





**DR. D. JULIO CORTIJO GIMENO**

Catedrático Numerario de Universidad

Departamento de Farmacología

Universidad de Valencia

**Certifica:**

Que la Tesis Doctoral presentada por Dña. Sonia Contreras Martínez, con el título:

**“Efectos de los inhibidores de PDE4 en la remodelación celular de modelos *in vitro* de Fibrosis Pulmonar Idiopática y Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica severa”**

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

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

**Dr. Julio Cortijo Gimeno**

**En Valencia,**



**DR. D. JAVIER MILARA PAYÁ**

Doctor por la Universidad de Valencia

Farmacéutico Adjunto en el Hospital General Universitario de Valencia

Profesor Asociado de la Universidad Jaume I (UJI)

**Certifica:**

Que la Tesis Doctoral presentada por Dña. Sonia Contreras Martínez, con el título:

**“Efectos de los inhibidores de PDE4 en la remodelación celular de modelos *in vitro* de Fibrosis Pulmonar Idiopática y Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica severa”**

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

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

**Javier MilaraPayá**

**En Valencia,**



**DR. D. LUIS FRANCO VERA**

Profesor Emérito

Facultad CC. Biológicas

Universidad de Valencia

**Certifica:**

Que la Tesis Doctoral presentada por Dña. Sonia Contreras Martínez, con el título:

**“Efectos de los inhibidores de PDE4 en la remodelación celular de modelos *in vitro* de Fibrosis Pulmonar Idiopática y Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica severa”**

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

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

**Dr. Luis Franco Vera**

**En Valencia,**



La siguiente Tesis Doctoral, realizada en la Fundación de Investigación del Hospital General Universitario de Valencia y en el Departamento de Farmacología de la Universidad de Valencia, ha sido posible gracias a las siguientes ayudas:

- Ministerio Español de Economía y Competitividad: SAF2011-26443 y SAF2014-55322-P.  
[https://sede.micinn.gob.es/stfls/eSede/Ficheros/2015/Anexo\\_PreseleccionadoPRPProyectos\\_Excelencia\\_2014.pdf](https://sede.micinn.gob.es/stfls/eSede/Ficheros/2015/Anexo_PreseleccionadoPRPProyectos_Excelencia_2014.pdf).
- Subvenciones de la acción estratégica en salud (modalidad proyectos de investigación en salud) del Instituto de Salud Carlos III, dentro del subprograma estatal de generación de conocimiento, en el marco del plan estatal de investigación científica y técnica: FIS PI11/02618 y FIS PI14/01733  
<http://gesdoc.isciii.es/?action=download&id=08/10/2014-fe2a818ac5>
- Centro de Investigación en Red de Enfermedades Respiratorias: CIBERES apoyado por el Instituto Nacional de Salud Carlos III y los Ministerios españoles de Economía y Competitividad y Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad  
(CIBERES; CB06/06/0027; <http://www.ciberes.org/>)
- El proyecto “Effects of PDE4 inhibitors (e.g. Roflumilast N-oxide) on *in vitro* models related to pulmonary fibrosis and severe COPD”, financiado por la compañía farmacéutica TAKEDA.



## **AGRADECIMIENTOS**

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

En primer lugar, agradecer al Dr. Julio Cortijo Gimeno su confianza y apoyo y, por darme la oportunidad de realizar esta tesis doctoral. Su experiencia, conocimientos y consejos han sido de gran relevancia para mi formación como investigadora. Al Dr. Javier Milara Payá, gran persona y profesional. Quisiera agradecerle su dedicación, esfuerzo y empeño por hacerme avanzar, facilitándome cada objetivo marcado en esta tesis. Su entusiasmo hacia la ciencia es digno de admiración, y su corazón más si cabe.

A mi tutor de universidad, D. Luís Franco Vera, por su interés, profesionalidad y dedicación en la tesis presentada.

A todos mis compañer@s del departamento de Farmacología de la Universidad de Valencia, en especial a Inés, Soni, Luci, Pili, Terelo, Gracia, Martín y Paula, por su gran ayuda, compañerismo y amistad, porque habéis dejado un recuerdo inolvidable en mí. Sois únic@s e irrepetibles y no cambio ningún momento de los pasados con vosotr@s. A Anselm y Ade por su paciencia y enseñanzas, porque en el último momento noté más que nunca vuestra ausencia. A mi pequeña Bea, con quién inicié este camino y a la que llevaré siempre en mi corazón. Quisiera destacar a mis “tutoras”, Patri y Tere Peiró. Ambas han sido un pilar fundamental en mi desarrollo como investigadora y sin ellas no hubiese llegado a adquirir las técnicas y conocimientos necesarios para desarrollar esta tesis. A mi Pilarín, mi Zipi del laboratorio, por su apoyo, ayuda incondicional y por ser una gran compañera y amiga. ¿Qué haría sin ti mi pequeña?

A mi familia, en especial a mis padres Puri y Juan, mis pilares, mi todo. Sólo ellos saben lo que es aguantarme en épocas de estrés y sólo ellos me apoyan como nadie lo sabe hacer. A

mis hermanos, por el cariño y motivación que me han mostrado siempre en mi carrera profesional. A los que están, a los que no.

A mis amig@s de biología por apoyarme y darme sus grandes consejos, tanto personales como científicos. No sé qué me deparará el futuro, pero volvería a elegir la carrera de Biología solo por conocerlos. A mis “feas”, Belinda y Lauri, mis amigas de toda la vida, aquellas a las que puedes llamar “hermanas”, por estar siempre a mi lado y sacarme una sonrisa en cada momento.

Finalmente, a Agus, por motivarme en cada uno de los objetivos que me he marcado y por su apoyo incondicional. Porque siempre estás en los momentos más oportunos.

**“Poco conocimiento hace que las personas se sientan orgullosas. Mucho conocimiento, que se sientan humildes”**

**Leonardo da Vinci**



# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	
1.1. IMPLICACIÓN DE LA ENZIMA PDE4 EN LAS ENFERMEDADES CRÓNICAS RESPIRATORIAS.....	- 1 -
1.2. FIBROSIS PULMONAR IDIOPÁTICA. DEFINICIÓN.....	- 2 -
1.2.1. Procesos fisiopatológicos. ....	- 4 -
1.2.2. Clínica de la enfermedad. Epidemiología, prevalencia y mortalidad.....	- 9 -
1.2.3. Aproximaciones farmacológicas en el tratamiento de la fibrosis pulmonar idiopática. ....	- 13 -
1.2.4. Papel de los inhibidores de PDE4 y PDE5 en la fibrosis pulmonar idiopática. ....	- 15 -
1.3. ENFERMEDAD PULMONAR OBSTRUCTIVA CRÓNICA. DEFINICIÓN. ....	- 17 -
1.3.1. Procesos fisiopatológicos. ....	- 20 -
1.3.2. Clínica de la enfermedad. Epidemiología, prevalencia y mortalidad.....	- 22 -
1.3.3. Aproximaciones farmacológicas clásicas.....	- 25 -
1.3.4. Nuevas aproximaciones farmacológicas. Papel de la PDE4 y PI3K en EPOC.....	- 27 -
<b>2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b> .....	- 33 -
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	
3.1 PROPUESTA 1: MODELO FPI.....	- 37 -
3.1.1. Fármacos.....	- 37 -
3.1.2. Población de estudio.....	- 39 -
3.1.3. Aislamiento y cultivo de fibroцитos humanos.....	- 39 -
3.1.4. Aislamiento y cultivo de células epitelial-alveolares tipo II.....	- 40 -
3.1.5. Diseño experimental.....	- 41 -
3.1.6. Estrés del RE/UPR en células epitelial-alveolares tipo II.....	- 42 -
3.1.7. Ensayo de migración de fibroцитos por CXCL12.....	- 42 -
3.1.8. Real time PCR.....	- 43 -
3.1.9. Western Blot.....	- 44 -
3.1.10. Inmunofluorescencia.....	- 45 -
3.2. PROPUESTA 2: MODELO EPOC.....	- 45 -
3.2.1. Fármacos.....	- 45 -

3.2.2. Pacientes .....	- 48 -
3.2.3. Aislamiento y cultivo de neutrófilos humanos .....	- 50 -
3.2.4. Condiciones experimentales .....	- 50 -
3.2.5. Ensayo de migración neutrofílica .....	- 51 -
3.2.6. Liberación de elastasa.....	- 52 -
3.2.7. Liberación de IL-8 .....	- 52 -
3.2.8. Generación de aniones superóxidos .....	- 53 -
3.2.9. Análisis de datos .....	- 53 -
3.2.10. Aspectos éticos .....	- 53 -

#### **4. RESULTADOS .....**

4.1. EFECTOS DE LOS INHIBIDORES DE PDE4 Y PDE5, Y SU COMBINACIÓN, SOBRE LA EXPRESIÓN DE MARCADORES DEL PROCESO TEM EN CÉLULAS EPITELIAL-ALVEOLARES TIPO II. ....	- 57 -
4.2. ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE INHIBIDORES PDE4 Y PDE5, Y SU COMBINACIÓN, SOBRE EL ESTRÉS DEL RE/UPR EN CÉLULAS EPITELIAL-ALVEOLARES TIPO II. ....	- 61 -
4.3. EFECTOS DE LOS INHIBIDORES PDE4 Y PDE5, Y SU COMBINACIÓN, SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR EN CÉLULAS EPITELIAL-ALVEOLARES TIPO II. ....	- 65 -
4.4. ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE LOS INHIBIDORES PDE4 Y PDE5, Y SU COMBINACIÓN, SOBRE LA EXPRESIÓN DE SMAD3 EN CÉLULAS EPITELIAL-ALVEOLARES TIPO II. ....	- 66 -
4.5. ESTUDIO DEL EFECTO DE LOS INHIBIDORES DE PDE4 Y PDE5, Y SU COMBINACIÓN, SOBRE LA DIFERENCIACIÓN DE FIBROCITOS A MIOFIBROBLASTOS....	- 67 -
4.6. ESTUDIO DEL EFECTO DE INHIBIDORES PDE4 Y PDE5, Y SU COMBINACIÓN, SOBRE LA MIGRACIÓN CELULAR DE FIBROCITOS CIRCULANTES. ....	- 70 -
4.7. ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE INHIBIDORES PDE4 Y PI3K $\Delta$ , Y SU COMBINACIÓN, EN LA LIBERACIÓN DE IL-8 POR NEUTRÓFILOS DE PACIENTES CON EPOC SEVERA. .	- 73 -
4.8. ESTUDIO DEL PERFIL FARMACOLÓGICO DE LOS INHIBIDORES DE PDE4 Y PI3K $\Delta$ , Y SU COMBINACIÓN, SOBRE LA LIBERACIÓN DE LA NEUTRÓFILO ELASTASA EN PACIENTES CON EPOC SEVERA. ....	- 76 -
4.9. ESTUDIO DEL PERFIL FARMACOLÓGICO DE LOS INHIBIDORES DE PDE4 Y PI3K $\Delta$ , Y SU COMBINACIÓN, SOBRE LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO LIBERADAS POR NEUTRÓFILOS DE PACIENTES CON EPOC SEVERA.....	- 79 -

4.10. ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE LOS INHIBIDORES DE PDE4 Y PI3K $\Delta$ , Y SU COMBINACIÓN, EN LA MIGRACIÓN DE NEUTRÓFILOS AISLADOS DE PACIENTES CON EPOC SEVERA.....	- 85 -
<b>5. DISCUSIÓN.....</b>	
5.1. ESTUDIO I. LOS INHIBIDORES PDE4 INHIBEN PROCESOS CELULARES FUNDAMENTALES EN LA FPI Y, SU COMBINACIÓN CON INHIBIDORES DE PDE5, PRESENTA UN EFECTO ADITIVO SOBRE LAS TRANSFORMACIONES CELULARES OBSERVADAS EN LA FPI.....	- 91 -
5.2. ESTUDIO II. LOS INHIBIDORES DE PDE4 DISMINUYEN LA SOBREATIVACIÓN NEUTROFÍLICA Y, EN COMBINACIÓN CON INHIBIDORES DE PI3K $\Delta$ , PRESENTAN EFECTOS ADITIVOS SOBRE PROCESOS INFLAMATORIOS CLAVE EN LOS FENOTIPOS MÁS AGRESIVOS DE LA EPOC SEVERA.....	- 98 -
<b>6. CONCLUSIONES.....</b>	- 105 -
<b>7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	-109-
<b>8. ABREVIATURAS.....</b>	-111-



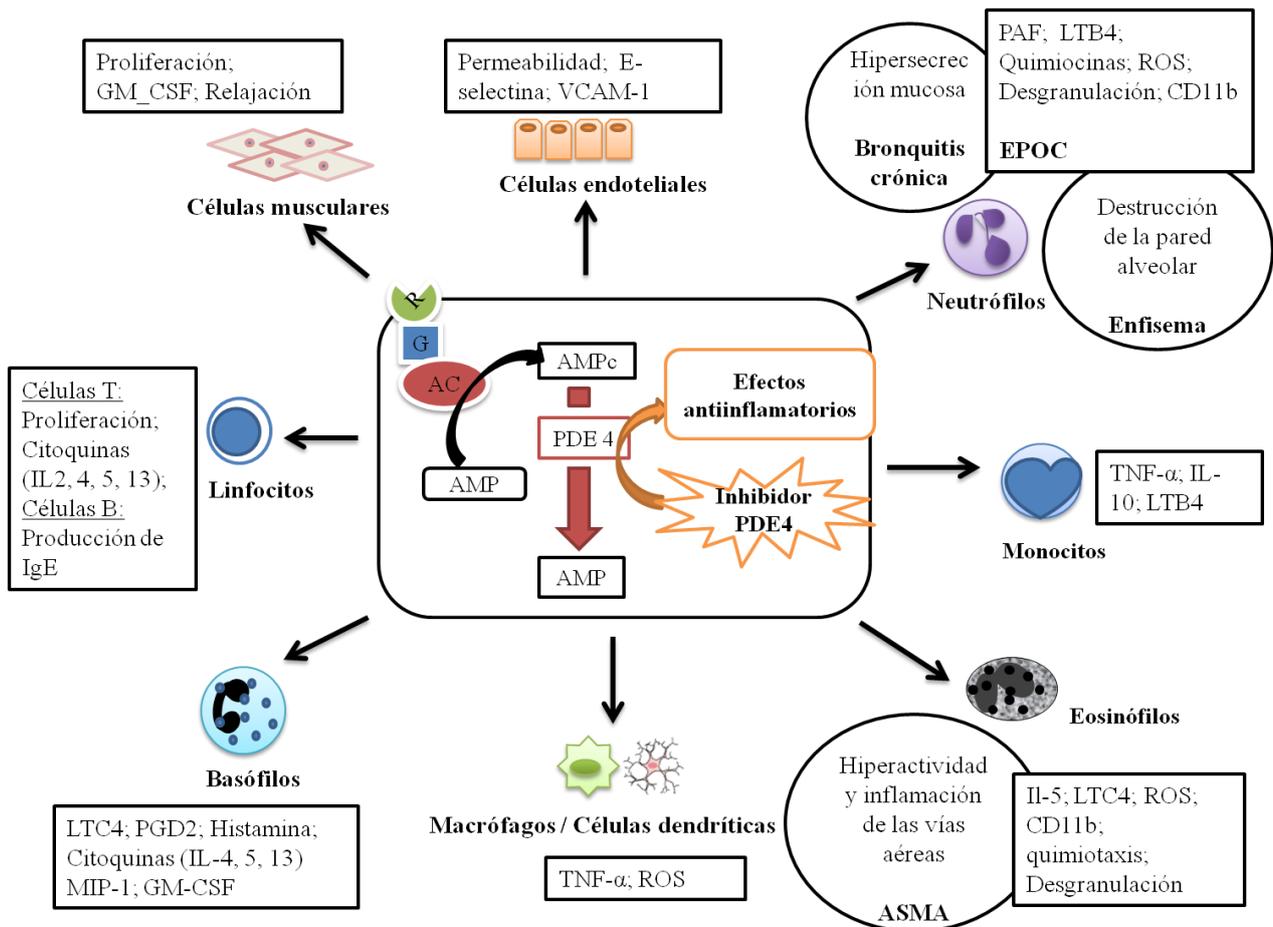
# **1. INTRODUCCIÓN**



### 1.1. Implicación de la enzima PDE4 en las enfermedades crónicas respiratorias.

La enzima fosfodiesterasa 4 (PDE4) es la enzima encargada de la degradación del adenosín monofosfato cíclico (AMPC), uno de los segundos mensajeros más importantes en la regulación de muchas funciones relacionadas con las células inflamatorias, aclaramiento mucociliar, y el remodelado vascular pulmonar y fibrótico [1]. El AMPC suprime la respuesta inflamatoria e inmune (en células inflamatorias como neutrófilos, linfocitos T y macrófagos), relaja la musculatura lisa de las vías aéreas y modula la actividad del nervio pulmonar. El aumento de la concentración de AMPC interfiere con la expresión de mediadores pro-inflamatorios, como el factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ), e inhibe la actividad de las células inflamatorias [2]. La PDE4 ejerce su función degradadora, en muchas, pero no en todas, las células inmunitarias e inflamatorias, incluyendo las células T y B, eosinófilos, neutrófilos, células dendríticas, monocitos y macrófagos [3].

