosentan aumentan el ARNm de ET-1 en células endoteliales [267]. Podríamos decir que este efecto es debido a que los niveles extracelulares de ET-1 desaparecen vía endocitosis de la ET_B. De este modo, su bloqueo impide la limpieza de ET-1 extracelular, induciendo la sobre-expresión de ET-1. Sin embargo, los resultados observados en este estudio fueron obtenidos en un contexto totalmente diferente. El HT aumenta la liberación de ET en células endoteliales y células de músculo liso de vías aéreas, tal y como se comenta anteriormente [268, 269].

En este estudio, observamos que la liberación de ET en CMLAPhs inducida por el EHT fue mediada por un mecanismo que incluye la generación de ERO, fosforilación ERK 1/2 y la activación de RhoA-GTP. Este mismo mecanismo es el que observamos en el estudio anterior en células endoteliales de arteria pulmonar [270].

Debido a que este bloqueo de receptores de ET es capaz de atenuar las ERO inducidas por el HT, la fosforilación de ERK 1/2 y la activación de RhoA-GTP,

es razonable asumir que el antagonismo de receptores de ET inhibe la liberación de ET inducida por el HT.

Por otra parte, de igual forma que sucede con el EHT, al incubar con ET-1 las CMLAPH también fueron capaz de aumentar la expresión de ET_B y ET_A , lo que confirma los resultados similares que obtuvimos en CEAPHs [270].

Con todo esto podríamos plantear una hipótesis:

Sabemos que las células endoteliales (CEAPHs) son el principal reservorio de ET-1, por lo tanto, al exponerlas al HT se produce un aumento de ET-1. A su vez esta ET-1 puede interactuar con las células del músculo liso (CMLAPHs) provocando así un aumento de la expresión de receptores de ET. Por lo tanto, no se puede descartar un efecto directo de la ET-1 en la sobre-expresión de receptores de ET en CMLAPHs inducida por el HT.

También queremos resaltar el hecho de que la estimulación con ET-1 conduce a una elevada expresión de ET_{A_v} , comparándolo con la expresión de ET_A que se produce ante la exposición al EHT (esto lo podemos observar comparando la figura 46 A con la figura 47 C).

Por lo tanto, ya que podemos decir que la expresión de ET_A está inducida habitualmente por la ET-1, podríamos decir que la nula eficacia del BQ788 a la hora de bloquear la expresión de ET_A inducida por el EHT puede deberse a este bajo efecto en la liberación de ET inducida por el EHT.

Es conocido que las ERO intracelular podrían activar varias secuencias intracelulares, como la PKC, diferentes quinasas mitogénicas (p.e. ERK 1/2,

p38 y JNK) y factores de transcripción (p.e. NF- κ B) [271]. De hecho, estudios recientes han mostrado que todas estas secuencias están implicadas en la expresión de ET_A y ET_B inducido por el EHT en arterias basílicas de rata [265, 266]. Además, tanto el EHT como la ET-1 activan la reducción del complejo nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa para producir ERO intracelular [272, 273]. De manera interesante, tanto las especies de oxígeno del EHT (H₂O₂) como las ERO intracelular median la liberación de ET-1 a través de la liberación de ET_A, ya que fue mostrado que el BQ123 los inhibe en CMLAPs fetales [273].

En este estudio hemos visto como el antioxidante NAC, el bosentan y el BQ123 atenuaron la producción de ERO inducida por el EHT, y la sobre-expresión de ET_A y ET_B. En contraste, el BQ788 no influenció los niveles de ERO y ET_A inducido por el EHT. Estos resultados deben explicar, en parte, la ausencia de efecto de BQ788 sobre la expresión de ET_A inducida por el EHT. Sin embargo, el PD98059, inhibidor de ERK1/2, sí que logró atenuar la expresión de ET_A y ET_B inducida por el EHT (figura 2A) y por la ET-1 (figura 2C), lo que está de acuerdo con estudios previos en modelos animales [248, 265].

En este sentido, el bosentan, BQ123 y en menor medida, BQ788 evitaron la fosforilación de ERK1/2, poniendo de relieve por tanto el papel de ERK 1/2 en la sobre-expresión de receptores de ET inducida por el EHT.

Es conocido que en pacientes fumadores que padecen EPOC se encuentra aumentada la expresión de Rho-GTP así como la ruta aguas abajo del factor

Rho-quinasa, el cual se encuentra involucrado en la disfunción endotelial, la contractilidad vascular y el remodelado vascular [274].

Tal y como mostramos en el primer estudio de esta tesis con las CEAPHs [270], la habilidad del EHT para incrementar la actividad de la RhoA-GTP fue bloqueada mediante el tratamiento con bosentan, BQ123 y en menor medida, con BQ788. Además, el Y23670, inhibidor de la Rho-quinasa, frenó la sobre-expresión de ET_A y ET_B inducida por el EHT y por la ET-1, lo cual implica la activación de la RhoA-GTP en el proceso de la expresión de receptor de ET.

Durante el transcurso del remodelado vascular, la proliferación de CMLAPs contribuye al aumento del espesor de la íntima. En estudios anteriores nos decían que existe relación entre el HT y la proliferación vascular de células del músculo liso [275], mediante un mecanismo que implica la activación de ERK 1/2.

En este estudio, observamos que bosentan, BQ123 y el BQ788 evitaron la proliferación de CMLAPs en un proceso que implica a ambas formas del receptor de ET. Sumado a esto, la proliferación de las CMLAPs estuvo mediada por la activación de ERO intracelular, ERK 1/2 y la Rho-quinasa, así como por la acción autocrina de la ET.

Con respecto a la $[Ca^{2+}]_i$, en experimentos previos, se concluyó que la exposición al EHT aumenta significativamente la concentración de $[Ca^{2+}]_i$ inducida por pulsos agudos de ET-1. Una investigación más profunda reveló, de acuerdo con que la expresión de ET_A y ET_B es inducida por el EHT, la

eficacia inhibitoria de bosentan, BQ123 y BQ788 en los resultados derivados del EHT.

Basándonos en estos resultados *in vitro* que hemos obtenido, intentamos traducir el efecto del EHT sobre pequeñas arterias intrapulmonares mediante un modelo de cortes de precisión del pulmón. Tal y como se explica anteriormente, sabemos por estudios previos al nuestro que el remodelado vascular de arteria pulmonar se produce en pequeños vasos intrapulmonares de resistencia (<3mm) y arterias precapilares (de diámetro interno ~20mm), los cuales forman parte del lecho vascular pulmonar responsable de la elevada presión observada en la HP [209].

En este estudio, encontramos que en cortes de precisión realizados en estas pequeñas arterias intrapulmonares, tanto en las CMLAPHs como en las CEAPHs, tras la exposición al EHT se encontraban sobre-expresados ET_A y ET_B. Ante este fenómeno bosentan y , en menor medida BQ123 inhibieron la sobre-expresión de dichos receptores, mientras que BQ788 sólo atenuó la sobre-expresión de ET_B, lo cual se corresponde con los datos celulares que obtuvimos *in vitro*.

Como resultado de la sobre-expresión de receptores de ET inducida por EHT, se observó que estímulos agudos posteriores con ET producían un incremento en la contracción arterial pulmonar. Este efecto fue bloqueado por bosentan y, en menor medida, por BQ123 y por BQ788. Estos resultados deben ser considerados como un modelo de aproximación de condiciones *in vivo*, ya que encontramos que en arterias pulmonares

aisladas de pacientes fumadores y que padecen EPOC se produce sobre-expresión de ET_A y ET_B.

A pesar de las secuencias mecánicas noveles estudiadas en este artículo, somos conscientes de las limitaciones del estudio:

- En primer lugar, hemos llevado a cabo un modelo de exposición aguda al EHT (24h), pero el deterioro progresivo de la hemodinámica pulmonar en humanos está inducida únicamente por la exposición crónica al HT durante muchos años.
- En segundo lugar, los estudios *in vitro* no son siempre representativos de los resultados *in vivo*, ya que un número de sustancias son liberadas por el HT y contrarrestan diferentes tipos celulares a la vez; por consiguiente, los resultados observados en CMLAPhs aisladas pueden ser diferentes *in vivo*.
- En tercer lugar, a pesar de que hemos detectado una sobre-expresión de receptores de ET en arterias pulmonares de pacientes fumadores y pacientes con EPOC, ninguno de ellos mostraron HP, así que si pacientes con EPOC que padecen HP poseen una sobre-expresión de receptores de ET o si el bosentan atenúa la sobre-expresión de dichos receptores *in vivo* queda como incógnita.

Los resultados de este estudio indican que el bosentan, antagonista dual de receptores de ET, efectivamente disminuye la sobre-expresión de dichos receptores provocada por el EHT en las CMLAPhs y pequeñas arterias intrapulmonares. Este efecto inhibitorio directo podría explicar los efectos

beneficiosos del bosentan en ciertas formas de HP desproporcionada en pacientes con EPOC.