En los últimos años, se han realizado numerosos estudios que han demostrado que la inhibición de PDE4 es capaz de suprimir un amplio espectro de respuestas inflamatorias *in vitro* e *in vivo* en diferentes tipos celulares (Figura 1) [4, 5]. Pero el tema más interesante ha sido el desarrollo de inhibidores de la PDE4 que son eficaces en modelos animales de diversos trastornos inflamatorios, tales como asma, EPOC, psoriasis, enfermedades inflamatorias del intestino y la artritis reumatoide, así como, en ensayos clínicos para el asma y la EPOC [6, 7]. Como la PDE4 es la principal enzima metabolizadora del cAMP, la inhibición de PDE4 es un objetivo prometedor para suprimir la respuesta inflamatoria característica de las enfermedades crónicas respiratorias.



**Figura 1. Implicación del AMPc y la PDE4 en las enfermedades crónicas respiratorias.** La enzima PDE4 es la encargada de la degradación del AMPc, un segundo mensajero envuelto en la respuesta antiinflamatoria. La PDE4 ejerce su función en numerosas células inmunitarias e inflamatorias. Su inhibición es capaz de suprimir una gran cantidad de respuestas inflamatorias en las enfermedades crónicas respiratorias como EPOC, asma y enfisema pulmonar, entre otras.

## 1.2. Fibrosis pulmonar idiopática. Definición.

La fibrosis pulmonar idiopática (FPI) es una enfermedad pulmonar fibrosante que afecta a más de 500,000 personas en Estados Unidos y Europa. La etiología y la patogénesis de este trastorno todavía no se ha aclarado completamente, pero se anticipa que la fibroproliferación es causada por el desequilibrio de los procesos reparativos e inmunológicos en los pacientes genéticamente predispuestos [8, 9]. Además, está considerada como una enfermedad crónica y progresiva hacia una fase de insuficiencia

respiratoria y muerte en un plazo de 5 años una vez aparecen los síntomas característicos [10, 11].

Debido a la ineficacia de las estrategias terapéuticas actuales y el pronóstico desfavorable, la FPI es el ejemplo más serio de las enfermedades pulmonares intersticiales (EPI). Radiológica e histopatológicamente, la FPI se caracteriza por un patrón específico denominado neumonía intersticial usual, sin embargo, este patrón no es completamente típico en todos los casos y, además, puede observarse en otras EPI, por ejemplo, neumonitis por hipersensibilidad crónica, asbestosis y enfermedades autoinmunes del tejido conectivo entre otras [9].

El modelo hipotético inicial del desarrollo de esta enfermedad, propuesto hace más de 3 décadas, sugiere que la inflamación crónica es la causa subyacente de la fibrosis pulmonar [12, 13]. Sin embargo, esta hipótesis fue posteriormente cuestionada sobre la base de las siguientes observaciones clínicas [14]:

- No hay correlación entre las medidas de inflamación de los tejidos y la gravedad de la enfermedad.
- El uso de fármacos inmunosupresores no influye en la historia natural de la enfermedad.

En cambio, se propuso una hipótesis competitiva de que la FPI es la consecuencia de repetidos episodios de lesiones en las células del tejido epitelial-alveolar de causa desconocida, que puede estar asociada con una liberación de mediadores pro-fibróticos (como el factor de crecimiento transformante (TGF- $\beta$ )) que fomentan la activación no controlada de fibroblastos y cicatrizan anormalmente la herida, pero que es independiente de la inflamación precedente [15, 16].

En la última década, los siguientes conceptos han llevado a refinar esta última hipótesis [16]:

- La pérdida de la integridad de la membrana basal (MB) alveolar-capilar representa un "punto sin retorno" que favorece la fibrosis patológica en lugar de restablecer la arquitectura normal del pulmón.

- El fracaso de la re-epitelización y la re-endotelialización en el contexto de la pérdida de la integridad de la MB en la neumonía intersticial, asociada con la FPI, que conduce a la arquitectura pulmonar destruida y a la fibrosis patológica.

- El TGF- $\beta$  es necesario, pero no totalmente suficiente, para promover la fibrosis permanente.

- Una lesión persistente / antígeno / irritante es necesaria para la propagación de la fibrosis.

- La transición epitelial a mesenquimal (TEM) y una célula progenitora derivada de la médula ósea (el fibrocito) son mecanismos celulares críticos en la regulación de la fibrosis.

Nuestro grupo y otros, hemos propuesto que, en arteria pulmonar de rata, las células endoteliales experimentan la TEM, que resulta como otra fuente potencial de fibroblastos, contribuyendo a la fibrosis pulmonar y a la hipertensión pulmonar asociada a FPI, lo que presume un mal pronóstico [17, 18].

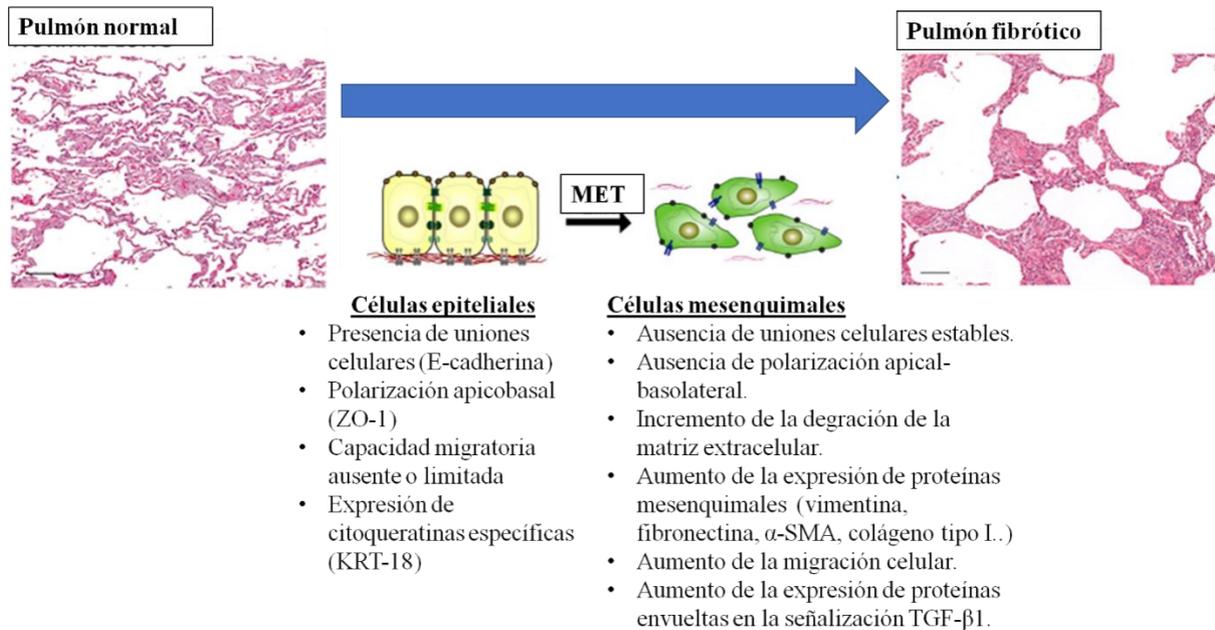
### **1.2.1. Procesos fisiopatológicos.**

La patogénesis de la fibrosis, en pacientes con EPI está asociada al proceso de la TEM. La pérdida de las células epitelial-alveolares (CEA) tipo I y de la integridad de la MB, así como, la excesiva proliferación de CEA tipo II, el reclutamiento y proliferación de fibroblastos y/o miofibroblastos, conllevan a una inapropiada matriz extracelular (MEC) que favorece el desarrollo de la enfermedad [19-23]. Además, la detección del daño epitelial conlleva a la migración de los fibrocitos circulantes al pulmón [24-26], al excesivo reclutamiento y proliferación de fibroblastos y miofibroblastos, con la

deposición de MEC madura que conduce a la fibrosis alveolar en etapa final y, como resultado, a la pérdida de las estructuras alveolares que pueden incluir todo el lóbulo anatómico. La evolución de la deposición de MEC se asocia con un estado hipocelular y una pérdida de células productoras de proteinasas que, normalmente, podrían estar involucrados en la remodelación/reabsorción de la MEC. Este proceso conduce a la histopatología en etapa final de neumonía intersticial [21, 22, 27].

Durante la etapa de fibrosis pulmonar se detecta una sobreexpresión de colágeno tipo I y III, fibronectina [28-30] y  $\alpha$ -SMA en respuesta a TGF- $\beta$ 1 y endotelina 1, una vez han llegado al tejido y se han diferenciado en fibroblastos/miofibroblastos [26, 31]. Por ello, la TEM se caracteriza por la pérdida de la expresión de marcadores epiteliales, tales como: las proteínas de unión estrecha E-cadherina y ZO-1 o, de la citoqueratina (CK) 5 y 18, y el aumento de la expresión de marcadores mesenquimales como colágeno tipo I, fibronectina,  $\alpha$ -SMA y vimentina, además de, la sobreexpresión de proteínas implicadas en la señalización TGF- $\beta$  (como SMAD3) (Figura 2).

El TGF- $\beta$  es considerado un buen candidato para inducir la TEM en la FPI, pero el aumento del estrés en el retículo endoplasmático (RE) en las CEAI también puede jugar un papel importante [32].



**Figura 2. Patogénesis de la FPI.** El proceso TEM ocurre en pulmones FPI. Durante este proceso tiene lugar la pérdida de células epiteliales y la ganancia de células mesenquimales. Este hecho supone la adquisición de una estructura pulmonar denominada “panel de abeja” caracterizada por la pérdida de la arquitectura normal del pulmón, la cual, se asimila a un panel de abeja. En el proceso TEM, tendrá lugar la pérdida de marcadores epiteliales (como la E-Cadherina, ZO-1 o KRT18) y la sobreexpresión de marcadores mesenquimales (como  $\alpha$ -SMA, vimentina o colágeno tipo I), además de, un aumento de la migración de los fibroцитos circulantes y de la expresión de proteínas envueltas en la señalización TGF- $\beta$ .

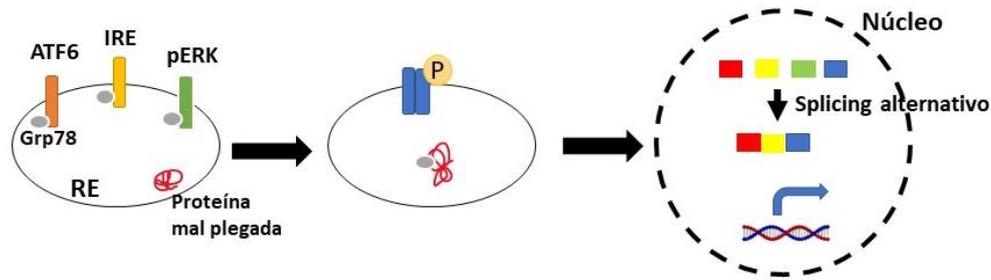
Cada vez más evidencias indican un papel prominente del estrés en el RE y una considerable respuesta a proteínas mal plegadas (UPR) en la FPI [32, 33]. Un desequilibrio entre la demanda en la síntesis y la capacidad del RE en sintetizar, procesar, doblar y empaquetar dichas proteínas, es el desencadenante del estrés en el RE. Las razones del aumento de estrés en el RE son abundantes, pueden ser desde agentes exógenos a virus, o por causas genéticas.

La UPR se inicia tras la detección del aumento de proteínas mal plegadas y su función consiste en la activación de vías bioquímicas encargadas de eliminar dichas proteínas [34]. Si esta función no se lleva a cabo, la célula entra en un proceso de muerte celular programada o apoptosis. Los sensores UPR (proteínas como IRE, PERK y ATF6) son los encargados de activar el proceso de muerte celular. IRE es el

“interruptor de la apoptosis” más importante y su autofosforilación es indicativa de las vías pro-apoptóticas [35].

En FPI, el número de marcadores UPR y de apoptosis se encuentra elevado en el epitelio alveolar y en el RE. Este hecho, conlleva a pensar que facilitan la apoptosis en las CEA. De hecho, un estudio demostró que, en CEAI de pacientes FPI, IRE fosforilada (pIRE) se encontraba más expresada que en CEAI de donantes sanos [35]. Además, estudios *in vitro* de células A549 han demostrado que, tras la inducción de estrés en el RE por taspigargina, IRE se fosforila y sobreexpresa, dando lugar a su vez, a una sobreexpresión de cCK-18, un marcador de apoptosis en CEAs de pacientes FPI relacionado con la activación de la UPR. La apoptosis en las CEAs está asociada a caspasas que dirigen un corte en la CK18, resultando en una apoptosis temprana [35, 36].

El hecho de que la célula entre en apoptosis o se induzca estrés en el RE depende de la fuerza estresante a la que sea sometida. Un estudio demostró que un extenso estrés desencadenaba la muerte celular programada o apoptosis, mientras que un estrés leve conllevaba al proceso TEM [34]. Otro estudio en CEAI de rata demostró que, tanto la taspigargina como tunicamicina, inductores de estrés en el RE, aumentaban la expresión de la chaperona Grp78 manifestando la activación de la UPR [37]. Grp78 es una proteína que se encuentra unida a IRE, PERK y ATF6 por el lumen del RE y, cuando detecta el aumento de proteínas desplegadas, se separa de ellas y se une a la proteína mal plegada desencadenando la UPR (Figura 3).



**Figura 3. Inducción de estrés en el RE y señalización UPR.** Tras el reconocimiento de una proteína mal plegada, Grp78, que se encuentra unida a IRE, pERK y ATF6 por el lumen del RE, se liberará y unirá a la proteína mal plegada desencadenando la UPR. El aumento de la proteína Grp78 desencadenará un estrés en el RE que, dependiendo de la fuerza estresante, puede dar lugar a una muerte celular programada o al proceso TEM.

Además, se ha observado que, tras la administración de una dosis moderada de tunicamicina y tapsigargina, los marcadores epiteliales (ZO-1 y E-cadherina) reducen su expresión, mientras que los marcadores mesenquimales ( $\alpha$ -SMA y vimentina) aumentan, indicando un proceso TEM.

Otro estudio en células A549 ha demostrado que, tras la transfección del mutante SPC (proteína surfactante C), ocurre la TEM, resultando en un aumento de la expresión de los marcadores de estrés en el RE, tales como Grp78. Sin embargo, la excesiva concentración de tunicamicina y tapsigargina, conllevó a un proceso apoptótico de las CEA [32].

Actualmente, la disfunción de las CEA está considerada la mayor causa de FPI. Sin embargo, la causa de la evolución clínica progresiva en esta patología sigue siendo desconocida. En este contexto, si los mecanismos de iniciación (como la TEM, UPR y/o reclutamiento de fibrocitos) y progresión (como la invasividad de fibroblastos y remodelación de la matriz patológica) en la FPI suceden estrictamente de manera secuencial o en paralelo, todavía es una incógnita. Por ello, sería recomendable establecer un tratamiento idóneo tanto en las vías de iniciación como en las de la progresión de la enfermedad.

### 1.2.2. Clínica de la enfermedad. Epidemiología, prevalencia y mortalidad.

La epidemiología de la FPI sigue siendo desconocida por muchas razones, pero los cambios en las definiciones de la FPI y los complejos algoritmos diagnosticados han demostrado grandes desafíos. Desde las primeras descripciones patológicas realizadas en la neumonía intersticial por Hamman y Rich en 1944 [38], múltiples condiciones, que ahora consideramos entidades separadas de la enfermedad (como por ejemplo neumonía intersticial no específica y neumonía intersticial desquamativa), fueron agrupadas con la FPI o uno de sus otros nombres (por ejemplo, alveolitis fibrosante criptogénica). En 1998, Katzstein y Myers [39] propusieron que el término de FPI se reservase para aquellos pacientes con un patrón histopatológico EPI. Este concepto se formalizó, en criterios de diagnósticos, en la primera declaración de consenso internacional sobre la FPI en el año 2000 [40] y fue revisado en 2011 [41]. Además, estas declaraciones han hecho hincapié en la importancia de un enfoque multidisciplinario para el diagnóstico preciso mediante el consenso que incluye la discusión entre neumólogos, radiólogos y patólogos con experiencia en EPI (Tabla 1).

**Tabla 1. Criterios diagnósticos para la FPI y la nomenclatura de códigos de la Clasificación Internacional de Enfermedades (CIE).** Tabla adaptada de Ley and Collard, 2013 [42]. Abreviaturas: ALAT, Latin American Thoracic Association; ATS, American Thoracic Society; BAL, lavado broncoalveolar; ERS, European Respiratory Society; TCAR, tomografía computarizada de alta resolución; CIE, Clasificación Internacional de Enfermedades; FPI, Fibrosis Pulmonar Idiopática; JRS, Sociedad Respiratoria Japonesa; MDD, se requiere un debate multidisciplinario adicional; PFT, pruebas de función pulmonar; TBB, biopsia transbronquial; UIP, neumonía intersticial habitual.

**Declaración/Código CIE    Definición/Criterios**

<b>ATS/ERS 2000</b>	<p><b>Biopsia pulmonar quirúrgica mostrando UIP</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Exclusión de causas secundarias (Ej. Drogas, exposición contaminación, enfermedades vasculares del colágeno...).</li> <li>2. PFTs anormales que muestran restricción y/o alteración del intercambio gaseoso.</li> <li>3. Anomalías consistentes en la radiografía de tórax.</li> </ol>
---------------------	--

	<p><b>Sin una biopsia pulmonar quirúrgica debe cumplir</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Todos los criterios principales.</li> <li>2. Exclusión de causas secundarias, PFT anormales, anomalías reticulares bi-basilares con opacidades mínimas de vidrio molido en TCAR, TBB o BAL sin características de un diagnóstico alternativo.</li> <li>3. Edad <math>\geq 50</math>, comienzo insidioso de disnea de otra manera inexplicada en el esfuerzo, duración de la enfermedad de por lo menos 3 meses, crepitar inspiratorio bi-basilar.</li> </ol>																														
<b>ATS/ERS/JRS/ALAT 2011</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Exclusión de causas secundarias .</li> <li>2. Patrón UIP en TCAR en pacientes sin biopsia pulmonar quirúrgica o combinaciones específicas de TCAR y patrones quirúrgicos de biopsia pulmonar:</li> </ol> <table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="6"><b>Patrón de biopsia pulmonar quirúrgica</b></th> </tr> <tr> <th><b>HRCT patrón</b></th> <th>UIP</th> <th>Probable UIP</th> <th>Posible UIP</th> <th>Fibrosis no clasificable</th> <th>No es UIP</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <th><b>UIP</b></th> <td>FPI</td> <td>FPI</td> <td>FPI</td> <td>FPI</td> <td>No es FPI</td> </tr> <tr> <th><b>Posible UIP</b></th> <td>FPI</td> <td>FPI</td> <td>MDD</td> <td>MDD</td> <td>No es FPI</td> </tr> <tr> <th><b>Inconsistente con UIP</b></th> <td>MDD</td> <td>No es FPI</td> <td>No es FPI</td> <td>No es FPI</td> <td>No es FPI</td> </tr> </tbody> </table>	<b>Patrón de biopsia pulmonar quirúrgica</b>						<b>HRCT patrón</b>	UIP	Probable UIP	Posible UIP	Fibrosis no clasificable	No es UIP	<b>UIP</b>	FPI	FPI	FPI	FPI	No es FPI	<b>Posible UIP</b>	FPI	FPI	MDD	MDD	No es FPI	<b>Inconsistente con UIP</b>	MDD	No es FPI	No es FPI	No es FPI	No es FPI
<b>Patrón de biopsia pulmonar quirúrgica</b>																															
<b>HRCT patrón</b>	UIP	Probable UIP	Posible UIP	Fibrosis no clasificable	No es UIP																										
<b>UIP</b>	FPI	FPI	FPI	FPI	No es FPI																										
<b>Posible UIP</b>	FPI	FPI	MDD	MDD	No es FPI																										
<b>Inconsistente con UIP</b>	MDD	No es FPI	No es FPI	No es FPI	No es FPI																										
<b>CIE-8</b>	Otras neumonías intersticiales crónicas.																														
<b>CIE-9</b>	<p>Fibrosis pulmonar post-inflamatoria.</p> <p>Alveolitis fibrosante idiopática.</p>																														
<b>CIE-10</b>	FPI																														

La FPI es una enfermedad considerada rara, con etiología desconocida, cuya incidencia y prevalencia no está clara todavía puesto que ha ido variando según los estudios. Esta variabilidad puede explicarse por las diferencias en los criterios de diagnóstico utilizados, la definición del caso y, la población y el diseño del estudio. Algunos estudios, indican que la incidencia y la mortalidad de la FPI están en aumento [43, 44]. Sin embargo, la verdadera incidencia y prevalencia de la FPI no está bien establecida debido a la falta de una definición uniforme en los estudios más antiguos, a

los criterios de diagnóstico, a las diferencias en las metodologías de búsqueda de casos y a los diseños de los estudios (basados en sexo, edad, subtipo de enfermedad y región geográfica, de forma independiente). En la Tabla 2 se resume las estimaciones de prevalencia e incidencia entre poblaciones generales reportadas de 100,000 habitantes por región geográfica.

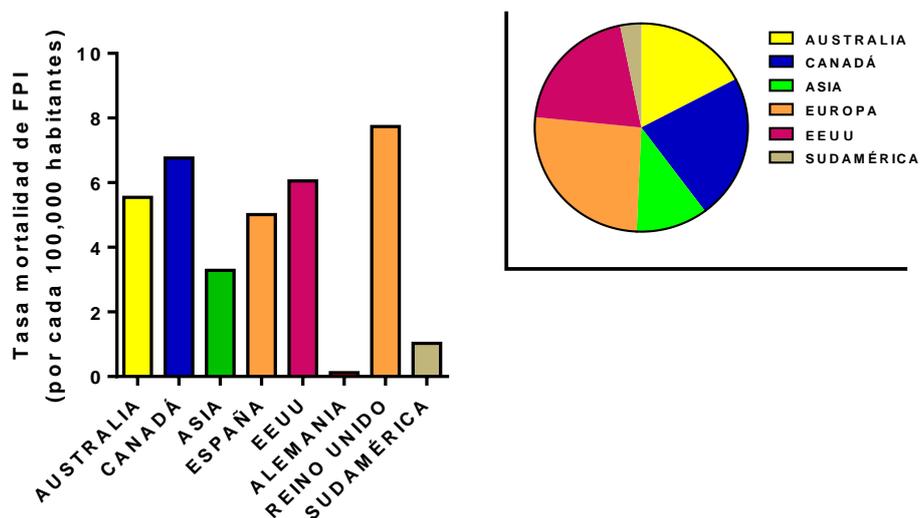
**Tabla 2. Prevalencia e incidencia de la FPI por cada 100,000 habitantes.** Tabla adaptada de Nalysnyk et al., 2012 [44]. La tabla muestra la prevalencia e incidencia de la FPI según país, periodo de estudio, edad y sexo. Dichos estudios muestran diferentes variables que dificultan el establecimiento de la incidencia y prevalencia de la FPI. Sin embargo, puede observarse que, la prevalencia aumenta con la edad y el sexo, siendo hombres los más afectados por la enfermedad. Además, se muestra EEUU como el país con mayor prevalencia e incidencia, seguida por Reino Unido.

País y periodo de estudio	Edad	Prevalencia de la FPI por cada 100,000 habitantes			Incidencia anual de la FPI por cada 100,000 habitantes		
		Todos	Hombres	Mujeres	Todos	Hombres	Mujeres
EEUU (1988-1990)	≥ 18		20,2	13,2		10,7	7,4
EEUU (1997-2005)	≥ 50	27,9				13,38	6,08
EEUU (1996-2000)	≥ 18	14			6,8		
Bélgica (1992-1996)	Todos	1,25			0,22		
República Checa (1981-1990)	Todos	12,1			0,94		
Finlandia (1997-1998)	Todos	17					
Grecia (2004)	Todos	3,38			0,93		
Reino Unido (2000-2009)	≥ 40				7,44	9,46	5,46

La FPI es una enfermedad con mal pronóstico [45]. Se cree que esta enfermedad, junto a la sarcoidosis, son las enfermedades pulmonares intersticiales más comunes, pero la falta de información básica sobre la frecuencia de la enfermedad y la mortalidad asociada ha sido una barrera importante para ensanchar el conocimiento de esta enfermedad. Hasta el momento se sabe que la tasa de mortalidad de la FPI aumenta con la edad, es consistentemente más alta en hombres que en mujeres y experimenta variaciones estacionales, con tasas de mortalidad más altas ocurridas en invierno, incluso cuando se excluyen las infecciones [46]. Multitud de estudios realizados con criterios de diagnóstico de la FPI observaron que, sólo el 20-30% de los sujetos que eran diagnosticados con la enfermedad, estaban vivos 5 años después de su diagnóstico [42, 45].

Un estudio registró que la tasa de mortalidad por FPI más elevada se encontraba en Reino Unido, donde se estimaba que alrededor de 1500 personas morían cada año

por FPI, y que el número de registros de mortalidad aumentaba progresivamente entre 1979 y 1992 [43]. De hecho, desde 1968 a 2013, se han recogido numerosos estudios que abarcaban diferentes países, donde se examinaron la mortalidad por FPI (Figura 4). La mayoría de los estudios fueron de Europa y América del Norte (25 estudios), con una minoría de Asia (cinco estudios) y Sudamérica (dos estudios). Los resultados revelaron que, en Reino Unido se registraba un mayor índice de mortalidad ( $> 1$  por 100.000), mientras que situaban a Alemania y Sudamérica en la posición más baja ( $< 0,2$  por 100.000). En la mayoría de los países la tasa de mortalidad aumentaba con los años, sin embargo, no hubo cambios en Alemania. Las diferentes metodologías utilizadas en los estudios, periodos de tiempo y las definiciones de los casos dificultan el diseño estadístico, sin embargo, durante este periodo de tiempo se ha podido ver que la incidencia ha aumentado hasta adquirir un rango ajustado de 3-9 individuos afectados por cada 100.000 habitantes al año, basándose en estimaciones conservadoras de Europa y América del Norte.



**Figura 4. Tasa de mortalidad de la FPI.** Figura realizada a partir de los datos obtenidos en el estudio de Hutchinson et al., 2005 [46] sobre el estudio de la tasa de mortalidad de la FPI realizada en Europa (España, Reino Unido y Alemania), Australia, América de Sud, Canadá, EEUU y Asia. Los estudios fueron realizados entre 1968 y 2013, y revelaron que la mayor tasa de mortalidad por FPI quedaba registrada en el Reino Unido, mientras que, Alemania y Sudamérica ocupaban la posición más baja. De este modo, Europa presenta la tasa de mortalidad más elevada por FPI, seguida por Canadá, Australia y EEUU.

### **1.2.3. Aproximaciones farmacológicas en el tratamiento de la Fibrosis Pulmonar Idiopática.**

A pesar de las extensas investigaciones sobre la patogénesis de la FPI, ninguna terapia ha demostrado mejorar definitivamente la supervivencia o la calidad de vida de estos pacientes. Desde hace un tiempo, cualquier utilidad terapéutica del tratamiento "antiinflamatorio/inmunomodulador" en FPI es cuestionada por la evolución desfavorable de ensayos donde el tratamiento con azatioprina/prednisolona y N-acetil L-cisteína (NAC), un inmunosupresor/corticoide y un antioxidante, tuvo que detenerse antes de tiempo debido a un aumento en la mortalidad (8 frente a 1 con placebo;  $p < 0,01$ ), y también en las hospitalizaciones y los eventos adversos graves [47].

Este estudio fue diseñado basándose en el resultado de un estudio previo dónde se añadía NAC o placebo junto a azatioprina/prednisolona, pero no había una rama única de placebo [48]. La combinación de ambos compuestos dio como resultado una lenta disminución de la función pulmonar en comparación con el placebo y azatioprina/prednisolona. En la actualidad, la cuestión de si NAC, por sí sola, puede influir favorablemente en el curso en la FPI está siendo abordada.