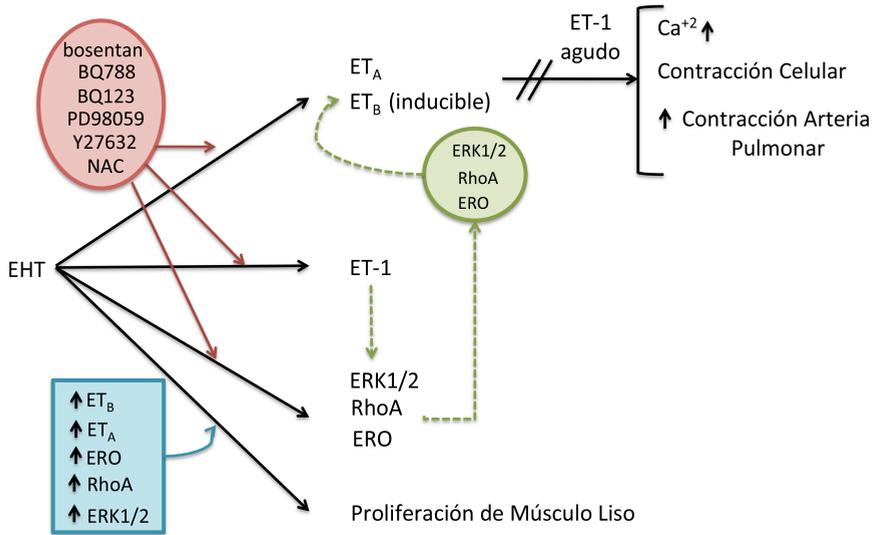


Figura 54. Estudio II: El extracto de humo de tabaco (EHT) produce la sobre-expresión de los receptores de endotelina A y B (ET_A y ET_B) en células de músculo liso en arteria pulmonar humana (CMLAPHS). Dicha sobre-expresión está mediada por un mecanismo de retroalimentación positiva activada por la endotelina-1 (ET-1), así como por la activación de ERK 1/2, RhoA-GTP y especies reactivas de oxígeno (ERO). Los antagonistas duales de los receptores de endotelina (ETRs) bosentan, así como los antagonistas específicos de los receptores ET_A y ET_B, reducen la sobre-expresión de lo ETRs inducida por EHT. Este hecho atenúa la proliferación y contracción de CMLAPHS, así como el aumento de la tensión pulmonar de pequeñas arterias inducida por pulsos agudos de ET-1.

CONCLUSIONES

1. La exposición al HT aumenta la expresión de ET_B en células CEAPhs a través de la liberación de ET-1.
2. Bosentan y BQ788 evitan la sobre-expresión de ET_B inducida por el EHT.
3. La sobre-expresión de ET_B sensibiliza a las CEAPhs a la posterior estimulación con ET-1 exógena. Como consecuencia de este efecto se produce un aumento de los niveles de Ca²⁺ intracelular, contracción celular, aumento de la permeabilidad y una disminución de los niveles de NO y aumento de TxA2 y ERO, que desemboca en un aumento de la disfunción endotelial pulmonar.
4. La sobre-expresión de ET_B inducida por EHT también se encuentra, en parte, mediada por la actividad de RhoA y la producción de ERO. Y esta acción fue completamente inhibida por bosentan y BQ788, lo que nos demuestra que en un contexto inflamatorio, como la exposición crónica al HT, la sobre-expresión de ET_B potencia la disfunción endotelial inducida por ET-1.
5. Encontramos sobre-expresión de ET_B en endotelio de arterias pulmonares de pacientes fumadores y pacientes fumadores EPOC, mientras que no detectamos este fenómeno en pacientes sanos. Esto puede corroborar el papel del HT en la expresión de ET_B *in vivo*.

6. La exposición crónica al HT es responsable del remodelado vascular pulmonar, y el sistema ET está directamente implicado en el mismo.
7. El EHT incrementa la expresión de ETRs en CMLAPHS a través de un mecanismo de alimentación positiva, mediado por la liberación de ET, la activación de ERK 1/2, RhoA-GTP y ERO intracelular. Todas estas vías son inhibidas por bosentan.
8. El antagonismo de ETRs inhibe la liberación de ET inducida por el EHT debido a una atenuación de la producción de ERO inducida por el EHT, la fosforilación de ERK 1/2 y la activación de RhoA- GTP.
9. La reducción de la sobre-expresión de ET_A y ET_B mediante fármacos antagonistas a receptores de ET, atenúa la proliferación y contracción de las células musculares, así como la tensión de arterias pulmonares de pequeño calibre responsables del desarrollo de HP. Este fenómeno sugiere que el bosentan podría ser útil en el tratamiento de ciertas clases de HP en pacientes fumadores con EPOC.

BIBLIOGRAFÍA

1. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Goto K, Masaki T: **A novel peptide vasoconstrictor, endothelin, is produced by vascular endothelium and modulates smooth muscle Ca²⁺ channels.** *J Hypertens Suppl* 1988, **6**(4):S188-191.
2. Firth JD, Ratcliffe PJ: **Organ distribution of the three rat endothelin messenger RNAs and the effects of ischemia on renal gene expression.** *The Journal of clinical investigation* 1992, **90**(3):1023-1031.
3. Masaki T: **Historical review: Endothelin.** *Trends in pharmacological sciences* 2004, **25**(4):219-224.
4. Masuda Y, Miyazaki H, Kondoh M, Watanabe H, Yanagisawa M, Masaki T, Murakami K: **Two different forms of endothelin receptors in rat lung.** *FEBS Lett* 1989, **257**(2):208-210.
5. Migneault A, Sauvageau S, Villeneuve L, Thorin E, Fournier A, Leblanc N, Dupuis J: **Chronically elevated endothelin levels reduce pulmonary vascular reactivity to nitric oxide.** *Am J Respir Crit Care Med* 2005, **171**(5):506-513.
6. Davenport AP: **International Union of Pharmacology. XXIX. Update on endothelin receptor nomenclature.** *Pharmacol Rev* 2002, **54**(2):219-226.
7. Shi-Wen X, Rodriguez-Pascual F, Lamas S, Holmes A, Howat S, Pearson JD, Dashwood MR, du Bois RM, Denton CP, Black CM *et al*: **Constitutive ALK5-independent c-Jun N-terminal kinase activation contributes to endothelin-1 overexpression in pulmonary fibrosis: evidence of an autocrine endothelin loop operating through the endothelin A and B receptors.** *Mol Cell Biol* 2006, **26**(14):5518-5527.
8. Sauvageau S, Thorin E, Caron A, Dupuis J: **Evaluation of endothelin-1-induced pulmonary vasoconstriction following myocardial infarction.** *Exp Biol Med (Maywood)* 2006, **231**(6):840-846.
9. Sauvageau S, Thorin E, Caron A, Dupuis J: **Endothelin-1-induced pulmonary vasoreactivity is regulated by ET(A) and ET(B) receptor interactions.** *J Vasc Res* 2007, **44**(5):375-381.
10. Gregan B, Jurgensen J, Papsdorf G, Furkert J, Schaefer M, Beyermann M, Rosenthal W, Oksche A: **Ligand-dependent differences in the internalization of endothelin A and endothelin B receptor heterodimers.** *J Biol Chem* 2004, **279**(26):27679-27687.

11. Gregan B, Schaefer M, Rosenthal W, Oksche A: **Fluorescence resonance energy transfer analysis reveals the existence of endothelin-A and endothelin-B receptor homodimers.** *J Cardiovasc Pharmacol* 2004, **44 Suppl 1**:S30-33.
12. Harada N, Himeno A, Shigematsu K, Sumikawa K, Niwa M: **Endothelin-1 binding to endothelin receptors in the rat anterior pituitary gland: possible formation of an ETA-ETB receptor heterodimer.** *Cell Mol Neurobiol* 2002, **22**(2):207-226.
13. Stannard C, Lehenkari P, Godovac-Zimmermann J: **Functional diversity of endothelin pathways in human lung fibroblasts may be based on structural diversity of the endothelin receptors.** *Biochemistry* 2003, **42**(47):13909-13918.
14. Markewitz BA, Farrukh IS, Chen Y, Li Y, Michael JR: **Regulation of endothelin-1 synthesis in human pulmonary arterial smooth muscle cells. Effects of transforming growth factor-beta and hypoxia.** *Cardiovascular research* 2001, **49**(1):200-206.
15. Shi-Wen X, Chen Y, Denton CP, Eastwood M, Renzoni EA, Bou-Gharios G, Pearson JD, Dashwood M, du Bois RM, Black CM *et al*: **Endothelin-1 promotes myofibroblast induction through the ETA receptor via a rac/phosphoinositide 3-kinase/Akt-dependent pathway and is essential for the enhanced contractile phenotype of fibrotic fibroblasts.** *Molecular biology of the cell* 2004, **15**(6):2707-2719.
16. Knott PG, D'Aprile AC, Henry PJ, Hay DW, Goldie RG: **Receptors for endothelin-1 in asthmatic human peripheral lung.** *British journal of pharmacology* 1995, **114**(1):1-3.
17. Goldie RG, D'Aprile AC, Self GJ, Rigby PJ, Henry PJ: **The distribution and density of receptor subtypes for endothelin-1 in peripheral lung of the rat, guinea-pig and pig.** *British journal of pharmacology* 1996, **117**(4):729-735.
18. Davie N, Haleen SJ, Upton PD, Polak JM, Yacoub MH, Morrell NW, Wharton J: **ET(A) and ET(B) receptors modulate the proliferation of human pulmonary artery smooth muscle cells.** *Am J Respir Crit Care Med* 2002, **165**(3):398-405.
19. Boulanger C, Luscher TF: **Release of endothelin from the porcine aorta. Inhibition by endothelium-derived nitric oxide.** *The Journal of clinical investigation* 1990, **85**(2):587-590.