Por otro lado, la pirfenidona, demostró que, en estudios *in vitro* de fibroblastos pulmonares normales, anula la síntesis de colágeno estimulada por TGF- $\beta$ 1 [49], bloquea la proliferación de fibroblastos pulmonares humanos primarios, la producción de  $\alpha$ -actina de células del músculo liso inducida por TGF- $\beta$  y el nivel de procolágeno [50]. Esta molécula integra efectos antiinflamatorios, antioxidantes y antifibróticos en modelos experimentales de fibrosis [51]. Dos ensayos en fase III en Japón, sugirieron que la pirfenidona tenía varios impactos favorables como la disminución en el decline de la FVC (prueba que mide la funcionalidad respiratoria), el aumento de la supervivencia libre de progresión, y la disminución de las exacerbaciones agudas de la

FPI [52, 53]. El estudio CAPACITY, trató de aclarar el papel de la pirfenidona en el tratamiento de la FPI mediante la realización de dos ensayos en paralelo, multicéntricos, multinacionales y aleatorios, de pirfenidona *vs* placebo [54]. Los resultados de estos estudios fueron inconsistentes, pero con un significativo enlentecimiento del decline en la FVC en uno de los ensayos (CAPACITY II). Sin embargo, la disminución promedio de la FEV1, otro parámetro de medición de la capacidad pulmonar, en el grupo placebo fue menor de lo esperado y en general, los criterios de valoración fueron a favor de pirfenidona. La pirfenidona está actualmente aprobada como tratamiento para la FPI en la Unión Europea, Japón y Canadá, pero no en los EE.UU. La Administración de Alimentos y Medicamentos (AAM) solicita más datos de ensayos clínicos de pirfenidona para la FPI en vista de los datos inconsistentes que surgen de CAPACITY, es por ello que otro estudio está en marcha.

Imatinib, es un inhibidor de receptores tirosina quinasa que ha demostrado ser capaz de frenar la remodelación que sufre un pulmón fibrótico inducido con bleomicina en ratón. Sin embargo, no se pudo demostrar ningún beneficio en la supervivencia o la función pulmonar en pacientes con FPI en comparación con el placebo [55]. Tal vez el desarrollo actual más atractivo para la FPI es BIBF1120 (nintedanib), este compuesto es un triple inhibidor de las vías de señalización que comienzan con los receptores FGFR, VEGFR y PDGFR. Nintedanib ha sido probado en el ensayo TOMORROW a una dosis de 150mg dos veces al día, y en comparación con el placebo, dio lugar a una significativa reducción de la pérdida de la FVC y una tendencia a reducir la aparición de la exacerbación aguda *vs* placebo, lo que se consideró más que prometedor [56].

Ambos fármacos, nintedanib y pirfenidona, han recibido la etiqueta de “recomendación condicional para el tratamiento de la FPI”, ya que no son milagrosos, solo logran disminuir la tasa de progresión de la FPI y, las cuestiones relativas de la

eficacia a largo plazo y la seguridad deben ser estudiadas y aclaradas [57]. Sin embargo, hay una luz al final del túnel, y los ensayos futuros basados en el conocimiento y la experiencia previamente acumulada pueden conducir al desarrollo de fármacos más eficientes. Obviamente, debería obtenerse un fármaco a partir de los conocimientos actuales que se tienen de los mecanismos implicados e integrar los siguientes efectos: frenar la invasión de fibroblastos, proteger a las CEAI del estrés en el RE, reducir la presencia de macrófagos, evitar la TEM y reducir el reclutamiento de fibrocitos y su diferenciación a miofibroblasto.

### **1.2.4. Papel de los inhibidores de PDE4 y PDE5 en la Fibrosis Pulmonar Idiopática.**

Roflumilast es el primer inhibidor de PDE4 oral que ha sido aprobado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como tratamiento para la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC), una enfermedad muy compleja y heterogénea que puede diferenciarse en fenotipos distintos. Su uso está determinado en pacientes con EPOC severa asociada con bronquitis crónicas y antecedentes de exacerbaciones agudas. El perfil clínico y favorable de roflumilast emana, principalmente, de los efectos antiinflamatorios. Sin embargo, también puede contribuir frenando el estrés oxidativo, aliviando el mal funcionamiento mucociliar y mitigando la remodelación arquitectónica del pulmón [58].

Además de sus propiedades antiinflamatorias, roflumilast y otros inhibidores de PDE4, han demostrado tener efectos antifibróticos en animales y modelos celulares [59], sugiriendo que los inhibidores de PDE4 podrían ser un buen tratamiento para la FPI.

Estudios *in vivo* han demostrado que roflumilast y otros inhibidores PDE4 reducen numerosas funciones de los fibroblastos de pulmón humano (pero no las

limitan) como la migración, contracción del gel de colágeno [60], proliferación, transición de fibroblasto a miofibroblasto y generación de MEC [61].

Sin embargo, hasta el momento, los efectos de estos inhibidores de PDE4 sobre fibrocitos circulantes de pacientes FPI no han sido investigados. Un estudio previo demostró que, rolipram, el primer inhibidor de PDE4 actualmente retirado por sus inaceptables efectos secundarios, inhibía la MET inducida por TGF- $\beta$ 1 [62]. No obstante, no inhibía la MET por la ruta SMAD sino que su mecanismo de acción se basaba sobre la fosforilación ERK1/2 y p38, que también están involucrados en este proceso. Sin embargo, los efectos de los inhibidores de PDE4 sobre el estrés en el RE y la UPR son desconocidos.

La enzima PDE5, por su parte, es la hidrolizante prioritaria de guanósil monofosfato cíclico (GMPc) [61]. Curiosamente, hay un aumento en la expresión y actividad de PDE5 por TGF- $\beta$ 1, pero el bloqueo de solo esta isoenzima no influye en la expresión de  $\alpha$ -SMA inducida por TGF- $\beta$ 1 (indicativo de la transición a miofibroblasto). Sin embargo, con activadores guanilato ciclasa directos, sildenafilo (un inhibidor de PDE5) fue capaz de reducir la expresión de PDE5 inducida por TGF- $\beta$ 1. Este mismo estudio, basado en la expresión de las enzimas PDE4 y PDE5 en 3 líneas de fibroblastos y fibroblastos primarios de pulmón, demostró un papel crucial de PDE4 y PDE5 en el cambio fenotípico de fibroblastos a miofibroblastos inducido por TGF- $\beta$ , poniendo de manifiesto que la combinación de inhibidores de PDE4 y PDE5 podría ser un tratamiento eficaz para palear el proceso TEM implicado en la FPI. De hecho, un estudio reciente ha demostrado que, en modelos *in vivo* de distrofia muscular de Duchenne con fibrosis pulmonar asociada, la combinación de inhibidores de PDE4 y PDE5 presenta potentes efectos antifibróticos [63].

De momento, no hay estudios sobre el papel de la PDE5 en la TEM de las CEAI. Al menos, en condiciones de reposo, hay muy poca expresión de PDE5 en estas células, pero, tras la transición a las células mesenquimales, PDE5 debería sobre-expresarse.

Por otra parte, se ha demostrado que el óxido nítrico (NO) es capaz de revertir la expresión de colágeno I y la reducción de E-cadherina inducida por TGF $\beta$ -1. A la inversa, el bloqueo de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) aumenta la expresión de  $\alpha$ -SMA. El NO estimula la enzima guanilato ciclasa soluble que media el paso de GTP a cGMP. Es importante destacar que, la apoptosis también inducida por TGF- $\beta$ 1 en las CEA fue casi erradicada por el NO [64]. En cierto ensayo clínico [65], los pacientes de FPI severa y un grupo placebo, fueron tratados con sildenafil, el cual mejoró la señalización a través de la vía del NO y promovió la vasodilatación arterial pulmonar, además de que, había sido probado ya con eficacia para la hipertensión arterial pulmonar. Los investigadores testaron la hipótesis de que sildenafil mejoraba la medida de la distancia recorrida en seis minutos (test de la marcha de seis minutos o 6MW), el grado de disnea y la calidad de vida de los pacientes. Los resultados fueron que sildenafil no mejoraba la 6MW, pero sí el grado de disnea y la calidad de vida en comparación con el placebo. En otro estudio realizado [66], el objetivo también fue mejorar la 6MW, pero en pacientes FPI con disfunción sistólica unilateral ventricular derecha vs placebo. Sildenafil sí que mejoró significativamente el test 6MW.

### **1.3. Enfermedad pulmonar obstructiva crónica. Definición.**

La Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC) está caracterizada por una limitación progresiva del flujo de aire, generalmente no reversible, asociada a una respuesta inflamatoria crónica aumentada, en las vías aéreas y en el pulmón, a partículas nocivas o gases y a una serie de cambios patológicos del pulmón [67]. Además, la

presencia de exacerbaciones y comorbilidades contribuyen a la severidad global de la enfermedad [68].

Además de un principal componente pulmonar, presenta una serie de efectos extrapulmonares significativos que contribuyen a que sea considerada una enfermedad heterogénea con diversidad de manifestaciones clínicas tanto pulmonares como sistémicas.

El principal factor de riesgo para la EPOC es el tabaquismo, sin embargo, no es el único, la exposición a otras sustancias inhaladas, factores genéticos, estrés oxidativo, la edad, el género y la presencia de otras enfermedades respiratorias, también suponen un factor de riesgo considerable en el desarrollo de la enfermedad [68].

La iniciativa Global para la EPOC (Global Obstructive Lung Disease, GOLD), creada para promover el conocimiento de la EPOC y mejorar tanto la prevención como su tratamiento, ha publicado una serie de directrices para la clasificación de la severidad de la EPOC basada en los resultados de la espirometría. Esta clasificación, aunque es esencial para determinar la terapia apropiada para cada paciente individual [69], presenta una gran dificultad debida a que el grado de limitación en el flujo aéreo de la EPOC está débilmente relacionado con la severidad de la sintomatología. Además, en muchas ocasiones, la presencia de EPOC no es evidente hasta los estadios 3 y 4, dificultando el diagnóstico en etapas iniciales [70].

La clasificación espirométrica de la EPOC distingue cuatro estadios de severidad: leve, moderada, severa y muy severa. Los cortes establecidos para definir los distintos estadios son valores utilizados por su simplicidad. Un estudio en una población aleatoria encontró que el VEF1/CVF post-broncodilatador excedía 0,70 en todos los grupos de edad, apoyando el uso de este ratio fijo [71].

En la siguiente tabla se presentan los cuatro estadios junto con la sintomatología asociada y los rasgos a destacar, ya que se debe tener en cuenta que el impacto de la EPOC en un paciente individual depende no sólo del grado de limitación en el flujo aéreo sino también de la severidad de los síntomas asociados, especialmente la falta de respiración y la disminución de la capacidad de ejercicio, que afectan de manera considerable la calidad de vida de los pacientes [68].

**Tabla 3. Diagnóstico GOLD de la EPOC y clasificación basada en la severidad de la limitación en el flujo aéreo**

(Tabla adaptada de Revisión GOLD, 2011 [71].)

Estadio	Grado de severidad	VEF1/CVF	VEF1
I	Leve	< 0,70	VEF1 ≥ 80% predicho
II	Moderada	< 0,70	50% ≤ VEF1 < 80% predicho
III	Severa	< 0,70	30% ≤ VEF1 < 50% predicho
IV	Muy severa	< 0,70	VEF1 < 30% predicho o VEF1 < 50% predicho y fallo respiratorio crónico*

\*Fallo respiratorio: Presión parcial arterial de O<sub>2</sub> (PaO<sub>2</sub>) menor de 8,0 kPa (60 mmHg) con o sin hipercapnia (PaCO<sub>2</sub>) mayor que 6,7 kPa (50mmHg) mientras se respira al nivel del mar.

En los últimos años, se está llevando a cabo el estudio de pacientes diagnosticados con EPOC severa de inicio temprano, uno de los grupos con el fenotipo más agresivo de la EPOC. Estos pacientes se caracterizan por no superar la edad de 52 años, exfumadores durante más de 2 años, pero con una historia de tabaquismo superior a 30 paquetes al año, ausencia de deficiencia de  $\alpha$ 1-antitripsina y VEF1 menor del 40% [72]. Debido a la severidad de la enfermedad en estos pacientes jóvenes y a la sobre-activación neutrofílica asociada a la EPOC severa de inicio temprano, se está tratando de buscar una estrategia farmacológica que pueda reducir o incluso abolir los síntomas [73].

### 1.3.1. Procesos fisiopatológicos.

Actualmente, numerosas evidencias apuntan a un papel clave de las vías periféricas en el desarrollo y las manifestaciones clínicas de la EPOC, puesto que los cambios patológicos de los bronquiolos tienen consecuencias críticas en la progresión de la enfermedad [74]. De hecho, los bronquiolos (con diámetro interno inferior a 2 mm) son responsables del 60% de la resistencia total en la EPOC y las terapias inhaladas actuales tienen una limitada eficacia ya que se depositan mayoritariamente en las vías aéreas proximales [75-77].

La EPOC se encuentra asociada a un proceso de inflamación crónica compleja ya que se involucran una amplia variedad de células y mediadores inflamatorios. Además, el epitelio de las vías aéreas también contribuye activamente en esta respuesta inflamatoria.

Factores como el humo del tabaco u otras sustancias nocivas, inician un proceso inflamatorio que en individuos con EPOC está anormalmente amplificado [78]. El daño epitelial bronquial causado por el humo del tabaco, libera una serie de factores endógenos que desencadenan una respuesta inflamatoria caracterizada por la infiltración de células inflamatorias en la mucosa, submucosa y tejido glandular [79]. Además, también se produce un aumento de la liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS), a la que contribuyen el humo del tabaco y las células inflamatorias activadas. La excesiva liberación de moléculas ROS, produce un desequilibrio antioxidante/oxidante e inhibe la respuesta de los mecanismos antioxidantes del epitelio pulmonar, causando un daño adicional en el pulmón, así como, una amplificación de la respuesta inflamatoria [80]. Las consecuencias adversas del estrés oxidativo en los pulmones incluyen: activación de genes inflamatorios, inactivación de antiproteasas y estimulación de la secreción de moco, entre otras [81].

Las células inflamatorias infiltradas también liberan enzimas proteolíticas que, en caso de no existir un equilibrio con factores antiproteolíticos, contribuyen a la formación de enfisema a través de la destrucción de componentes del tejido conectivo del parénquima. Tanto la neutrófilo elastasa como las metaloproteinasas de matriz (MMP) destacan como importantes proteasas que contribuyen a la patogenia de la EPOC [82].

Existen evidencias que apuntan a los neutrófilos como las principales células efectoras de la enfermedad [83]. De hecho, el patrón inflamatorio de los pulmones de individuos con EPOC se caracteriza por la presencia de un número aumentado de neutrófilos (en el lumen bronquial) pero también de macrófagos (en el lumen, en la pared bronquial y en el parénquima) y linfocitos CD8+ (en la pared bronquial y parénquima). El reclutamiento de estas células inflamatorias está controlado por una serie de quimiocinas, como interleuquina (IL) 8 (CXCL8) y quimiocina CXC ligando 1 (CXCL1) en el caso de los neutrófilos. Estas células son las principales responsables de la respuesta inflamatoria [78] y de su amplificación mediante la liberación de una serie de mediadores [84, 85], tales como, factores quimiotácticos (liberados por macrófagos alveolares, células epiteliales y neutrófilos que atraen células inflamatorias de la circulación), TNF- $\alpha$ , IL (1 $\beta$  y 6) y factores de crecimiento (como el TGF- $\beta$ 1).

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

**Tabla 4. Patrón inflamatorio en los diferentes estadios de la EPOC** (Figura adaptada de Barnes PJ, 2011 [81])

	<b>EPOC LEVE</b>	<b>EPOC SEVERA</b>	<b>EXACERBACION EPOC</b>
<b>Neutrófilo</b>	++	+++	++++
<b>Eosinófilo</b>	0	0	0
<b>Mastocito</b>	0	0	?
<b>Macrófago</b>	+++	++++	++++
<b>Linfocitos T y B</b>	+	+++	?
<b>Citoquinas</b>	TNF- $\alpha$ +	TNF- $\alpha$ ++	TNF- $\alpha$ +++
<b>Quimiocinas</b>	CXCL8+, CXCL1+, MCP1	CXCL8++	CXCL8+++
<b>Mediador lipídico</b>	LTB4 +	LTB4 ++	TNF- $\alpha$ +++
<b>Estrés oxidativo</b>	+	+++	++++

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

### 1.3.2. Clínica de la enfermedad. Epidemiología, prevalencia y mortalidad.

La EPOC está aumentando en prevalencia e incidencia, así como en mortalidad en todo el mundo. La OMS predice que para el año 2020 la EPOC se convertirá en la quinta enfermedad más prevalente en todo el mundo y, hasta la tercera en cuanto a causa más común de muerte. La progresión de esta enfermedad causa un gran consumo de recursos sanitarios [74]. Estas previsiones, basadas en indicadores actuales (como la continua exposición a factores de riesgo) [86], así como el aumento en la carga social y económica [87], sugieren que la EPOC se convertirá en uno de los principales desafíos sanitarios de las próximas décadas. Es importante destacar que, debido al lento desarrollo de esta enfermedad, aunque se evitase la exposición actual a los factores de riesgo, se estima que el daño de la EPOC continuaría durante décadas [67].

El perfil demográfico es otro indicador relacionado con el cambio actual que se encuentra caracterizado por el progresivo incremento en la proporción de población de edad avanzada [68]. El envejecimiento de la población tiene y tendrá un impacto en la

epidemiología de esta enfermedad, ya que se ha descrito que la EPOC puede ser consecuencia de una exposición acumulada durante años a los distintos factores de riesgo [88].

En general, la prevalencia de la EPOC se encuentra directamente relacionada con el consumo de tabaco, que hoy en día, es considerable, ya que el número de fumadores se estima en aproximadamente 1,1 mil millones en todo el mundo [89]. El aumento de la prevalencia afecta especialmente a países en desarrollo, donde ha aumentado el consumo de tabaco y han disminuido otras causas de muerte, como las infecciones severas [79]. En estos países, la exposición a otras sustancias inhaladas también es un factor que contribuye en la prevalencia [86].

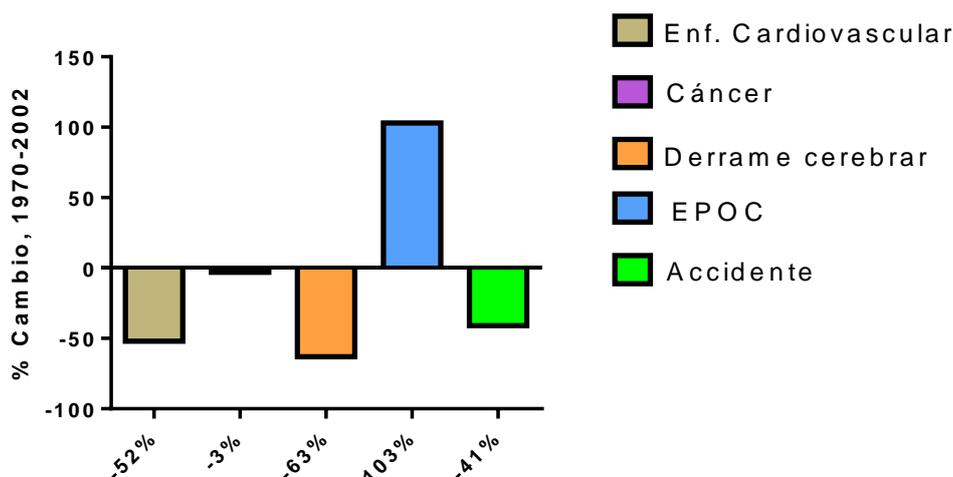
Con respecto al tabaquismo, existen estudios que describen una mayor prevalencia de la EPOC en fumadores y exfumadores en comparación a no fumadores. Además, también se describe una mayor prevalencia en hombres que en mujeres y en personas mayores de 40 años, comparado con personas más jóvenes [90, 91]. De hecho, la prevalencia de la EPOC en la población general está estimada en un 1%, pero aumenta considerablemente a valores de 8,10% en personas de 40 años en adelante [91].

La prevalencia y distribución global de la EPOC han sido investigadas en diferentes estudios, entre los que destacan el estudio Burden of Obstructive Lung Disease (BOLD) [92] y el Proyecto Latinoamericano de Investigación en Obstrucción Pulmonar (Proyecto PLATINO) [93]. Los resultados del estudio BOLD, llevado a cabo en distintos países, muestran importantes diferencias en cuanto a la prevalencia de la EPOC, con datos que oscilan entre un 9% en Reykjavik y un 22% en Ciudad del Cabo (en hombres) y entre un 4% en Hannover y un 17% en Ciudad del Cabo (en mujeres).

El proyecto PLATINO examinó la prevalencia de la limitación en el flujo aéreo, post-broncodilatación, en personas mayores de 40 años en cinco ciudades

sudamericanas. Los resultados mostraron diferencias de prevalencia entre países, entre individuos de edades diferentes (con mayor prevalencia por encima de los 60 años), y también entre hombres y mujeres (mayor en hombres) [93].

En los últimos años, la EPOC ha adquirido relevancia como causa de mortalidad, escalando posiciones desde un sexto lugar en 1990 al cuarto en el año 2000 y, según las estimaciones actuales, ocupará un previsible tercer lugar en el año 2030 [94]. De hecho, tal y como se muestra en la siguiente figura, la tasa de mortalidad debida a la EPOC aumentó de manera considerable en Estados Unidos, entre los años 1970 y 2002, a diferencia de otras enfermedades que presentan una disminución en la mortalidad a lo largo de ese mismo periodo [95].



**Figura 5. Porcentaje de cambio en los datos de mortalidad atribuidos a las seis principales causas de muerte en EEUU entre 1970-2002.** Figura adaptada de Jemal A., 2005 [95]. En la tabla se reflejan los cambios de mortalidad atribuidos a las seis principales causas de mortalidad en EEUU: Enfermedad cardiovascular, cáncer, derrame cerebral, EPOC y accidentes.

Estas estimaciones apuntan a que en el año 2030 la EPOC será la causa directa subyacente de un 7,8% de todas las muertes. Además, representará un 27% de las muertes relacionadas con el tabaco, sólo superado por el cáncer (33%) y por las enfermedades cardiovasculares (29%) [89]. Este previsible aumento de la mortalidad se

justificaría por un aumento del tabaquismo, la reducción de otras enfermedades mortales, la creciente exposición a otros factores de riesgo y el envejecimiento de la población [68].

### 1.3.3. Aproximaciones farmacológicas clásicas.

La aproximación farmacológica generalmente aceptada está basada en las directrices GOLD para el manejo de la EPOC. Actualmente, los broncodilatadores inhalados de larga duración (agonistas  $\beta_2$  y anti-colinérgicos) constituyen el pilar de la terapia farmacológica en la EPOC [78], pero no es el único tratamiento que existe. A continuación, se detallan los tratamientos usados en la EPOC:

**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 [68]. Por ello, actualmente se trabaja en la mejora de los broncodilatadores existentes, así como en posibles combinaciones con anticolinérgicos ya que se han descrito efectos aditivos entre ambos [96].

**Agonistas  $\beta_2$ .** Los agonistas  $\beta_2$  producen una relajación del músculo liso bronquial mediante la estimulación de los receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos, que aumentan el AMPc intracelular [97], 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). Los  $\beta$ -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.

**Anticolinérgicos.** Los agentes anticolinérgicos producen broncodilatación al reducir la contracción de la musculatura lisa, antagonizando el tono colinérgico endógeno. Su principal efecto es el bloqueo del efecto de la acetilcolina en los receptores muscarínicos [98]. Se distinguen dos subtipos: acción corta (Bromuro de Ipratropio, Bromuro de Oxitropio) y acción larga (Tiotropio).

**Metilxantinas.** En este subgrupo destaca la teofilina, que constituye un tratamiento clásico de la EPOC. La teofilina presenta un efecto positivo sobre la fuerza del diafragma, un aumento del rendimiento de los músculos respiratorios, una reducción del atrapamiento aéreo y una reducción de las agudizaciones [99]. Sin embargo, la teofilina, utilizada inicialmente como broncodilatador, ha sido relegada por sus modestos efectos comparados con otros broncodilatadores actuales, utilizándose como tratamiento principalmente de la EPOC severa. La teofilina ejerce su efecto actuando como inhibidor no selectivo de fosfodiesterasa, sin embargo, su utilidad es limitada dada su menor eficacia y sus efectos adversos.

**Corticosteroides.** Los corticosteroides inhalados constituyen el principal tratamiento antiinflamatorio 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 limitados a indicaciones específicas, como en el caso de pacientes con EPOC avanzada por su utilidad en el tratamiento de las exacerbaciones [100]. Se distinguen corticoides inhalados (Beclometasona, Budesonida, Fluticasona) y sistémicos (Prednisona, Metilprednisolona).

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

### **1.3.4. Nuevas aproximaciones farmacológicas. Papel de la PDE4 y PI3K en EPOC.**

En los últimos años ha mejorado considerablemente el conocimiento de los mecanismos celulares y moleculares implicados en la inflamación, en los cambios estructurales y en los mecanismos de lesión y reparación que caracterizan la fisiopatología de la EPOC. Esto ha contribuido a la identificación de nuevas dianas terapéuticas.

Se sabe que el aumento de AMPc modula los procesos inflamatorios y que la PDE4 se encarga de su degradación. Por ello, desde que se conoce que la PDE4 se expresa en todas las células de relevancia en la EPOC (entre ellos los neutrófilos, células T, macrófagos, células epiteliales de las vías respiratorias...), los inhibidores selectivos de PDE4 están resultando atractivos como tratamiento de esta enfermedad [1]. De hecho, se conocen infinidad de efectos funcionales de los inhibidores de PDE4 en modelos celulares y animales que reflejan su capacidad en la regulación de la inflamación, remodelación, el estrés oxidativo o fallos en el funcionamiento mucociliar.

Estudios *in vitro* de inhibidores de PDE4, han demostrado que reducen la producción de las ROS, la degranulación, la liberación de leucotrieno B4 (LTB4) de los

neutrófilos, la proliferación, las citoquinas (IL-2, IL-4, IL-5, IL-13, interferón gamma (IFN- $\gamma$ )) o la liberación de granzima B a partir de células T, así como, su proliferación, mejora de la frecuencia de batido ciliar y protege el fenotipo ciliado, al tiempo que reduce MUC5AC, gen de mucina de células epiteliales bronquiales [101].

*In vivo*, los inhibidores de PDE4 frenan la afluencia de neutrófilos en lavados bronqueoalveolares después de la estimulación con lipopolisacárido (LPS) de *Escherichia coli* o la exposición al humo del cigarrillo, mejoran el enfisema producido por el humo del tabaco a largo plazo, reducen la remodelación fibrótica del pulmón inducida por bleomicina y atenúan el remodelado vascular y la hipertensión pulmonar. El inhibidor de PDE4, roflumilast, además de ser un fármaco anti-inflamatorio no esteroideo diseñado para atacar la inflamación pulmonar, la farmacología preclínica lo describe como un fármaco de amplio modo funcional, capaz de mitigar mecanismos implicados en EPOC [58, 59, 102, 103].

Los neutrófilos que desempeñan un papel fundamental en la fisiopatología de la EPOC (y la bronquitis crónica), donde actúan como célula efectora clave a través de la liberación de un número de mediadores, han demostrado poseer una menor sensibilidad a los glucocorticoides, cosa que no ocurre con los inhibidores de PDE4 [101]. Estudios recientes realizados por nuestro grupo, muestran los potentes efectos antiinflamatorios de roflumilast sobre los neutrófilos de sangre periférica de pacientes con EPOC, mientras que los efectos de los glucocorticoides presentan deficiencias si se compara con los controles sanos. Por otra parte, los neutrófilos de sangre periférica de pacientes con EPOC muestran una mayor expresión de factor de inhibición de la migración de macrófagos (MIF), PI3K $\delta$  y receptor glucocorticoide beta (GR $\beta$ ) y, disminución de la actividad/expresión de histona deacetilasa-2 (HDAC-2) y MAP quinasa fosfatasa-1

(MKP1), lo que puede explicar el deterioro de la eficacia antiinflamatoria de los glucocorticoides en este sistema experimental [104].

Todas las familias de PI3K se expresan en los neutrófilos, implicados en muchos procesos relacionados con la activación de las células como lo demuestra la liberación de superóxidos, la migración, la supervivencia o la fagocitosis [105, 106]. La migración de neutrófilos aparece como ejemplo para la colaboración secuencial de PI3K y su subtipo  $\delta$ . De hecho, la generación de PIP3 vía PI3K [107] induce la polarización temprana [108], mientras que, se cree que PI3K $\delta$  facilita la posterior localización del pseudópodo, orientando la célula a señales quimioatrayentes [109]. Las vías clásicas de señalización de PI3K sugieren que la clase 1A ( $\delta$ ) y la clase 1B ( $\gamma$ ) están reguladas diferencialmente (la primera por tirosina quinasas y la segunda por receptores acoplados a proteínas G), sin embargo, ambas isoformas se pueden activar en presencia de N-Formyl-methionine-leucyl-phenylalanine (fMLP) con evidencia de redundancia funcional entre las isoformas 1A y B en neutrófilos. De hecho, la inducción de los neutrófilos por fMLP produce un efecto llamado “estallido respiratorio” que también fue reducido por un inhibidor de PI3K $\delta$  [110]. Recientemente, se ha demostrado que el estallido respiratorio provocado por la estimulación mediada por el receptor Fc $\gamma$  (Fc $\gamma$ R) de los neutrófilos humanos con inmunocomplejos, se reduce de manera eficiente por los inhibidores selectivos de PI3K $\beta$ , lo que indica un papel del subtipo  $\beta$  de PI3K cuando los inmunocomplejos detectan Fc $\gamma$ R [111].

La PI3K $\delta$  está sobreexpresada en pulmones y neutrófilos de sangre periférica de EPOC [112]. Dicho aumento de PI3K $\delta$  podría explicar la respuesta limitada a esteroides en la inflamación neutrofílica de las vías aéreas en EPOC. En definitiva, los inhibidores de PI3K $\delta$  restauran la sensibilidad a esteroides en modelos celulares y animales. El

inhibidor de PI3K $\delta$  (GSK2269557), altamente potente y selectivo, está actualmente en fase inicial de desarrollo clínico en EPOC como un remedio inhalado.

Un estudio reciente ha indicado que el efecto aditivo de un inhibidor de PI3K $\delta$ , llamado IC87114, junto a roflumilast, inhibe la liberación de elastasa neutrofílica inducida por fMLP en neutrófilos humanos [113]. Mientras que por sí solos, roflumilast y el inhibidor IC87114 redujeron la liberación de elastasa en un 32% y un 25%, respectivamente, cuando ambos se sumaron la reducción fue del 75% [113]. Sin embargo, los resultados fueron observados en neutrófilos aislados de donantes sanos, pero no en neutrófilos EPOC. Este estudio pone de manifiesto que la combinación de inhibidores PDE4 y PI3K $\delta$  podrían causar un efecto beneficioso en la sobre-activación de los neutrófilos aislados de pacientes con EPOC severa, especialmente en neutrófilos aislados de pacientes con EPOC severa de inicio temprano.