20. Takahashi M, Matsushita Y, Iijima Y, Tanzawa K: **Purification and characterization of endothelin-converting enzyme from rat lung.** *J Biol Chem* 1993, **268**(28):21394-21398.
21. Levin ER: **Endothelins.** *The New England journal of medicine* 1995, **333**(6):356-363.
22. Matsumoto H, Suzuki N, Onda H, Fujino M: **Abundance of endothelin-3 in rat intestine, pituitary gland and brain.** *Biochemical and biophysical research communications* 1989, **164**(1):74-80.
23. Dupuis J, Goresky CA, Stewart DJ: **Pulmonary removal and production of endothelin in the anesthetized dog.** *J Appl Physiol (1985)* 1994, **76**(2):694-700.
24. Dupuis J, Stewart DJ, Cernacek P, Gosselin G: **Human pulmonary circulation is an important site for both clearance and production of endothelin-1.** *Circulation* 1996, **94**(7):1578-1584.
25. McCulloch KM, Docherty CC, Morecroft I, MacLean MR: **EndothelinB receptor-mediated contraction in human pulmonary resistance arteries.** *British journal of pharmacology* 1996, **119**(6):1125-1130.
26. McCulloch KM, MacLean MR: **EndothelinB receptor-mediated contraction of human and rat pulmonary resistance arteries and the effect of pulmonary hypertension on endothelin responses in the rat.** *J Cardiovasc Pharmacol* 1995, **26 Suppl 3**:S169-176.
27. MacLean MR, Docherty CC, McCulloch KM, Morecroft I: **Effect of novel mixed ETA/ETB antagonists on responses to ET-1 in human small muscular pulmonary arteries.** *Pulmonary pharmacology & therapeutics* 1998, **11**(2-3):147-149.
28. McCulloch KM, Docherty C, MacLean MR: **Endothelin receptors mediating contraction of rat and human pulmonary resistance arteries: effect of chronic hypoxia in the rat.** *British journal of pharmacology* 1998, **123**(8):1621-1630.
29. Hirata Y, Emori T, Eguchi S, Kanno K, Imai T, Ohta K, Marumo F: **Endothelin receptor subtype B mediates synthesis of nitric oxide by cultured bovine endothelial cells.** *The Journal of clinical investigation* 1993, **91**(4):1367-1373.
30. Lal H, Woodward B, Williams KI: **Investigation of the contributions of nitric oxide and prostaglandins to the actions of endothelins**

- and sarafotoxin 6c in rat isolated perfused lungs. *British journal of pharmacology* 1996, **118**(8):1931-1938.
31. Dupuis J, Jasmin JF, Prie S, Cernacek P: **Importance of local production of endothelin-1 and of the ET(B)Receptor in the regulation of pulmonary vascular tone.** *Pulmonary pharmacology & therapeutics* 2000, **13**(3):135-140.
 32. Muramatsu M, Oka M, Morio Y, Soma S, Takahashi H, Fukuchi Y: **Chronic hypoxia augments endothelin-B receptor-mediated vasodilation in isolated perfused rat lungs.** *The American journal of physiology* 1999, **276**(2 Pt 1):L358-364.
 33. Dong F, Zhang X, Wold LE, Ren Q, Zhang Z, Ren J: **Endothelin-1 enhances oxidative stress, cell proliferation and reduces apoptosis in human umbilical vein endothelial cells: role of ETB receptor, NADPH oxidase and caveolin-1.** *British journal of pharmacology* 2005, **145**(3):323-333.
 34. Hocher B, Schwarz A, Fagan KA, Thone-Reineke C, El-Hag K, Kusserow H, Elitok S, Bauer C, Neumayer HH, Rodman DM *et al*: **Pulmonary fibrosis and chronic lung inflammation in ET-1 transgenic mice.** *American journal of respiratory cell and molecular biology* 2000, **23**(1):19-26.
 35. Dupuis J, Hoeper MM: **Endothelin receptor antagonists in pulmonary arterial hypertension.** *The European respiratory journal* 2008, **31**(2):407-415.
 36. Battistini B, Dussault P: **Blocking of the endothelin system: the development of receptor antagonists.** *Pulmonary pharmacology & therapeutics* 1998, **11**(2-3):97-112.
 37. Vatter H, Seifert V: **Ambrisentan, a non-peptide endothelin receptor antagonist.** *Cardiovascular drug reviews* 2006, **24**(1):63-76.
 38. Michel RP, Langleben D, Dupuis J: **The endothelin system in pulmonary hypertension.** *Canadian journal of physiology and pharmacology* 2003, **81**(6):542-554.
 39. Giaid A, Yanagisawa M, Langleben D, Michel RP, Levy R, Shennib H, Kimura S, Masaki T, Duguid WP, Stewart DJ: **Expression of endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension.** *The New England journal of medicine* 1993, **328**(24):1732-1739.

40. Bressollette E, Dupuis J, Bonan R, Doucet S, Cernacek P, Tardif JC: **Intravascular ultrasound assessment of pulmonary vascular disease in patients with pulmonary hypertension.** *Chest* 2001, **120**(3):809-815.
41. Rubens C, Ewert R, Halank M, Wensel R, Orzechowski HD, Schultheiss HP, Hoeffken G: **Big endothelin-1 and endothelin-1 plasma levels are correlated with the severity of primary pulmonary hypertension.** *Chest* 2001, **120**(5):1562-1569.
42. Dupuis J, Cernacek P, Tardif JC, Stewart DJ, Gosselin G, Dyrda I, Bonan R, Crepeau J: **Reduced pulmonary clearance of endothelin-1 in pulmonary hypertension.** *American heart journal* 1998, **135**(4):614-620.
43. Dupuis J, Goresky CA, Fournier A: **Pulmonary clearance of circulating endothelin-1 in dogs in vivo: exclusive role of ETB receptors.** *Journal of applied physiology* 1996, **81**(4):1510-1515.
44. Langleben D, Dupuis J, Langleben I, Hirsch AM, Baron M, Senecal JL, Giovinazzo M: **Etiology-specific endothelin-1 clearance in human precapillary pulmonary hypertension.** *Chest* 2006, **129**(3):689-695.
45. Prie S, Stewart DJ, Dupuis J: **EndothelinA receptor blockade improves nitric oxide-mediated vasodilation in monocrotaline-induced pulmonary hypertension.** *Circulation* 1998, **97**(21):2169-2174.
46. Dupuis J, Prie S: **The ET(A)-Receptor Antagonist LU 135252 Prevents the Progression of Established Pulmonary Hypertension Induced by Monocrotaline in Rats.** *Journal of cardiovascular pharmacology and therapeutics* 1999, **4**(1):33-39.
47. Prie S, Leung TK, Cernacek P, Ryan JW, Dupuis J: **The orally active ET(A) receptor antagonist (+)-(S)-2-(4,6-dimethoxy-pyrimidin-2-ylloxy)-3-methoxy-3,3-diphenyl-propionic acid (LU 135252) prevents the development of pulmonary hypertension and endothelial metabolic dysfunction in monocrotaline-treated rats.** *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 1997, **282**(3):1312-1318.
48. Rabe KF, Hurd S, Anzueto A, Barnes PJ, Buist SA, Calverley P, Fukuchi Y, Jenkins C, Rodriguez-Roisin R, van Weel C *et al*: **Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of**

- chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary.** *Am J Respir Crit Care Med* 2007, **176**(6):532-555.
49. 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.
 50. Chapman KR: **Chronic obstructive pulmonary disease: are women more susceptible than men?** *Clinics in chest medicine* 2004, **25**(2):331-341.
 51. 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.** *The British journal of general practice : the journal of the Royal College of General Practitioners* 1994, **44**(383):259-262.
 52. Jemal A, Ward E, Hao Y, Thun M: **Trends in the leading causes of death in the United States, 1970-2002.** *Jama* 2005, **294**(10):1255-1259.
 53. Andersson F, Borg S, Jansson SA, Jonsson AC, Ericsson A, Prutz C, Ronmark E, Lundback B: **The costs of exacerbations in chronic obstructive pulmonary disease (COPD).** *Respir Med* 2002, **96**(9):700-708.
 54. Jansson SA, Andersson F, Borg S, Ericsson A, Jonsson E, Lundback B: **Costs of COPD in Sweden according to disease severity.** *Chest* 2002, **122**(6):1994-2002.
 55. Strassels SA, Smith DH, Sullivan SD, Mahajan PS: **The costs of treating COPD in the United States.** *Chest* 2001, **119**(2):344-352.
 56. Grasso ME, Weller WE, Shaffer TJ, Diette GB, Anderson GF: **Capitation, managed care, and chronic obstructive pulmonary disease.** *Am J Respir Crit Care Med* 1998, **158**(1):133-138.
 57. Fauroux B, Howard P, Muir JF: **Home treatment for chronic respiratory insufficiency: the situation in Europe in 1992. The European Working Group on Home Treatment for Chronic Respiratory Insufficiency.** *The European respiratory journal* 1994, **7**(9):1721-1726.
 58. 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.** *The European respiratory journal* 2006, **27**(2):397-412.

59. Murray CJ, Lopez AD: **Evidence-based health policy--lessons from the Global Burden of Disease Study.** *Science* 1996, **274**(5288):740-743.
60. 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.
61. Mathers CD, Loncar D: **Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030.** *PLoS medicine* 2006, **3**(11):e442.
62. Celli BR, Halbert RJ, Nordyke RJ, Schau B: **Airway obstruction in never smokers: results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey.** *The American journal of medicine* 2005, **118**(12):1364-1372.
63. Behrendt CE: **Mild and moderate-to-severe COPD in nonsmokers: distinct demographic profiles.** *Chest* 2005, **128**(3):1239-1244.
64. Anthonisen NR, Connett JE, Murray RP: **Smoking and lung function of Lung Health Study participants after 11 years.** *Am J Respir Crit Care Med* 2002, **166**(5):675-679.
65. Stoller JK, Aboussouan LS: **Alpha1-antitrypsin deficiency.** *Lancet* 2005, **365**(9478):2225-2236.
66. Blanco I, de Serres FJ, Fernandez-Bustillo E, Lara B, Miravittles M: **Estimated numbers and prevalence of PI*S and PI*Z alleles of alpha1-antitrypsin deficiency in European countries.** *The European respiratory journal* 2006, **27**(1):77-84.
67. McCloskey SC, Patel BD, Hinchliffe SJ, Reid ED, Wareham NJ, Lomas DA: **Siblings of patients with severe chronic obstructive pulmonary disease have a significant risk of airflow obstruction.** *Am J Respir Crit Care Med* 2001, **164**(8 Pt 1):1419-1424.
68. Silverman EK, Mosley JD, Palmer LJ, Barth M, Senter JM, Brown A, Drazen JM, Kwiatkowski DJ, Chapman HA, Campbell EJ *et al*: **Genome-wide linkage analysis of severe, early-onset chronic obstructive pulmonary disease: airflow obstruction and chronic bronchitis phenotypes.** *Human molecular genetics* 2002, **11**(6):623-632.
69. Wu L, Chau J, Young RP, Pokorny V, Mills GD, Hopkins R, McLean L, Black PN: **Transforming growth factor-beta1 genotype and susceptibility to chronic obstructive pulmonary disease.** *Thorax* 2004, **59**(2):126-129.