## **2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**



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

- ✓ En primer lugar, se ha descrito que la enzima PDE4 está involucrada en las enfermedades pulmonares crónicas, entre ellas, la FPI y EPOC. Así como, la PDE5 se encuentra sobreexpresada en FPI.
- ✓ La combinación de inhibidores PDE4 y PDE5 ha demostrado efectos sinérgicos en células musculares de pulmón, sin embargo, se desconocen sus efectos en el resto de tipos celulares y, si estos efectos serían similares o superiores a los tratamientos ya aprobados para la FPI (Pirfenidona y nintedanib).
- ✓ Los inhibidores PDE4 están actualmente aprobados como tratamiento en pacientes con EPOC severa con bronquitis crónica y antecedentes de exacerbaciones. Sus efectos no han sido estudiados en los fenotipos más agresivos de la EPOC, como la EPOC severa de inicio temprano.
- ✓ La isoenzima PI3K $\delta$  está sobreexpresada en EPOC. Se cree que su sobreexpresión puede desarrollar un papel clave en la resistencia a corticoesteroides, así como, en la inflamación de las vías aéreas de pacientes EPOC.
- ✓ Actualmente, existe un gran interés en los tratamientos de inhibidores de PI3K en EPOC. Se ha demostrado que la combinación de inhibidores PI3K $\delta$  y PDE4 disminuye la liberación de enzimas degradadoras asociadas a la EPOC. Sin embargo, se desconoce el papel de estos compuestos, así como, su combinación en fenotipos agresivos de la EPOC.

En base a los antecedentes expuestos se establecen la siguiente hipótesis:

- Los inhibidores de PDE4 inhiben procesos celulares fundamentales en la FPI y, su combinación con inhibidores de PDE5, presenta un efecto aditivo sobre las transformaciones celulares observadas en la FPI.
- Los inhibidores de PDE4 disminuyen la súper-activación neutrofílica y, en combinación con inhibidores de PI3K $\delta$ , presentan efectos aditivos sobre procesos inflamatorios clave en los fenotipos más agresivos de la EPOC, como la EPOC severa de inicio temprano.

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

**Objetivo 1. Evaluación de los efectos de la combinación de inhibidores PDE4 y PDE5 en FPI.**

- a) Estudiar los efectos inhibitorios de roflumilast N-óxido (inhibidor de PDE4) y sildenafilo (inhibidor de PDE5) y, sus posibles efectos aditivos en combinación, sobre las transformaciones celulares epitelial-alveolar tipo II y fibrocitos a células mesenquimales, así como, sobre la migración y viabilidad celular como modelo traslacional de los procesos patológicos en la FPI.

**Objetivo 2. Evaluación de los efectos de la combinación de inhibidores PDE4 y PI3K $\delta$  en EPOC severa.**

- a) Estudiar los efectos inhibitorios de roflumilast N-óxido (inhibidor de PDE4) y CAL-101 (inhibidor de PI3K $\delta$ ), así como, sus posibles efectos aditivos en combinación, sobre el fenotipo superactivo asumido por los neutrófilos de EPOC severa.

### **3. MATERIAL Y MÉTODOS**



### 3.1 PROPUESTA 1: MODELO FPI

#### 3.1.1. Fármacos

En el modelo de FPI planteado en este trabajo se han utilizado los siguientes fármacos:

- **Roflumilast-N-óxido (RNO).** RNO es un metabolito de roflumilast. RNO (nombres comerciales Daxas, Daliresp) es un fármaco que actúa como un inhibidor selectivo de acción prolongada de la enzima PDE4. Tiene efectos antiinflamatorios y está en desarrollo como un fármaco administrado por vía oral para el tratamiento de afecciones inflamatorias de los pulmones, tales como asma y EPOC.
- **Sildenafil.** El sildenafil funciona como un inhibidor selectivo y competitivo de las PDE5 en las células del músculo liso del pene y la vasculatura pulmonar, y se utiliza ampliamente para la disfunción eréctil y menos comúnmente para la hipertensión pulmonar.
- **Pirfenidona** (Sigma; p2116). La pirfenidona es un agente antifibrótico sintético activo, que se administra oralmente, y que es derivado de la piridinona. La pirfenidona inhibe los factores de crecimiento de fibroblastos, epidérmicos, derivado de plaquetas y transformantes  $\beta$ -1, lo que ralentiza la proliferación de células tumorales. Este agente también inhibe la síntesis de ADN y la producción de ARNm para los tipos de colágeno I y III, dando como resultado una reducción en la fibrosis inducida por radiación.
- **Nintedanib** (Selleckchem.com, S1010). Nintedanib es un antagonista del receptor de tirosina quinasa disponible oralmente que inhibe la formación de colágeno y se usa para tratar la fibrosis pulmonar idiopática.

En la siguiente tabla se recogen las dosis experimentales de los fármacos utilizados:

**Tabla 5. Dosis utilizadas de los fármacos en el modelo *in vitro* de FPI.**

<b>Fármacos</b>	<b>Dosis establecidas</b>
<b>RNO</b>	2nM; 1μM
<b>Sildenafil</b>	10nM; 100nM
<b>RNO + Sildenafil</b>	2nM, 10nM
<b>Pirfenidona</b>	500μM
<b>Nintedanib</b>	100nM

El RNO se ha utilizado a las concentraciones de 1μM y 2nM. La dosis 1μM corresponde a la concentración requerida para una inhibición total y selectiva de la PDE4. La dosis 2nM corresponde a aproximadamente la mitad de la inhibición máxima de la PDE4 [114] y a la concentración plasmática libre en humanos tras la administración clínica de roflumilast, a una dosis de 500 μg/día [115].

Las dosis de sildenafil a 100nM se corresponde con una concentración aproximada a la capacidad total de inhibición de la PDE5 mientras que, la dosis de 10nM se corresponde con una concentración ligeramente superior a la IC50 y es comúnmente utilizada para estudios de combinación [116].

La pirfenidona y el nintedanib sirvieron como compuestos de referencia. La pirfenidona está aprobada para la FPI en la Unión Europea, Canadá, Japón. Por su parte, nintedanib, está en fase tres de desarrollo clínico para la FPI. Las dosis establecidas son las comúnmente utilizadas como referencia.

Para utilizar las concentraciones requeridas, se preparó una concentración stock en dimetilsulfóxido (DMSO) y se realizaron diluciones posteriores en medio de cultivo.

En general, las soluciones madre de los compuestos de ensayo y de referencia se prepararon a una concentración de 10mM en DMSO. Las diluciones adicionales se prepararon con el vehículo/medio utilizado para el ensayo experimental, de modo que, cada compuesto presentó su dosis especificada en la Tabla 5.

### **3.1.2. Población de estudio**

Para el aislamiento de los fibrocitos primarios humanos de sangre venosa periférica se tomaron muestras de donantes sanos en el Hospital General de la Universidad de Valencia (España), bajo la aprobación del IRB y el consentimiento informado cumpliendo con los reglamentos local e internacional.

### **3.1.3. Aislamiento y cultivo de fibrocitos humanos**

Los fibrocitos humanos primarios se aislaron a partir de sangre venosa periférica de donantes sanos. Se extrajeron 60-100 ml de sangre de donantes de 20-60 años de edad y el total de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) fueron aisladas por centrifugación con ficoll (Pharmacia, Uppsala, Sweden). Estas se sembraron y después de dos días de cultivo en placa con DMEM (Life Technologies, Gaithersburg, MD, EE. UU.) suplementado con suero de ternero fetal 20% (FCS; HyloneLabs, Logan, UT, USA) las células no adherentes se eliminaron mediante una única y suave aspiración. Después de otros 10-12 días de cultivo continuo las células adherentes se levantaron tras la incubación con acutasa (Millipore, Billerica, MA, USA), una solución que tiene enzimas proteolíticas y colagenolíticas que rompe las uniones intercelulares, y se captaron por selección inmunomagnética. Se determinó la viabilidad celular con azul

de tripano (Sigma), la cual debía ser superior al 90%. La inmunofluorescencia confirmó el aislamiento de fibrocitos tras la adición de marcadores CD45, colágeno I, y CXCR4.

#### **3.1.4. Aislamiento y cultivo de células epitelial-alveolares tipo II**

Se aislaron CEAI a partir de tejido pulmonar humano como se ha descrito en nuestro laboratorio [117]. En resumen, para aislar CEAI, el tejido del parénquima pulmonar se cortó en secciones de aproximadamente 1 mm de espesor y se lavó con solución salina. Las secciones de pulmón se digirieron con tripsina al 0,25% (T8003, Sigma, St. Louis, MO), disolvieron en solución salina (100 ml) y suspendieron en NaCl al 0,9% a 37°C durante 30 minutos. Tras la digestión, las secciones de los pulmones se trataron con ADNasa disuelta en solución salina (7.500 U / 100 ml), y se filtraron a través de mallas de nylon. La suspensión de células resultante se centrifugó (250xG, 20 min a 10°C) a través de un gradiente de Percoll estéril y se eliminó la banda de celulares CEAI (la banda enriquecida con CEAI es usualmente la segunda banda en el gradiente). Se administró un segundo tratamiento con DNasa (2.000 U / 100 ml) y las células se recuperaron por centrifugación a 250 x g durante 20 minutos. Se resuspendieron en 5 ml de DCCM-1 (Biological Industries, Kibbutz Beit Haemek, Israel) suplementado con 2% (p / v) de L-glutamina y se sometieron a un acoplamiento diferencial en una placa de Petri. Se recogieron las CEAI después de 2 horas y se contaron para establecer el rendimiento final de células recién purificadas. La viabilidad celular se evaluó con azul de tripano (Sigma), y alcanzó una viabilidad >95%. La pureza celular se evaluó de forma rutinaria mediante la morfología de las células epiteliales y el análisis de inmunofluorescencia para la proteína pro-surfactante C (positividad) y  $\alpha$ -SMA (negatividad). Finalmente, las células CEAI se suspendieron en DMEM suplementado con 10% de FCS, 2 mM de L-glutamina, 100 U / ml de penicilina y 100

µg / ml de estreptomicina, y se cultivaron durante 24 horas para permitir la unión. El cultivo se realizó en atmósfera humidificada al 5% de CO<sub>2</sub> y 37°C.

### 3.1.5. Diseño experimental

Las CEAI y fibrocitos, fueron cultivadas en placas Petri, placas de 6 pocillos o en placas de inmunoensayo, dependiendo de la técnica a analizar. Los ensayos se realizaron por triplicados. Se sembraron a una confluencia del 70-80% y se incubaron durante, mínimo, 48h. Tras ese periodo de tiempo y una vez alcanzada una confluencia del 70-80%, se procedió al ensayo experimental. Se administraron los fármacos durante 30min y a continuación el estimulante, TGF-β1 10n/ml en CEAI y 5ng/ml en fibrocitos circulantes, durante 48-72h (Figura 6). Una vez finalizado el tiempo de incubación con fármacos y estimulante, se realizaron los siguientes estudios: expresión genética por RT-PCR, expresión proteica por western blot e inmunofluorescencia. En el caso de los fibrocitos circulantes también se estudió la migración celular, pero las células fueron estimuladas con CXCL12 100ng/ml, FCS 20% y fibronectina 5µg/ml.

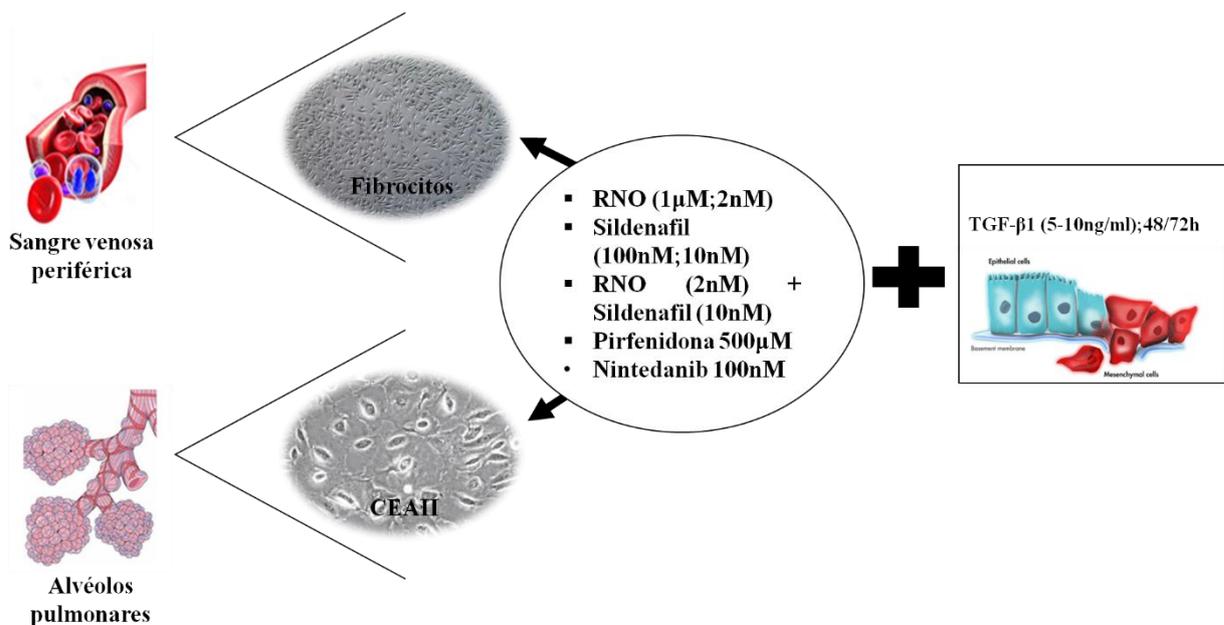


Figura 6. Protocolo experimental diseñado para el estudio de los inhibidores PDE4 y PDE5, y su combinación, en CEAI y fibrocitos circulantes.

### **3.1.6. Estrés del RE/UPR en células epitelial-alveolares tipo II**

Dado el papel del estrés del RE y la señal UPR en la lesión/disfunción de las CEAI, y su aparente falta de investigaciones con inhibidores de PDE4 y PDE5, se ha llevado a cabo un estudio de marcadores de estrés en el RE (Grp78), marcadores UPR (IRE, pIRE, ERK1/2 y pERK1/2). El estudio de Grp78 se realizó mediante RT-PCR, mientras que, la expresión de IRE y pIRE se midió por western blot e inmunofluorescencia y, ERK1/2 y pERK1/2 por western blot.