70. Smith CA, Harrison DJ: **Association between polymorphism in gene for microsomal epoxide hydrolase and susceptibility to emphysema.** *Lancet* 1997, **350**(9078):630-633.
71. Huang SL, Su CH, Chang SC: **Tumor necrosis factor-alpha gene polymorphism in chronic bronchitis.** *Am J Respir Crit Care Med* 1997, **156**(5):1436-1439.
72. Burrows B, Knudson RJ, Cline MG, Lebowitz MD: **Quantitative relationships between cigarette smoking and ventilatory function.** *The American review of respiratory disease* 1977, **115**(2):195-205.
73. Becklake MR: **Occupational exposures: evidence for a causal association with chronic obstructive pulmonary disease.** *The American review of respiratory disease* 1989, **140**(3 Pt 2):S85-91.
74. 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.** *The European respiratory journal* 2003, **22**(3):462-469.
75. Matheson MC, Benke G, Raven J, Sim MR, Kromhout H, Vermeulen R, Johns DP, Walters EH, Abramson MJ: **Biological dust exposure in the workplace is a risk factor for chronic obstructive pulmonary disease.** *Thorax* 2005, **60**(8):645-651.
76. 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.** *American journal of epidemiology* 2002, **156**(8):738-746.
77. Jindal SK, Aggarwal AN, Chaudhry K, Chhabra SK, D'Souza GA, Gupta D, Katiyar SK, Kumar R, Shah B, Vijayan VK *et al*: **A multicentric study on epidemiology of chronic obstructive pulmonary disease and its relationship with tobacco smoking and environmental tobacco smoke exposure.** *The Indian journal of chest diseases & allied sciences* 2006, **48**(1):23-29.
78. Al-Fayez SF, Salleh M, Ardawi M, Zahran FM: **Effects of sheesha and cigarette smoking on pulmonary function of Saudi males and females.** *Tropical and geographical medicine* 1988, **40**(2):115-123.
79. 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.** *Environmental health : a global access science source* 2005, **4**(1):7.
80. Leuenberger P, Schwartz J, Ackermann-Liebrich U, Blaser K, Bolognini G, Bongard JP, Brandli O, Braun P, Bron C, Brutsche M *et al*: **Passive smoking exposure in adults and chronic respiratory symptoms (SAPALDIA Study).** **Swiss Study on Air Pollution and Lung Diseases in Adults, SAPALDIA Team.** *Am J Respir Crit Care Med* 1994, **150**(5 Pt 1):1222-1228.
81. Dayal HH, Khuder S, Sharrar R, Trieff N: **Passive smoking in obstructive respiratory disease in an industrialized urban population.** *Environmental research* 1994, **65**(2):161-171.
82. 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.
83. Holt PG: **Immune and inflammatory function in cigarette smokers.** *Thorax* 1987, **42**(4):241-249.
84. MacNee W: **Pulmonary and systemic oxidant/antioxidant imbalance in chronic obstructive pulmonary disease.** *Proceedings of the American Thoracic Society* 2005, **2**(1):50-60.
85. Barnes PJ, Shapiro SD, Pauwels RA: **Chronic obstructive pulmonary disease: molecular and cellular mechanisms.** *The European respiratory journal* 2003, **22**(4):672-688.
86. Hogg JC: **Pathophysiology of airflow limitation in chronic obstructive pulmonary disease.** *Lancet* 2004, **364**(9435):709-721.
87. 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.
88. Hogg JC, Chu F, Utokaparch S, Woods R, Elliott WM, Buzatu L, Cherniack RM, Rogers RM, Sciurba FC, Coxson HO *et al*: **The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease.** *The New England journal of medicine* 2004, **350**(26):2645-2653.
89. Cosio MG, Majo J, Cosio MG: **Inflammation of the airways and lung parenchyma in COPD: role of T cells.** *Chest* 2002, **121**(5 Suppl):160S-165S.

90. 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.
91. Birring SS, Brightling CE, Bradding P, Entwisle JJ, Vara DD, Grigg J, Wardlaw AJ, Pavord ID: **Clinical, radiologic, and induced sputum features of chronic obstructive pulmonary disease in nonsmokers: a descriptive study.** *Am J Respir Crit Care Med* 2002, **166**(8):1078-1083.
92. Vestbo J, Hurd SS, Agusti AG, Jones PW, Vogelmeier C, Anzueto A, Barnes PJ, Fabbri LM, Martinez FJ, Nishimura M *et al*: **Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary.** *Am J Respir Crit Care Med* 2013, **187**(4):347-365.
93. Barnes PJ: **Mediators of chronic obstructive pulmonary disease.** *Pharmacol Rev* 2004, **56**(4):515-548.
94. Rahman I: **Oxidative stress in pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease: cellular and molecular mechanisms.** *Cell biochemistry and biophysics* 2005, **43**(1):167-188.
95. MacNee W: **Oxidative stress and lung inflammation in airways disease.** *European journal of pharmacology* 2001, **429**(1-3):195-207.
96. Ito K, Ito M, Elliott WM, Cosio B, Caramori G, Kon OM, Barczyk A, Hayashi S, Adcock IM, Hogg JC *et al*: **Decreased histone deacetylase activity in chronic obstructive pulmonary disease.** *The New England journal of medicine* 2005, **352**(19):1967-1976.
97. O'Donnell DE, Revill SM, Webb KA: **Dynamic hyperinflation and exercise intolerance in chronic obstructive pulmonary disease.** *Am J Respir Crit Care Med* 2001, **164**(5):770-777.
98. 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.
99. Barbera JA, Peinado VI, Santos S: **Pulmonary hypertension in chronic obstructive pulmonary disease.** *Eur Respir J* 2003, **21**(5):892-905.
100. Wouters EF, Creutzberg EC, Schols AM: **Systemic effects in COPD.** *Chest* 2002, **121**(5 Suppl):127S-130S.

101. Agusti AG, Noguera A, Sauleda J, Sala E, Pons J, Busquets X: **Systemic effects of chronic obstructive pulmonary disease.** *The European respiratory journal* 2003, **21**(2):347-360.
102. Similowski T, Agusti A, MacNee W, Schonhofer B: **The potential impact of anaemia of chronic disease in COPD.** *The European respiratory journal* 2006, **27**(2):390-396.
103. 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.
104. Wedzicha JA: **Exacerbations: etiology and pathophysiologic mechanisms.** *Chest* 2002, **121**(5 Suppl):136S-141S.
105. Drost EM, Skwarski KM, Sauleda J, Soler N, Roca J, Agusti A, MacNee W: **Oxidative stress and airway inflammation in severe exacerbations of COPD.** *Thorax* 2005, **60**(4):293-300.
106. Parker CM, Voduc N, Aaron SD, Webb KA, O'Donnell DE: **Physiological changes during symptom recovery from moderate exacerbations of COPD.** *The European respiratory journal* 2005, **26**(3):420-428.
107. Rodriguez-Roisin R, Anzueto A, Bourbeau J, Committee GE: **Pocket guide to COPD diagnosis, management, and prevention.** *Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease* 2011.
108. Lange P, Nyboe J, Appleyard M, Jensen G, Schnohr P: **Ventilatory function and chronic mucus hypersecretion as predictors of death from lung cancer.** *The American review of respiratory disease* 1990, **141**(3):613-617.
109. Skillrud DM, Offord KP, Miller RD: **Higher risk of lung cancer in chronic obstructive pulmonary disease. A prospective, matched, controlled study.** *Annals of internal medicine* 1986, **105**(4):503-507.
110. Stavem K, Aaser E, Sandvik L, Bjornholt JV, Erikssen G, Thaulow E, Erikssen J: **Lung function, smoking and mortality in a 26-year follow-up of healthy middle-aged males.** *The European respiratory journal* 2005, **25**(4):618-625.
111. Tockman MS, Anthonisen NR, Wright EC, Donithan MG: **Airways obstruction and the risk for lung cancer.** *Annals of internal medicine* 1987, **106**(4):512-518.

112. Tashkin DP, Ferguson GT: **Combination bronchodilator therapy in the management of chronic obstructive pulmonary disease.** *Respir Res* 2013, **14**:49.
113. 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.
114. Burge PS, Calverley PM, Jones PW, Spencer S, Anderson JA, Maslen TK: **Randomised, double blind, placebo controlled study of fluticasone propionate in patients with moderate to severe chronic obstructive pulmonary disease: the ISOLDE trial.** *Bmj* 2000, **320**(7245):1297-1303.
115. Pauwels RA, Lofdahl CG, Laitinen LA, Schouten JP, Postma DS, Pride NB, Ohlsson SV: **Long-term treatment with inhaled budesonide in persons with mild chronic obstructive pulmonary disease who continue smoking. European Respiratory Society Study on Chronic Obstructive Pulmonary Disease.** *The New England journal of medicine* 1999, **340**(25):1948-1953.
116. Vestbo J, Sorensen T, Lange P, Brix A, Torre P, Viskum K: **Long-term effect of inhaled budesonide in mild and moderate chronic obstructive pulmonary disease: a randomised controlled trial.** *Lancet* 1999, **353**(9167):1819-1823.
117. Al-Showair RA, Tarsin WY, Assi KH, Pearson SB, Chrystyn H: **Can all patients with COPD use the correct inhalation flow with all inhalers and does training help?** *Respir Med* 2007, **101**(11):2395-2401.
118. Ericsson CH, Svartengren K, Svartengren M, Mossberg B, Philipson K, Blomquist M, Camner P: **Repeatability of airway deposition and tracheobronchial clearance rate over three days in chronic bronchitis.** *The European respiratory journal* 1995, **8**(11):1886-1893.
119. Kim CS, Kang TC: **Comparative measurement of lung deposition of inhaled fine particles in normal subjects and patients with obstructive airway disease.** *Am J Respir Crit Care Med* 1997, **155**(3):899-905.

120. Datta D, Vitale A, Lahiri B, ZuWallack R: **An evaluation of nebulized levalbuterol in stable COPD.** *Chest* 2003, **124**(3):844-849.
121. Calverley PM, Anderson JA, Celli B, Ferguson GT, Jenkins C, Jones PW, Yates JC, Vestbo J, investigators T: **Salmeterol and fluticasone propionate and survival in chronic obstructive pulmonary disease.** *The New England journal of medicine* 2007, **356**(8):775-789.
122. Boyd G, Morice AH, Pounsford JC, Siebert M, Peslis N, Crawford C: **An evaluation of salmeterol in the treatment of chronic obstructive pulmonary disease (COPD).** *The European respiratory journal* 1997, **10**(4):815-821.
123. Cazzola M, Matera MG, Santangelo G, Vinciguerra A, Rossi F, D'Amato G: **Salmeterol and formoterol in partially reversible severe chronic obstructive pulmonary disease: a dose-response study.** *Respir Med* 1995, **89**(5):357-362.
124. Rossi A, Kristufek P, Levine BE, Thomson MH, Till D, Kottakis J, Della Cioppa G, Formoterol in Chronic Obstructive Pulmonary Disease IISG: **Comparison of the efficacy, tolerability, and safety of formoterol dry powder and oral, slow-release theophylline in the treatment of COPD.** *Chest* 2002, **121**(4):1058-1069.
125. Ulrik CS: **Efficacy of inhaled salmeterol in the management of smokers with chronic obstructive pulmonary disease: a single centre randomised, double blind, placebo controlled, crossover study.** *Thorax* 1995, **50**(7):750-754.
126. Tashkin DP, Fabbri LM: **Long-acting beta-agonists in the management of chronic obstructive pulmonary disease: current and future agents.** *Respir Res* 2010, **11**:149.
127. Pedersen SE, Hurd SS, Lemanske RF, Jr., Becker A, Zar HJ, Sly PD, Soto-Quiroz M, Wong G, Bateman ED, Global Initiative for A: **Global strategy for the diagnosis and management of asthma in children 5 years and younger.** *Pediatric pulmonology* 2011, **46**(1):1-17.
128. Disse B, Speck GA, Rominger KL, Witek TJ, Jr., Hammer R: **Tiotropium (Spiriva): mechanistical considerations and clinical profile in obstructive lung disease.** *Life sciences* 1999, **64**(6-7):457-464.
129. Aubier M: **Pharmacotherapy of respiratory muscles.** *Clinics in chest medicine* 1988, **9**(2):311-324.

130. McKay SE, Howie CA, Thomson AH, Whiting B, Addis GJ: **Value of theophylline treatment in patients handicapped by chronic obstructive lung disease.** *Thorax* 1993, **48**(3):227-232.
131. Moxham J: **Aminophylline and the respiratory muscles: an alternative view.** *Clinics in chest medicine* 1988, **9**(2):325-336.
132. Murciano D, Auclair MH, Pariente R, Aubier M: **A randomized, controlled trial of theophylline in patients with severe chronic obstructive pulmonary disease.** *The New England journal of medicine* 1989, **320**(23):1521-1525.
133. Taylor DR, Buick B, Kinney C, Lowry RC, McDevitt DG: **The efficacy of orally administered theophylline, inhaled salbutamol, and a combination of the two as chronic therapy in the management of chronic bronchitis with reversible air-flow obstruction.** *The American review of respiratory disease* 1985, **131**(5):747-751.
134. Rossi A, Gottfried SB, Higgs BD, Zocchi L, Grassino A, Milic-Emili J: **Respiratory mechanics in mechanically ventilated patients with respiratory failure.** *J Appl Physiol (1985)* 1985, **58**(6):1849-1858.
135. Bateman ED, Hurd SS, Barnes PJ, Bousquet J, Drazen JM, FitzGerald M, Gibson P, Ohta K, O'Byrne P, Pedersen SE *et al*: **Global strategy for asthma management and prevention: GINA executive summary.** *The European respiratory journal* 2008, **31**(1):143-178.
136. Karner C, Cates CJ: **Combination inhaled steroid and long-acting beta(2)-agonist in addition to tiotropium versus tiotropium or combination alone for chronic obstructive pulmonary disease.** *The Cochrane database of systematic reviews* 2011(3):CD008532.
137. Hak E, van Essen GA, Buskens E, Stalman W, de Melker RA: **Is immunising all patients with chronic lung disease in the community against influenza cost effective? Evidence from a general practice based clinical prospective cohort study in Utrecht, The Netherlands.** *Journal of epidemiology and community health* 1998, **52**(2):120-125.
138. Jackson LA, Neuzil KM, Yu O, Benson P, Barlow WE, Adams AL, Hanson CA, Mahoney LD, Shay DK, Thompson WW *et al*: **Effectiveness of pneumococcal polysaccharide vaccine in older adults.** *The New England journal of medicine* 2003, **348**(18):1747-1755.

139. 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.
140. Albert RK, Connett J, Bailey WC, Casaburi R, Cooper JA, Jr., Criner GJ, Curtis JL, Dransfield MT, Han MK, Lazarus SC *et al*: **Azithromycin for prevention of exacerbations of COPD.** *The New England journal of medicine* 2011, **365**(8):689-698.
141. Isada CM: **Pro: antibiotics for chronic bronchitis with exacerbations.** *Seminars in respiratory infections* 1993, **8**(4):243-253.
142. Celli BR, MacNee W, Force AET: **Standards for the diagnosis and treatment of patients with COPD: a summary of the ATS/ERS position paper.** *The European respiratory journal* 2004, **23**(6):932-946.
143. Irwin RS, Boulet LP, Cloutier MM, Fuller R, Gold PM, Hoffstein V, Ing AJ, McCool FD, O'Byrne P, Poe RH *et al*: **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.
144. Rodriguez-Roisin R: **Toward a consensus definition for COPD exacerbations.** *Chest* 2000, **117**(5 Suppl 2):398S-401S.
145. Monso E, Rosell A, Bonet G, Manterola J, Cardona PJ, Ruiz J, Morera J: **Risk factors for lower airway bacterial colonization in chronic bronchitis.** *The European respiratory journal* 1999, **13**(2):338-342.
146. Pela R, Marchesani F, Agostinelli C, Staccioli D, Cecarini L, Bassotti C, Sanguinetti CM: **Airways microbial flora in COPD patients in stable clinical conditions and during exacerbations: a bronchoscopic investigation.** *Monaldi archives for chest disease = Archivio Monaldi per le malattie del torace / Fondazione clinica del lavoro, IRCCS [and] Istituto di clinica fisiologica e malattie apparato respiratorio, Universita di Napoli, Secondo ateneo* 1998, **53**(3):262-267.
147. Sethi S, Murphy TF: **Infection in the pathogenesis and course of chronic obstructive pulmonary disease.** *The New England journal of medicine* 2008, **359**(22):2355-2365.
148. Austin MA, Wills KE, Blizzard L, Walters EH, Wood-Baker R: **Effect of high flow oxygen on mortality in chronic obstructive pulmonary**

- disease patients in prehospital setting: randomised controlled trial. *Bmj* 2010, **341**:c5462.
149. Decramer M, Celli B, Kesten S, Lystig T, Mehra S, Tashkin DP, investigators U: **Effect of tiotropium on outcomes in patients with moderate chronic obstructive pulmonary disease (UPLIFT): a prespecified subgroup analysis of a randomised controlled trial.** *Lancet* 2009, **374**(9696):1171-1178.
150. Jenkins CR, Jones PW, Calverley PM, Celli B, Anderson JA, Ferguson GT, Yates JC, Willits LR, Vestbo J: **Efficacy of salmeterol/fluticasone propionate by GOLD stage of chronic obstructive pulmonary disease: analysis from the randomised, placebo-controlled TORCH study.** *Respir Res* 2009, **10**:59.
151. Tashkin DP, Celli B, Senn S, Burkhart D, Kesten S, Menjoge S, Decramer M, Investigators US: **A 4-year trial of tiotropium in chronic obstructive pulmonary disease.** *The New England journal of medicine* 2008, **359**(15):1543-1554.
152. Fabbri LM, Calverley PM, Izquierdo-Alonso JL, Bundschuh DS, Brose M, Martinez FJ, Rabe KF, M, groups Ms: **Roflumilast in moderate-to-severe chronic obstructive pulmonary disease treated with longacting bronchodilators: two randomised clinical trials.** *Lancet* 2009, **374**(9691):695-703.
153. Jeffery PK: **Remodeling and inflammation of bronchi in asthma and chronic obstructive pulmonary disease.** *Proc Am Thorac Soc* 2004, **1**(3):176-183.
154. O'Donnell DE: **Hyperinflation, dyspnea, and exercise intolerance in chronic obstructive pulmonary disease.** *Proc Am Thorac Soc* 2006, **3**(2):180-184.
155. Gorska K, Maskey-Warzechowska M, Krenke R: **Airway inflammation in chronic obstructive pulmonary disease.** *Curr Opin Pulm Med* 2010, **16**(2):89-96.
156. Decramer M, Janssens W, Miravitlles M: **Chronic obstructive pulmonary disease.** *Lancet* 2012, **379**(9823):1341-1351.
157. 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.