### **3.1.7. Ensayo de migración de fibrocitos por CXCL12**

Para el ensayo de migración se usó el kit “Cytoselect de 96 pocillos con un tamaño de poro de 8µm” (Cell Biolabs, CBA-106). Este kit cuenta con dos cámaras, dónde se variaron las condiciones, separadas por una membrana de policarbonato con un tamaño de poro determinado. En la cámara inferior se colocó DMEM con 20% de FCS, 5µg/ml de fibronectina o 100ng/ml de CXCL12 como quimioatrayentes (Mehrad, Burdick and Strieter, 2009). Los fibrocitos fueron sembrados en la cámara superior (105 células/100µl) en DMEM con 0,1% de FCS y pre-incubados con los compuestos de ensayo durante 30 minutos. A continuación, se acopló la cámara superior a la inferior, donde los compuestos estaban presentes en ambas placas de migración en idénticas concentraciones, durante 6 horas. Al final del período de migración, se eliminó el contenido de la cámara superior, se retiró la membrana y se colocó en otra bandeja de recolección de células de 96 pocillos, previamente llenada con 150µl de solución de desprendimiento celular, durante 30 min. Tras el tiempo de incubación, las células desprendidas de la membrana junto con las de la cámara inferior se lisaron con un tampón de lisis y solución de CyQuant® GR Dye, y se midió por la excitación/emisión

de fluorescencia a 480nm/520nm. El número de células que habían migrado se cuantificó gracias a una curva patrón.

### 3.1.8. Real time PCR

El ARN total se aisló a partir de las CEAI y fibrocitos mediante el reactivo de aislamiento TriPure® (Roche, Indianapolis, EE.UU). La integridad del ARN extraído se confirmó con Bioanalyzer 2100 (Agilent, Palo Alto, CA, EE.UU). La concentración de ARN para la reacción de transcripción inversa fue de 300ng/pocillo y se utilizó el kit de reactivos de transcripción inversa TaqMan reactivos (Applied Biosystems, Perkin-Elmer Corporation, CA, EE.UU). El ADNc resultante fue amplificado con ensayos específicos prediseñados por AppliedBiosystems (Assay-by-Design) para  $\alpha$ -SMA (Hs00559403\_m1),  $\alpha$ 1(I)-colágeno (colágeno tipo I; cat. n°: Hs00164004\_m1), vimentina (cat. n°: Hs 00958116\_m1), E-cadherina (cat. n°: Hs01023894\_m1), zona ocludens-1 (ZO-1; cat. n°: Hs01551861\_m1), KRT18 (cat. n°: Hs02827483\_g1), PDE5A1 (Hs00153649\_m1), PDE4B (Hs00277080\_m1), PDE4D (Hs01579628\_g1), PDE7A (Hs00300285\_m1), PDE7B (Hs01054008\_m1), PDE1A (Hs00897273\_m1), PDE1B (Hs00354773\_m1), PDE1C (Hs01095682\_m1), PDE3A (Hs01012698\_m1), PDE3B (Hs01057215\_m1), PDE4A (Hs01102342\_mH), CXCR4 (Hs00607978\_s1), Grp78 (Hs00607129\_gH), CD45 (Hs04189704\_m1), TGF- $\beta$ 1(Hs00171257\_m1) y GAPDH (prediseñado por Applied Biosystem, cat. n°: 4352339E) como control interno en un 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystem) usando Universal Master Mix (Applied Biosystem). La cuantificación relativa de estos diferentes transcritos se determinó con el método 2- $\Delta\Delta$ Ct usando GAPDH como control endógeno (Applied Biosystem; 4352339E) y normalizado con los controles que no se habían estimulado.

### 3.1.9. Western Blot

El análisis western blot se llevó a cabo para detectar cambios en  $\alpha$ -SMA y colágeno tipo I en fibrocitos y, SMAD3, pSMAD3, IRE, pIRE, ERK1/2 y pERK1/2 en CEAI. Las células se lisaron con un tampón de lisis que consta de 20mM Tris pH7.4, 1mM EDTA, 150mM NaCl, 0.1% Triton X-100, 1mM ditioneitol 1mg ml<sup>-1</sup> de pepstatina A complementado con un cóctel inhibitorio de proteasas. El ensayo Bio-Rad (Bio-Rad Laboratorios Ltd., Herts, UK) se utilizó para cuantificar la concentración de proteínas en cada muestra de forma que se garantice la igualdad en la concentración de cargas. Las proteínas se separaron por electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio de acuerdo con su peso molecular. Brevemente, 20 $\mu$ g de proteínas desnaturalizadas junto con un marcador de peso molecular (Bio-Rad Kaleidoscope marker, Bio-Rad Laboratories) se cargaron en un gel de acrilamida y corrieron a través del gel mediante la aplicación de 100V durante 1h. Las proteínas fueron transferidas desde el gel a una membrana de difluoruro de polivinilideno usando un método de transferencia húmedo. La membrana se bloqueó con 2,5% BSA (Bovine Serum Albumin) en PBS con 0.1% Tween20 (PBS-T) y después se examinó con los siguientes anticuerpos: mouse anti-human  $\alpha$ -SMA (cat. n°: A5228; Sigma), rabbit anti-human collagen type I antibody (cat. n°: PA1-26204; Affinity Bioreagents), rabbit anti human phospho IRE-1 $\alpha$  (Abcam 48187), rabbit anti human IRE-1 $\alpha$  (Abcam 37073), y normalizado con mouse anti-human  $\beta$ -actin (1:1,000) antibody (monoclonal antibody cat n°: A1978; Sigma) como estándar interno. La detección de quimioluminiscencia de proteínas se realizó con ECL plus (Amersham GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). Los resultados de los experimentos se reportaron como análisis densitométrico y como western blot representativos.

### 3.1.10. Inmunofluorescencia

El análisis de inmunofluorescencia se llevó a cabo para la medida de los siguientes marcadores: IRE/pIRE, SPC,  $\alpha$ -SMA y anexina en CEAI y, colágeno tipo I y CD45 en fibroцитos.

Tras finalizar el experimento, el medio fue retirado y las células fijadas con paraformaldehído 4% (Applichem, Panreac) durante 30 minutos. Para permeabilizar la membrana se incubó con Tritón 100x al 0,1% en PBS a temperatura ambiente. A continuación, se trató con una solución de bloqueo (PBS + 10% suero de cabra + 1% BSA) para reducir la unión no específica de anticuerpo. Posteriormente, se añadió el anticuerpo primario correspondiente disuelto en PBS con 1% de BSA (1:200) y se dejó incubar durante toda la noche. Los anticuerpos usados fueron: rabbit anti human phospho IRE-1 $\alpha$  (Abcam, 48187), rabbit anti human IRE-1 $\alpha$  (Abcam, 37073), rabbit anti-human CD45 (cat. n°: CBL1502; Millipore), rabbit anti-human collagen type I antibody (cat. n°: PA1-26204; Affinity Bioreagents). Al día siguiente, se añadió el anticuerpo secundario fluorescente. A partir de la incubación del anticuerpo secundario se trabajó en oscuridad. Se tiñó el núcleo con DAPI (1:1,000) en PBS y se procedió al montaje de los portaobjetos con los cristales sobre los cuáles habían crecido las células.

## 3.2. PROPUESTA 2: MODELO EPOC

### 3.2.1. Fármacos

En el modelo de EPOC severa planteado en este trabajo se han utilizado los siguientes fármacos:

- **RNO.** RNO se utilizó como inhibidor de PDE4 que posee efectos antiinflamatorios. Actualmente, ha sido aprobado por la OMS como

tratamiento en pacientes con EPOC severa asociada con bronquitis crónica y antecedentes de exacerbaciones.

- **Inhibidores PI3K.** Se utilizaron inhibidores selectivos de los subtipos de PI3K y un inhibidor pan.
- **LY294002** (Selleckchem, S1105). Es la primera molécula sintética que se sabe que inhibe a las isoformas  $\alpha$  /  $\delta$  /  $\beta$  de PI3K. Ha demostrado inactivar Akt / PKB, inhibiendo la proliferación celular, induciendo la apoptosis en líneas celulares de cáncer de colon y, consecuentemente, disminuyendo la expresión de fosforilados Akt (Ser473).
  - **PIK-75** (Selleckchem, S1205). Es un inhibidor de PI3K $\alpha$ . Se ha demostrado que reduce la actividad mitocondrial en células del músculo liso de pacientes asmáticos y fibroblastos pulmonares. Un estudio reciente ha demostrado que PIK-75 (10nM) inhibe la expresión de mRNA de CD38 inducida por TNF- $\alpha$ , y atenúa significativamente la actividad ADP-ribosil ciclasa inducida por TNF- $\alpha$  en células de músculo liso de las vías respiratorias humanas.
  - **TGX-221** (Selleckchem, S1169). Es un inhibidor selectivo de la isoforma  $\beta$  de PI3K. Ha demostrado atenuar parcialmente la fosforilación de Ser 473 en los macrófagos J774.2. Además, se ha visto que TGX-221 es capaz de inhibir significativamente la activación de Akt inducida por TGF- $\beta$  y reducir, aunque en menor medida, la proliferación celular en fibroblastos de pulmón.
  - **AS-252424** (Selleckchem, S2671). Es un nuevo y potente inhibidor de PI3K $\gamma$ . Se ha demostrado que inhibe la quimiotaxis mediada por MCP-1 en monocitos primarios y en la línea celular monocítica THP-

1, además de, bloquear específicamente la proliferación en las líneas celulares de cáncer pancreático HPAF y Capan1.

- **CAL-101** (Selleckchem, S2226). Es un potente inhibidor selectivo de PI3K $\delta$ , además de, un fármaco esencial para la activación, proliferación y supervivencia de los linfocitos B, que muestra eficacia en el tratamiento de la leucemia linfática crónica, el linfoma no hodgkiniano y la leucemia linfoide aguda. Además, se ha demostrado que puede inhibir la producción de citoquinas inflamatorias, tales como IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , y citoquinas inducidas por activación, tales como CD40L.

En la siguiente tabla se recogen las dosis utilizadas de cada fármaco:

**Tabla 6. Dosis utilizadas de los fármacos en el modelo *in vitro* de la EPOC.**

<b>Compuesto</b>	<b>Concentración</b>
<b>RNO</b>	<b>0.01-1000nM (pasos de log10)</b>
<b>LY294002 (inhibidor pan-PI3K) *</b>	<b>1<math>\mu</math>M</b>
<b>Inhibidor PI3K<math>\alpha</math> (PIK-75) *</b>	<b>10nM, 30nM</b>
<b>Inhibidor PI3K<math>\beta</math> (TGX-221) *</b>	<b>10nM, 30nM</b>
<b>Inhibidor PI3K<math>\gamma</math> (AS-252424) *</b>	<b>100nM, 300nM</b>
<b>Inhibidor PI3K<math>\delta</math> (CAL-101) *</b>	<b>5nM, 50nM</b>
<b>RNO + CAL-101*</b>	<b>RNO (0.01-1000nM) + CAL-101 (5nM)</b>

\*Las dosis establecidas son valores próximos a la IC50. En caso de CAL-101, se seleccionó la dosis 5nM porque es la dosis establecida para realizar combinaciones.

Puesto que los efectos de la combinación de inhibidores de PDE4 y PI3K $\delta$  sobre la liberación de IL, enzimas digestivas y migración celular, ya ha sido estudiada en neutrófilos de donantes sanos, este estudio sólo se realizó en neutrófilos aislados a partir de sangre periférica de pacientes con EPOC severa de inicio temprano. Sin embargo, los efectos de la combinación de ambos fármacos sobre la liberación de ROS de neutrófilos de sanos no fumadores, fumadores y EPOC estable no se ha llevado a cabo. Este trabajo abordará este estudio.

Además, los efectos de los inhibidores selectivos de PI3K no han sido estudiados en pacientes sanos no fumadores y fumadores y, en pacientes EPOC estable, por lo que también fue objeto de estudio en esta tesis. De este modo se observó si pacientes EPOC severa de inicio temprano y estables y, donadores sanos fumadores y no fumadores presentan el mismo perfil farmacológico tras la administración de los inhibidores selectivos de subtipos de PI3K.

### **3.2.2. Pacientes**

El estudio fue diseñado para estudiar los efectos antiinflamatorios del inhibidor de PDE4, RNO, sobre los neutrófilos sobre-activados de pacientes EPOC severa de inicio temprano, cuyo fenotipo ya fue caracterizado por nuestro laboratorio [21]. Para cada estudio se evaluaron 5 pacientes con EPOC severa de inicio temprano, así como voluntarios no fumadores sanos, voluntarios fumadores sanos y pacientes EPOC estabilizados (n=3).

Los criterios de inclusión para los pacientes con EPOC fueron los siguientes: edad <56 años, ex fumadores con una historia de tabaquismo >30 paquetes/año, FEV1 <30% del valor teórico, FEV1/FVC <70%, pacientes de rápido declive caracterizados por un cambio en el FEV1 <-160  $\pm$  5 ml/año durante un período de 5 años), y sin pruebas de

deficiencia  $\alpha$ -1 antitripsina. Los pacientes EPOC severa de inicio temprano no presentaban exacerbaciones en el momento de la extracción de sangre. Además, ninguno de ellos mostraba evidencia clínica de infección viral o parasitaria, asma bronquial, rinitis alérgica, neumonía o cáncer de pulmón, así como otras comorbilidades como diabetes o enfermedades cardiovasculares. Ninguno era fumador actual, ni había recibido antibióticos, esteroides orales, teofilina o roflumilast en el último mes.

Los pacientes EPOC estabilizados no presentaban exacerbaciones en el momento de la extracción de sangre. Además, ninguno de ellos mostraba evidencia clínica de infección viral o parasitaria, asma bronquial, rinitis alérgica, neumonía o cáncer de pulmón, así como otras comorbilidades como diabetes o enfermedades cardiovasculares. Ninguno era fumador actual, ni había recibido antibióticos, esteroides orales, teofilina o roflumilast en el último mes.

Los sujetos sanos no fumadores presentaban una función pulmonar normal, nunca habían fumado y no tomaban medicación. Los sujetos sanos fumadores presentaban las mismas características clínicas excepto el no ser fumadores.

El protocolo de estudio se rige por la Declaración de Helsinki y fue aprobado por el comité local de investigación y ética independiente del Hospital General Universitario de Valencia, España. Se obtuvo el consentimiento escrito informado de cada participante antes del muestreo de sangre.

Las pruebas de función pulmonar se llevaron a cabo antes de la toma de muestras de sangre y los valores de FEV1 y FVC se utilizaron para clasificar la gravedad de la EPOC según la clasificación GOLD I-IV (2012).

### **3.2.3. Aislamiento y cultivo de neutrófilos humanos**

Los neutrófilos se aislaron de sangre venosa periférica mediante procedimientos estándar de laboratorio [104]. En resumen, la sangre venosa periférica se mezcló con dextrano 500 al 3% (en 0,9% de solución salina) en una proporción de 2:1. Esta mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 30min hasta que los eritrocitos sedimentaron. La fase superior se recogió y, cuidadosamente, depositó con Ficoll-Paque Histopaque 1077 (Amershan Pharmacia Biotech, Barcelona, España) en una proporción 1:1, evitando la mezcla de ambos componentes para no romper el gradiente de densidad. Las dos fases generadas se centrifugaron a 150G, 4°C durante 30min. Se eliminaron las células mononucleares de sangre periférica de la capa superior y de la intermedia y, el pellet obtenido (que contiene neutrófilos, una baja proporción de eritrocitos residuales y trazas de eosinófilos y basófilos) se resuspendió en un tampón de lisis de eritrocitos (Biolegend, Reino Unido) durante 30min en hielo. La suspensión de granulocitos se lavó dos veces con PBS. Las preparaciones tenían una pureza de neutrófilos superior al 97%, evaluada mediante tinción de Giemsa. El estudio de viabilidad celular fue superior al 99%, medido por exclusión de azul de tripano.