158. Burgel PR, Bourdin A, Chanez P, Chabot F, Chaouat A, Chinet T, de Blic J, Devillier P, Deschildre A, Didier A *et al*: **Update on the roles of distal airways in COPD**. *Eur Respir Rev* 2011, **20**(119):7-22.
159. Rennard SI: **Chronic obstructive pulmonary disease: linking outcomes and pathobiology of disease modification**. *Proc Am Thorac Soc* 2006, **3**(3):276-280.
160. Kirkham S, Kolsum U, Rousseau K, Singh D, Vestbo J, Thornton DJ: **MUC5B is the major mucin in the gel phase of sputum in chronic obstructive pulmonary disease**. *Am J Respir Crit Care Med* 2008, **178**(10):1033-1039.
161. Voynow JA, Rubin BK: **Mucins, mucus, and sputum**. *Chest* 2009, **135**(2):505-512.
162. Rogers DF: **Mucociliary dysfunction in COPD: effect of current pharmacotherapeutic options**. *Pulm Pharmacol Ther* 2005, **18**(1):1-8.
163. Stephens MB, Yew KS: **Diagnosis of chronic obstructive pulmonary disease**. *Am Fam Physician* 2008, **78**(1):87-92.
164. Roman A, Barbera JA, Castillo MJ, Munoz R, Escribano P: **Health-related quality of life in a national cohort of patients with pulmonary arterial hypertension or chronic thromboembolic pulmonary hypertension**. *Archivos de bronconeumologia* 2013, **49**(5):181-188.
165. Burgel PR: **The role of small airways in obstructive airway diseases**. *Eur Respir Rev* 2011, **20**(119):23-33.
166. Gosens R, Zaagsma J, Meurs H, Halayko AJ: **Muscarinic receptor signaling in the pathophysiology of asthma and COPD**. *Respir Res* 2006, **7**:73.
167. Matsuba K, Shirakusa T, Kuwano K, Hayashi S, Shigematsu N: **Small airways disease in patients without chronic air-flow limitation**. *Am Rev Respir Dis* 1987, **136**(5):1106-1111.
168. Burgel PR, de Blic J, Chanez P, Delacourt C, Devillier P, Didier A, Dubus JC, Frachon I, Garcia G, Humbert M *et al*: **Update on the roles of distal airways in asthma**. *Eur Respir Rev* 2009, **18**(112):80-95.
169. Scotton CJ, Chambers RC: **Molecular targets in pulmonary fibrosis: the myofibroblast in focus**. *Chest* 2007, **132**(4):1311-1321.

170. Singh SR, Hall IP: **Airway myofibroblasts and their relationship with airway myocytes and fibroblasts.** *Proc Am Thorac Soc* 2008, **5**(1):127-132.
171. Phan SH: **The myofibroblast in pulmonary fibrosis.** *Chest* 2002, **122**(6 Suppl):286S-289S.
172. Lama VN, Phan SH: **The extrapulmonary origin of fibroblasts: stem/progenitor cells and beyond.** *Proc Am Thorac Soc* 2006, **3**(4):373-376.
173. Salazar LM, Herrera AM: **Fibrotic response of tissue remodeling in COPD.** *Lung* 2011, **189**(2):101-109.
174. Simonneau G, Galie N, Rubin LJ, Langleben D, Seeger W, Domenighetti G, Gibbs S, Lebecq D, Speich R, Beghetti M *et al*: **Clinical classification of pulmonary hypertension.** *Journal of the American College of Cardiology* 2004, **43**(12 Suppl S):5S-12S.
175. Rich S, Dantzker DR, Ayres SM, Bergofsky EH, Brundage BH, Detre KM, Fishman AP, Goldring RM, Groves BM, Koerner SK *et al*: **Primary pulmonary hypertension. A national prospective study.** *Annals of internal medicine* 1987, **107**(2):216-223.
176. Girgis RE, Mathai SC: **Pulmonary hypertension associated with chronic respiratory disease.** *Clinics in chest medicine* 2007, **28**(1):219-232, x.
177. Thabut G, Dauriat G, Stern JB, Logeart D, Levy A, Marrash-Chahla R, Mal H: **Pulmonary hemodynamics in advanced COPD candidates for lung volume reduction surgery or lung transplantation.** *Chest* 2005, **127**(5):1531-1536.
178. Chaouat A, Bugnet AS, Kadaoui N, Schott R, Enache I, Ducolone A, Ehrhart M, Kessler R, Weitzenblum E: **Severe pulmonary hypertension and chronic obstructive pulmonary disease.** *Am J Respir Crit Care Med* 2005, **172**(2):189-194.
179. Fishman AP: **State of the art: chronic cor pulmonale.** *The American review of respiratory disease* 1976, **114**(4):775-794.
180. Kessler R, Faller M, Weitzenblum E, Chaouat A, Aykut A, Ducolone A, Ehrhart M, Oswald-Mammosser M: **"Natural history" of pulmonary hypertension in a series of 131 patients with chronic obstructive lung disease.** *Am J Respir Crit Care Med* 2001, **164**(2):219-224.

181. Weitzenblum E, Sautegeau A, Ehrhart M, Mammosser M, Hirth C, Roegel E: **Long-term course of pulmonary arterial pressure in chronic obstructive pulmonary disease.** *The American review of respiratory disease* 1984, **130**(6):993-998.
182. Kessler R, Faller M, Fourgaut G, Menecier B, Weitzenblum E: **Predictive factors of hospitalization for acute exacerbation in a series of 64 patients with chronic obstructive pulmonary disease.** *Am J Respir Crit Care Med* 1999, **159**(1):158-164.
183. Oswald-Mammosser M, Weitzenblum E, Quoix E, Moser G, Chaouat A, Charpentier C, Kessler R: **Prognostic factors in COPD patients receiving long-term oxygen therapy. Importance of pulmonary artery pressure.** *Chest* 1995, **107**(5):1193-1198.
184. Merrill CT, Nagamine M, Elixhauser A: **Hospital Stays Involving Chronic Pulmonary Heart Disease, 2005: Statistical Brief #43.** In: *Healthcare Cost and Utilization Project (HCUP) Statistical Briefs.* edn. Rockville (MD); 2006.
185. Lee-Chiong Jr TL, Matthay RA: **Pulmonary hypertension and cor pulmonale in COPD.** *Seminars in respiratory and critical care medicine* 2003, **24**(3):263-272.
186. Grant BJ, Davies EE, Jones HA, Hughes JM: **Local regulation of pulmonary blood flow and ventilation-perfusion ratios in the coatimundi.** *Journal of applied physiology* 1976, **40**(2):216-228.
187. Voelkel NF: **Mechanisms of hypoxic pulmonary vasoconstriction.** *The American review of respiratory disease* 1986, **133**(6):1186-1195.
188. Hida W, Tun Y, Kikuchi Y, Okabe S, Shirato K: **Pulmonary hypertension in patients with chronic obstructive pulmonary disease: recent advances in pathophysiology and management.** *Respirology* 2002, **7**(1):3-13.
189. Presberg KW, Dincer HE: **Pathophysiology of pulmonary hypertension due to lung disease.** *Current opinion in pulmonary medicine* 2003, **9**(2):131-138.
190. Shimoda LA, Sham JS, Sylvester JT: **Altered pulmonary vasoreactivity in the chronically hypoxic lung.** *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca* 2000, **49**(5):549-560.

191. Giaid A, Saleh D: **Reduced expression of endothelial nitric oxide synthase in the lungs of patients with pulmonary hypertension.** *The New England journal of medicine* 1995, **333**(4):214-221.
192. Eddahibi S, Chaouat A, Morrell N, Fadel E, Fuhrman C, Bugnet AS, Darteville P, Housset B, Hamon M, Weitzenblum E *et al*: **Polymorphism of the serotonin transporter gene and pulmonary hypertension in chronic obstructive pulmonary disease.** *Circulation* 2003, **108**(15):1839-1844.
193. Weitzenblum E, Chaouat A: **Severe pulmonary hypertension in COPD: is it a distinct disease?** *Chest* 2005, **127**(5):1480-1482.
194. Santos S, Peinado VI, Ramirez J, Melgosa T, Roca J, Rodriguez-Roisin R, Barbera JA: **Characterization of pulmonary vascular remodelling in smokers and patients with mild COPD.** *The European respiratory journal* 2002, **19**(4):632-638.
195. Santos S, Peinado VI, Ramirez J, Morales-Blanhir J, Bastos R, Roca J, Rodriguez-Roisin R, Barbera JA: **Enhanced expression of vascular endothelial growth factor in pulmonary arteries of smokers and patients with moderate chronic obstructive pulmonary disease.** *Am J Respir Crit Care Med* 2003, **167**(9):1250-1256.
196. Higenbottam T: **Pulmonary hypertension and chronic obstructive pulmonary disease: a case for treatment.** *Proceedings of the American Thoracic Society* 2005, **2**(1):12-19.
197. Peinado VI, Barbera JA, Abate P, Ramirez J, Roca J, Santos S, Rodriguez-Roisin R: **Inflammatory reaction in pulmonary muscular arteries of patients with mild chronic obstructive pulmonary disease.** *Am J Respir Crit Care Med* 1999, **159**(5 Pt 1):1605-1611.
198. Hale KA, Niewoehner DE, Cosio MG: **Morphologic changes in the muscular pulmonary arteries: relationship to cigarette smoking, airway disease, and emphysema.** *The American review of respiratory disease* 1980, **122**(2):273-278.
199. MacNee W: **Pathophysiology of cor pulmonale in chronic obstructive pulmonary disease. Part One.** *Am J Respir Crit Care Med* 1994, **150**(3):833-852.
200. McDonald IG, Butler J: **Distribution of vascular resistance in the isolated perfused dog lung.** *Journal of applied physiology* 1967, **23**(4):463-474.

201. Scharf SM, Iqbal M, Keller C, Criner G, Lee S, Fessler HE, National Emphysema Treatment Trial G: **Hemodynamic characterization of patients with severe emphysema**. *Am J Respir Crit Care Med* 2002, **166**(3):314-322.
202. Bardsley P, Evely R, Howard P: **Hypoxic cor pulmonale: a review**. *Herz* 1986, **11**(3):155-168.
203. Wilkinson M, Langhorne CA, Heath D, Barer GR, Howard P: **A pathophysiological study of 10 cases of hypoxic cor pulmonale**. *The Quarterly journal of medicine* 1988, **66**(249):65-85.
204. Wright JL, Petty T, Thurlbeck WM: **Analysis of the structure of the muscular pulmonary arteries in patients with pulmonary hypertension and COPD: National Institutes of Health nocturnal oxygen therapy trial**. *Lung* 1992, **170**(2):109-124.
205. Magee F, Wright JL, Wiggs BR, Pare PD, Hogg JC: **Pulmonary vascular structure and function in chronic obstructive pulmonary disease**. *Thorax* 1988, **43**(3):183-189.
206. Barbera JA, Riverola A, Roca J, Ramirez J, Wagner PD, Ros D, Wiggs BR, Rodriguez-Roisin R: **Pulmonary vascular abnormalities and ventilation-perfusion relationships in mild chronic obstructive pulmonary disease**. *Am J Respir Crit Care Med* 1994, **149**(2 Pt 1):423-429.
207. Peinado VI, Barbera JA, Ramirez J, Gomez FP, Roca J, Jover L, Gimferrer JM, Rodriguez-Roisin R: **Endothelial dysfunction in pulmonary arteries of patients with mild COPD**. *The American journal of physiology* 1998, **274**(6 Pt 1):L908-913.
208. Hale KA, Ewing SL, Gosnell BA, Niewoehner DE: **Lung disease in long-term cigarette smokers with and without chronic air-flow obstruction**. *The American review of respiratory disease* 1984, **130**(5):716-721.
209. Barbera JA, Blanco I: **Pulmonary hypertension in patients with chronic obstructive pulmonary disease: advances in pathophysiology and management**. *Drugs* 2009, **69**(9):1153-1171.
210. Saetta M, Baraldo S, Corbino L, Turato G, Braccioni F, Rea F, Cavallese G, Tropeano G, Mapp CE, Maestrelli P *et al*: **CD8+ve cells in the lungs of smokers with chronic obstructive pulmonary disease**. *Am J Respir Crit Care Med* 1999, **160**(2):711-717.

211. Furchgott RF, Zawadzki JV: **The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine.** *Nature* 1980, **288**(5789):373-376.
212. Stamler JS, Loh E, Roddy MA, Currie KE, Creager MA: **Nitric oxide regulates basal systemic and pulmonary vascular resistance in healthy humans.** *Circulation* 1994, **89**(5):2035-2040.
213. Cremona G, Wood AM, Hall LW, Bower EA, Higenbottam T: **Effect of inhibitors of nitric oxide release and action on vascular tone in isolated lungs of pig, sheep, dog and man.** *The Journal of physiology* 1994, **481** (Pt 1):185-195.
214. Greenberg B, Kishiyama S: **Endothelium-dependent and -independent responses to severe hypoxia in rat pulmonary artery.** *The American journal of physiology* 1993, **265**(5 Pt 2):H1712-1720.
215. Barbera JA, Roger N, Roca J, Rovira I, Higenbottam TW, Rodriguez-Roisin R: **Worsening of pulmonary gas exchange with nitric oxide inhalation in chronic obstructive pulmonary disease.** *Lancet* 1996, **347**(8999):436-440.
216. Dinh-Xuan AT, Higenbottam TW, Clelland CA, Pepke-Zaba J, Cremona G, Butt AY, Large SR, Wells FC, Wallwork J: **Impairment of endothelium-dependent pulmonary-artery relaxation in chronic obstructive lung disease.** *The New England journal of medicine* 1991, **324**(22):1539-1547.
217. Barbera JA, Peinado VI, Santos S, Ramirez J, Roca J, Rodriguez-Roisin R: **Reduced expression of endothelial nitric oxide synthase in pulmonary arteries of smokers.** *Am J Respir Crit Care Med* 2001, **164**(4):709-713.
218. Melgosa M, Peinado VI, Santos S, Morales J, Ramirez J, Roca J, Rodriguez-Roisin R, Barbera JA: **Expression of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and endothelin-1 (ET-1) in pulmonary arteries of patients with severe COPD.** *The European respiratory journal* 2003, **22**:20s.
219. Nana-Sinkam SP, Lee JD, Sotto-Santiago S, Stearman RS, Keith RL, Choudhury Q, Cool C, Parr J, Moore MD, Bull TM *et al*: **Prostacyclin prevents pulmonary endothelial cell apoptosis induced by cigarette smoke.** *Am J Respir Crit Care Med* 2007, **175**(7):676-685.
220. Tudor RM, Cool CD, Geraci MW, Wang J, Abman SH, Wright L, Badesch D, Voelkel NF: **Prostacyclin synthase expression is**

- decreased in lungs from patients with severe pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 1999, **159**(6):1925-1932.
221. Weitzenblum E, Sautegeau A, Ehrhart M, Mammosser M, Pelletier A: **Long-term oxygen therapy can reverse the progression of pulmonary hypertension in patients with chronic obstructive pulmonary disease.** *The American review of respiratory disease* 1985, **131**(4):493-498.
222. Wright JL, Churg A: **Effect of long-term cigarette smoke exposure on pulmonary vascular structure and function in the guinea pig.** *Experimental lung research* 1991, **17**(6):997-1009.
223. Yamato H, Sun JP, Churg A, Wright JL: **Guinea pig pulmonary hypertension caused by cigarette smoke cannot be explained by capillary bed destruction.** *J Appl Physiol (1985)* 1997, **82**(5):1644-1653.
224. Wright JL, Tai H, Dai J, Churg A: **Cigarette smoke induces rapid changes in gene expression in pulmonary arteries.** *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 2002, **82**(10):1391-1398.
225. Peinado VI, Ramirez J, Roca J, Rodriguez-Roisin R, Barbera JA: **Identification of vascular progenitor cells in pulmonary arteries of patients with chronic obstructive pulmonary disease.** *American journal of respiratory cell and molecular biology* 2006, **34**(3):257-263.
226. Perez-Vizcaino F, Villamor E, Moro M, Tamargo J: **Pulmonary versus systemic effects of vasodilator drugs: an in vitro study in isolated intrapulmonary and mesenteric arteries of neonatal piglets.** *European journal of pharmacology* 1996, **314**(1-2):91-98.
227. Cogolludo A, Moreno L, Frazziano G, Moral-Sanz J, Menendez C, Castaneda J, Gonzalez C, Villamor E, Perez-Vizcaino F: **Activation of neutral sphingomyelinase is involved in acute hypoxic pulmonary vasoconstriction.** *Cardiovascular research* 2009, **82**(2):296-302.
228. McMurtry IF, Abe K, Ota H, Fagan KA, Oka M: **Rho kinase-mediated vasoconstriction in pulmonary hypertension.** *Advances in experimental medicine and biology* 2010, **661**:299-308.
229. Avellana P, Segovia J, Sufrate E, Gomez-Bueno M, Garcia-Cosio Carmena MD, Garcia-Pavia P, Gutierrez Landaluce C, Perez Pereira E, Alonso-Pulpon L: **Long-term (5 years) effects of bosentan in**

- patients with pulmonary arterial hypertension. *Revista espanola de cardiologia* 2011, **64**(8):667-673.
230. Channick RN, Simonneau G, Sitbon O, Robbins IM, Frost A, Tapson VF, Badesch DB, Roux S, Rainisio M, Bodin F *et al*: **Effects of the dual endothelin-receptor antagonist bosentan in patients with pulmonary hypertension: a randomised placebo-controlled study.** *Lancet* 2001, **358**(9288):1119-1123.
231. Flohe L, Brigelius-Flohe R, Saliou C, Traber MG, Packer L: **Redox regulation of NF-kappa B activation.** *Free Radic Biol Med* 1997, **22**(6):1115-1126.
232. Vlahopoulos S, Boldogh I, Casola A, Brasier AR: **Nuclear factor-kappaB-dependent induction of interleukin-8 gene expression by tumor necrosis factor alpha: evidence for an antioxidant sensitive activating pathway distinct from nuclear translocation.** *Blood* 1999, **94**(6):1878-1889.
233. Zafarullah M, Li WQ, Sylvester J, Ahmad M: **Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions.** *Cell Mol Life Sci* 2003, **60**(1):6-20.
234. **Oral N-acetylcysteine and exacerbation rates in patients with chronic bronchitis and severe airways obstruction.** British Thoracic Society Research Committee. *Thorax* 1985, **40**(11):832-835.
235. Davies SP, Reddy H, Caivano M, Cohen P: **Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors.** *The Biochemical journal* 2000, **351**(Pt 1):95-105.
236. Milara J, Mata M, Serrano A, Peiro T, Morcillo EJ, Cortijo J: **Extracellular calcium-sensing receptor mediates human bronchial epithelial wound repair.** *Biochem Pharmacol* 2010, **80**(2):236-246.
237. 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.** *American journal of respiratory cell and molecular biology* 1998, **19**(5):819-825.
238. Dalli E, Milara J, Cortijo J, Morcillo EJ, Cosin-Sales J, Sotillo JF: **Hawthorn extract inhibits human isolated neutrophil functions.** *Pharmacological research* 2008, **57**(6):445-450.
239. Cortijo J, Milara J, Mata M, Donet E, Gavara N, Peel SE, Hall IP, Morcillo EJ: **Nickel induces intracellular calcium mobilization and pathophysiological responses in human cultured airway epithelial cells.** *Chemico-biological interactions* 2010, **183**(1):25-33.

240. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY: **A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties.** *J Biol Chem* 1985, **260**(6):3440-3450.
241. Garcia JG, Patterson C, Bahler C, Aschner J, Hart CM, English D: **Thrombin receptor activating peptides induce Ca²⁺ mobilization, barrier dysfunction, prostaglandin synthesis, and platelet-derived growth factor mRNA expression in cultured endothelium.** *Journal of cellular physiology* 1993, **156**(3):541-549.
242. Gavara N, Sunyer R, Roca-Cusachs P, Farre R, Rotger M, Navajas D: **Thrombin-induced contraction in alveolar epithelial cells probed by traction microscopy.** *J Appl Physiol (1985)* 2006, **101**(2):512-520.
243. Kelland NF, Bagnall AJ, Morecroft I, Gulliver-Sloan FH, Dempsey Y, Nilsen M, Yanagisawa M, Maclean MR, Kotelevtsev YV, Webb DJ: **Endothelial ET(B) limits vascular remodelling and development of pulmonary hypertension during hypoxia.** *J Vasc Res* 2010, **47**(1):16-22.
244. Yeligar S, Tsukamoto H, Kalra VK: **Ethanol-induced expression of ET-1 and ET-BR in liver sinusoidal endothelial cells and human endothelial cells involves hypoxia-inducible factor-1alpha and microrNA-199.** *Journal of immunology* 2009, **183**(8):5232-5243.
245. Galie N, Manes A, Branzi A: **The endothelin system in pulmonary arterial hypertension.** *Cardiovascular research* 2004, **61**(2):227-237.
246. Bauer M, Wilkens H, Langer F, Schneider SO, Lausberg H, Schafers HJ: **Selective upregulation of endothelin B receptor gene expression in severe pulmonary hypertension.** *Circulation* 2002, **105**(9):1034-1036.
247. Frommer KW, Muller-Ladner U: **Expression and function of ETA and ETB receptors in SSc.** *Rheumatology* 2008, **47 Suppl 5**:v27-28.
248. Xu CB, Zheng JP, Zhang W, Zhang Y, Edvinsson L: **Lipid-soluble smoke particles upregulate vascular smooth muscle ETB receptors via activation of mitogen-activating protein kinases and NF-kappaB pathways.** *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 2008, **106**(2):546-555.
249. Milara J, Juan G, Ortiz JL, Guijarro R, Losada M, Serrano A, Morcillo EJ, Cortijo J: **Cigarette smoke-induced pulmonary endothelial dysfunction is partially suppressed by sildenafil.** *European journal*

- of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences* 2010, **39**(5):363-372.
250. Richens TR, Linderman DJ, Horstmann SA, Lambert C, Xiao YQ, Keith RL, Boe DM, Morimoto K, Bowler RP, Day BJ *et al*: **Cigarette smoke impairs clearance of apoptotic cells through oxidant-dependent activation of RhoA**. *Am J Respir Crit Care Med* 2009, **179**(11):1011-1021.
251. Sugimoto M, Nakayama M, Goto TM, Amano M, Komori K, Kaibuchi K: **Rho-kinase phosphorylates eNOS at threonine 495 in endothelial cells**. *Biochemical and biophysical research communications* 2007, **361**(2):462-467.
252. Wright JL, Tai H, Churg A: **Vasoactive mediators and pulmonary hypertension after cigarette smoke exposure in the guinea pig**. *J Appl Physiol (1985)* 2006, **100**(2):672-678.
253. Oka M, Fagan KA, Jones PL, McMurtry IF: **Therapeutic potential of RhoA/Rho kinase inhibitors in pulmonary hypertension**. *British journal of pharmacology* 2008, **155**(4):444-454.
254. Morrell NW, Adnot S, Archer SL, Dupuis J, Jones PL, MacLean MR, McMurtry IF, Stenmark KR, Thistlethwaite PA, Weissmann N *et al*: **Cellular and molecular basis of pulmonary arterial hypertension**. *Journal of the American College of Cardiology* 2009, **54**(1 Suppl):S20-31.
255. Filep JG, Fournier A, Foldes-Filep E: **Acute pro-inflammatory actions of endothelin-1 in the guinea-pig lung: involvement of ETA and ETB receptors**. *British journal of pharmacology* 1995, **115**(2):227-236.
256. Christman BW, McPherson CD, Newman JH, King GA, Bernard GR, Groves BM, Loyd JE: **An imbalance between the excretion of thromboxane and prostacyclin metabolites in pulmonary hypertension**. *The New England journal of medicine* 1992, **327**(2):70-75.
257. Curzen NP, Griffiths MJ, Evans TW: **Contraction to endothelin-1 in pulmonary arteries from endotoxin-treated rats is modulated by endothelium**. *The American journal of physiology* 1995, **268**(6 Pt 2):H2260-2266.
258. Cottin V, Khouatra C, Lazor R, Canu P, Cordier JF: **Pulmonary hypertension therapy and COPD: still many questions to be**

- answered. *The European respiratory journal* 2009, **33**(2):450-452; author reply 452-453.
259. Valerio G, Bracciale P, Grazia D'Agostino A: **Effect of bosentan upon pulmonary hypertension in chronic obstructive pulmonary disease.** *Therapeutic advances in respiratory disease* 2009, **3**(1):15-21.
260. Hampl V, Herget J: **Role of nitric oxide in the pathogenesis of chronic pulmonary hypertension.** *Physiological reviews* 2000, **80**(4):1337-1372.
261. Holden WE, Kishiyama SS, Dong SP, Osborne ML: **Endothelium-dependent effects of cigarette smoke components on tone of porcine intrapulmonary arteries in vitro.** *Toxicology and applied pharmacology* 1990, **104**(2):191-199.
262. Feyerabend C, Ings RM, Russel MA: **Nicotine pharmacokinetics and its application to intake from smoking.** *British journal of clinical pharmacology* 1985, **19**(2):239-247.
263. Carratu P, Scoditti C, Maniscalco M, Seccia TM, Di Gioia G, Gadaleta F, Cardone RA, Dragonieri S, Pierucci P, Spanevello A *et al*: **Exhaled and arterial levels of endothelin-1 are increased and correlate with pulmonary systolic pressure in COPD with pulmonary hypertension.** *BMC pulmonary medicine* 2008, **8**:20.
264. Rahman MM, Elmi S, Chang TK, Bai N, Sallam NA, Lemos VS, Moien-Afshari F, Laher I: **Increased vascular contractility in isolated vessels from cigarette smoking rats is mediated by basal endothelin release.** *Vascular pharmacology* 2007, **46**(1):35-42.
265. Huang LH, He JY, Yuan BX, Cao YX: **Lipid soluble smoke particles upregulate endothelin receptors in rat basilar artery.** *Toxicology letters* 2010, **197**(3):243-255.
266. Sandhu H, Xu CB, Edvinsson L: **Upregulation of contractile endothelin type B receptors by lipid-soluble cigarette smoking particles in rat cerebral arteries via activation of MAPK.** *Toxicology and applied pharmacology* 2010, **249**(1):25-32.
267. Farhat N, Matouk CC, Mamarbachi AM, Marsden PA, Allen BG, Thorin E: **Activation of ETB receptors regulates the abundance of ET-1 mRNA in vascular endothelial cells.** *British journal of pharmacology* 2008, **153**(7):1420-1431.

268. Fang Q, Zhao M, Ren G: **[Effects of cigarette smoke extract on proliferation and ET-1 release of airway smooth muscle cells]**. *Zhonghua yi xue za zhi* 1997, **77**(3):201-204.
269. Lee SD, Lee DS, Chun YG, Shim TS, Lim CM, Koh Y, Kim WS, Kim DS, Kim WD: **Cigarette smoke extract induces endothelin-1 via protein kinase C in pulmonary artery endothelial cells**. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2001, **281**(2):L403-411.
270. 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**. *British journal of pharmacology* 2010, **161**(7):1599-1615.
271. Akki A, Zhang M, Murdoch C, Brewer A, Shah AM: **NADPH oxidase signaling and cardiac myocyte function**. *Journal of molecular and cellular cardiology* 2009, **47**(1):15-22.
272. Cheng SE, Lin CC, Lee IT, Hsu CK, Kou YR, Yang CM: **Cigarette smoke extract regulates cytosolic phospholipase A2 expression via NADPH oxidase/MAPKs/AP-1 and p300 in human tracheal smooth muscle cells**. *Journal of cellular biochemistry* 2011, **112**(2):589-599.
273. Wedgwood S, Black SM: **Endothelin-1 decreases endothelial NOS expression and activity through ETA receptor-mediated generation of hydrogen peroxide**. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2005, **288**(3):L480-487.
274. Duong-Quy S, Dao P, Hua-Huy T, Guilluy C, Pacaud P, Dinh-Xuan AT: **Increased Rho-kinase expression and activity and pulmonary endothelial dysfunction in smokers with normal lung function**. *The European respiratory journal* 2011, **37**(2):349-355.
275. Hu J, Xu YJ, Zhang ZX, Tian F: **Effect of cigarette smoke extract on proliferation of rat pulmonary artery smooth muscle cells and the relevant roles of protein kinase C**. *Chinese medical journal* 2007, **120**(17):1523-1528.

ANEXOS

ANEXO I



Comisión de Investigación

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

INFORMA

Que la Comisión de Investigación de este Centro, tras revisar el Proyecto de Investigación titulado "*Estudio funcional de los receptores de endotelina en arteria pulmonar humana*", presentado a la convocatoria de Ayudas a la Investigación Separ 2009, cuyo investigador principal es el Dr. Gustavo Juan Samper.

CONSIDERA

Que dicho proyecto reúne las condiciones de necesidad, oportunidad y viabilidad de las tareas de investigación propuestas, el plan de recepción e integración del candidato y el valor añadido para este centro, por lo que

ACUERDA

Informar favorablemente la solicitud para su realización.

Lo que firmo en Valencia, a 21 de enero de 2010

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

ANEXO II

APROBACIÓN PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN

- ANEXO 11 -

Este CEIC tras evaluar en su reunión de 18 de febrero de 2010 el Proyecto de Investigación:

Título:	"Estudio funcional de los receptores de endotelina en arteria pulmonar humana"		
I.P.:	Dr. Gustavo Juan	Servicio/Unidad	Neumología

Acuerda respecto a esta documentación:

- Que el Proyecto de Investigación y Hoja de Información al Paciente y Consentimiento Informado presentado a la convocatoria SEPAR reúnen 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	X
	Dr. D. José Manuel Iranzo	
	Dr. D. Miguel Armengot	
	Dr. D. Julio Cortijo	X
	Dra. Dña. Elena Rubio	X
	Dr. D. Gustavo Juan	
	Dra. Pilar Blasco	X
	Dña. Mª Teresa Jareño	
	Dra. Mª José Safont	
	Dr. José Luis Fayos	X
	Dr. Agustín Herrera	
	Dra. Ana Blasco	X
	Dr. Antonio Martorell	
	Dr. Aurelio Quesada	
	Dr. Guillermo Sáez	
Dr. Fco. Javier Cervera	X	
Dr. José Vte. Roig Vila		



Consorcio Hospital General Universitario de Valencia

Comité Ético de Investigación Clínica

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

Lo que comunico a efectos oportunos:

Fdo. Dr. Severiano Marín (Presidente
CEIC)