### **3.2.4. Condiciones experimentales**

Una vez aislados, los neutrófilos se cultivaron en placas de cultivo e incubados con los diferentes compuestos (o sus combinaciones) durante 30min. A continuación, se estimularon con fMLP (1 $\mu$ M) durante el tiempo requerido para cada procedimiento experimental. Las concentraciones utilizadas de los diferentes compuestos (RNO e inhibidores de subtipos de PI3K) se recogen en la Tabla 6, mencionada anteriormente.

En la siguiente figura se resume el protocolo experimental:

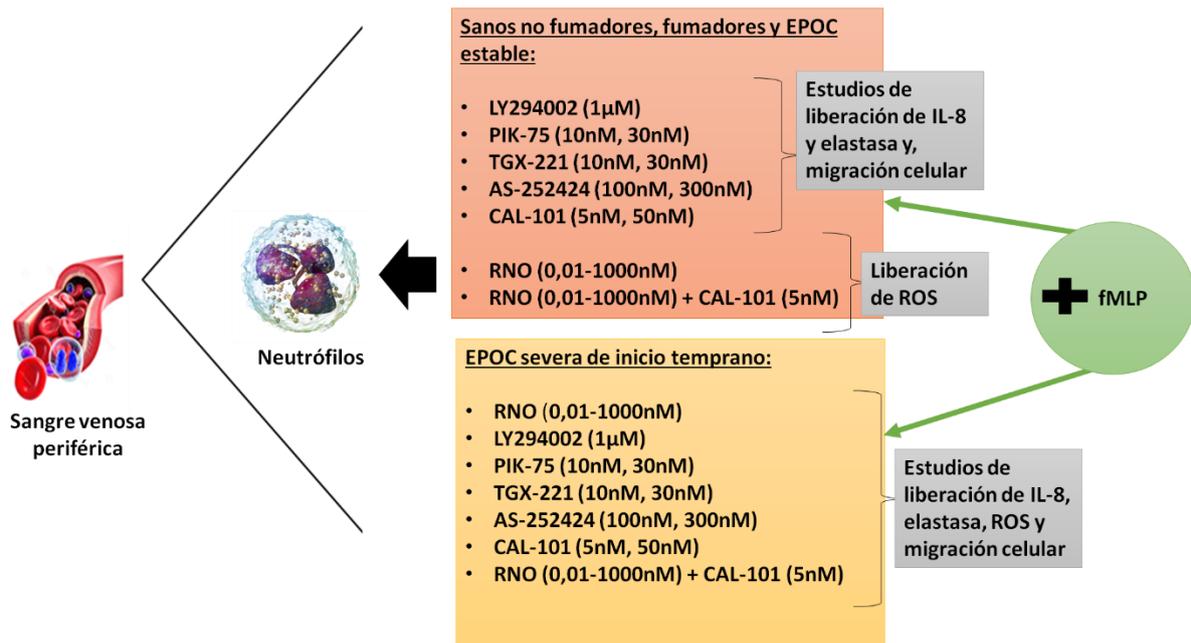


Figura 7. Protocolo experimental diseñado para el estudio de los inhibidores PDE4 y PI3K, y su combinación, en neutrófilos aislados de donadores sanos no fumadores y fumadores, pacientes con EPOC estable y, pacientes con EPOC severa de inicio temprano.

### 3.2.5. Ensayo de migración neutrofílica

La migración de neutrófilos se midió mediante el kit “Cytoselect TM 96 well cell migration assay (3µm, fluorometric)” (Cell Biolabs, CBA-104). En resumen, los neutrófilos ( $10^6$  células/ml) se sembraron en la placa superior (membrana) junto a los fármacos durante 30min. A continuación, se acopló la membrana a la placa inferior (placa de migración) prevista de los fármacos junto con el quimioatrayente, fMLP (Sigma, Reino Unido) a 1µM. Se dejaron incubar durante 30 minutos a 37°C. Tras la migración, las células se desprendieron con 150µl de solución de desprendimiento (provisto por el fabricante) y, simultáneamente, se lisaron y tiñeron con CyQuant R (interactuando con el DNA). El número de células migradas se cuantificó por medida de fluorescencia a 480nm.

### **3.2.6. Liberación de elastasa**

La liberación de elastasa por los neutrófilos se determinó por una técnica ELISA en sándwich comercial (HK319, HyCult Biotech) siguiendo las instrucciones del fabricante. Resumiendo, los neutrófilos ( $8 \times 10^5$  células/pocillo) fueron sembrados en placas de 24 pocillos y pre-incubados con los fármacos y sus dosis correspondientes durante 30min. Tras el tiempo de pre-incubación se estimularon con fMLP  $1 \mu\text{M}$  durante 30min. Se recogió el sobrenadante celular y se llevó a cabo la técnica ELISA, donde la elastasa liberada por los neutrófilos se capturó sobre una placa revestida por un anticuerpo primario y, posteriormente, se detectó por un segundo anticuerpo biotinilado que se unió a un conjugado de estreptavidina-peroxidasa. Tras añadir tetrametil benzidina (TMB) se produjo una reacción con la peroxidasa que se detuvo con ácido oxálico 1M. Una vez detenida la reacción se midió la absorbancia a 450nm.

### **3.2.7. Liberación de IL-8**

La IL-8 liberada por los neutrófilos se determinó mediante técnica ELISA comercial (Human CXCL8/IL8, RD Systems) siguiendo las instrucciones propuestas por el fabricante. En resumen, los neutrófilos ( $10^6$  células/pocillo) se incubaron en placas de 24 pocillos y pre-trataron durante 30min con los fármacos a sus dosis correspondientes. Se añadió fMLP  $1 \mu\text{M}$  y se dejó incubar durante 16 horas. El sobrenadante celular se recogió y se midió la IL-8 mediante el kit de ELISA. La placa ELISA se revistió previamente con un anticuerpo primario y se dejó incubar durante toda la noche. Tras ello, se aplicó un tampón bloqueante. Finalmente, y con sus correspondientes tiempos de espera, se añadieron las muestras, anticuerpo secundario biotinilado, el conjugado de estreptavidina-peroxidasa y, por último, TMB para producir

la reacción. Se detuvo con ácido sulfúrico 1M y se midió la absorbancia mediante espectrofotometría a 450nm.

### **3.2.8. Generación de aniones superóxidos**

La liberación de aniones superóxido se determinó mediante el kit comercial de ensayo de aniones superóxido (CS1000, Sigma), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los neutrófilos aislados se sembraron en placas de 96 pocillos y se pre-trataron con los fármacos y sus dosis correspondientes durante 30min. Tras el periodo de incubación, se añadieron los reactivos de detección de aniones superóxidos provistos por el kit (enhancer y luminol) junto a fMLP a 1 $\mu$ M. Finalmente, se realizaron medidas de quimioluminiscencia cada 5min (durante 60min) por espectrofotometría.

### **3.2.9. Análisis de datos**

Los datos se presentan como media  $\pm$  error estándar de la media (SEM) de al menos 5 experimentos independientes, con cada condición por triplicado. El análisis estadístico de los resultados se llevó a cabo mediante el análisis de varianza (ANOVA) seguido de la prueba de Bonferroni, mediante la prueba t de Student, o por pruebas no paramétricas apropiadas (GraphPad Software Inc, San Diego, CA, EE.UU.). Los resultados se tomaron como significativos cuando  $P < 0,05$ .

### **3.2.10. Aspectos éticos**

Los experimentos diseñados en este protocolo implican el uso de células humanas obtenidas a partir de muestras humanas. El consentimiento escrito informado se obtuvo de cada participante antes del muestreo de sangre. Este protocolo fue presentado para su aprobación por el Comité Ético de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universitat de València (España) asegurando que el estudio cumple los reglamentos

establecidos por la Unión Europea, el Gobierno central de España y el autonómico de la Comunitat Valenciana.

## **4. RESULTADOS**

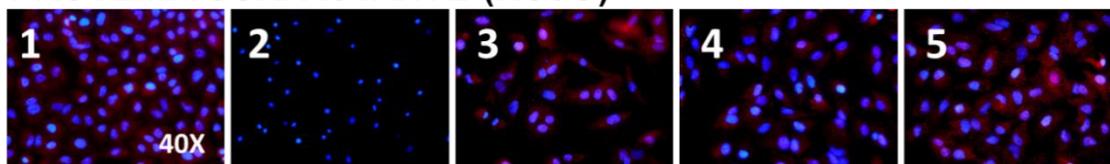


#### 4.1. Efectos de los inhibidores de PDE4 y PDE5, y su combinación, sobre la expresión de marcadores del proceso TEM en células epitelial-alveolares tipo II.

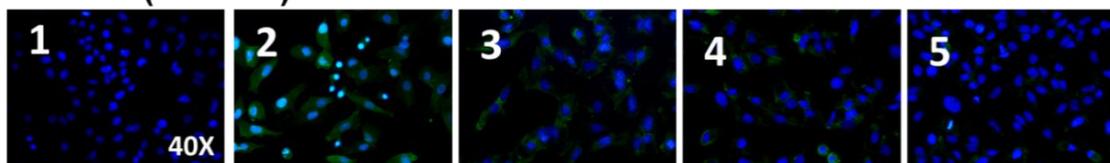
En primer lugar, se realizó una comprobación de la pureza celular de las CEAII mediante inmunofluorescencia. Para ello se realizaron dos técnicas de inmunofluorescencia para la detección de la proteína surfactante C y  $\alpha$ -SMA (Figura 8). Además, se realizó un estudio de los efectos de RNO (2nM), sildenafilo (10nM) y su combinación sobre la expresión de ambas proteínas.

Se observó que, las células sin tratar (Figura 8.1) mostraban una sobreexpresión de proteína surfactante C, característica de CEAII, mientras que  $\alpha$ -SMA se encontraba casi ausente. Tras la estimulación con TGF- $\beta$ 1 10ng/ml (Figura 8.2), se perdió la expresión de proteína surfactante C, mientras que,  $\alpha$ -SMA se sobre-expresaba. RNO (Figura 8.3) y sildenafilo (Figura 8.4) a dosis de 2nM y 10nM, respectivamente, disminuían la sobreexpresión de  $\alpha$ -SMA y aumentaban la expresión de la proteína surfactante C. La combinación de ambos (Figura 8.5) consiguió obtener una expresión de ambas proteínas similar a la del control.

##### PROTEINA SURFACTANTE (ROJO)



##### $\alpha$ -SMA (VERDE)



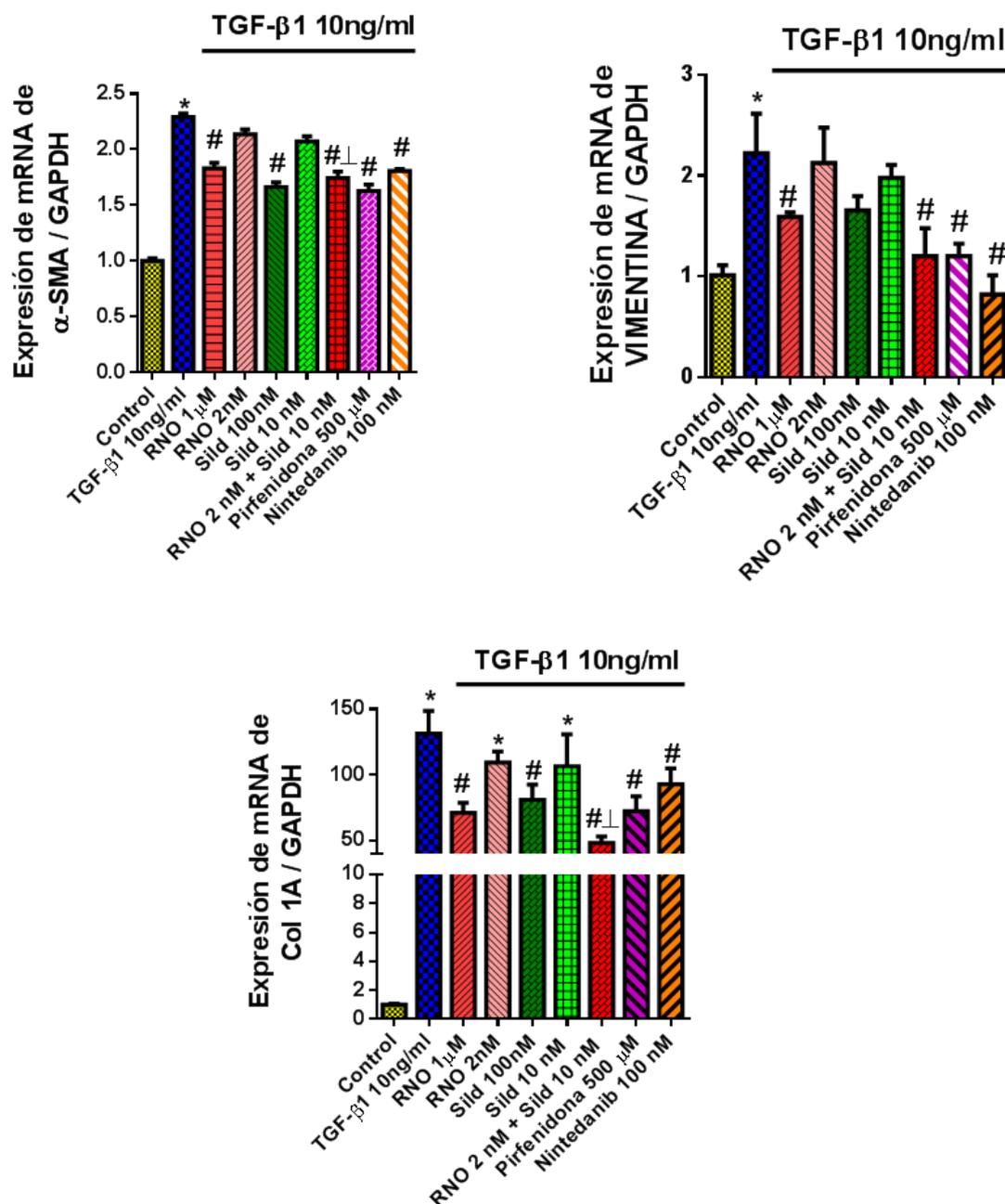
**Figura 8. Comprobación de la pureza de las CEAII y efectos de la combinación de inhibidores de PDE4 y PDE5 sobre la expresión de la proteína surfactante C y  $\alpha$ -SMA.** Las CEAII fueron estimuladas con TGF- $\beta$ 1 10ng/ml durante 48h. Previamente, se administraron RNO (2nM), sildenafilo (10nM) y RNO (2nM) + sildenafilo (10nM) durante 30min. Se evaluó la cualificación relativa mediante inmunofluorescencia. Las imágenes se corresponden con: 1. Control; 2. TGF- $\beta$ 1 10ng/ml; 3. TGF- $\beta$ 1 10ng/ml + RNO 2nM; 4. TGF- $\beta$ -1 10ng/ml + sildenafilo 10nM; 5. TGF- $\beta$ 1 10ng/ml + RNO 2nM + sildenafilo 10nM. Se muestran los valores obtenidos a partir de

una n=3. La estadística se basa en: \*p<0.05 vs. control; #p<0.05 vs. TGF- $\beta$ 1;  $\pm$ p<0.05 vs. Monoterapia. El final de la escala es de 400x.

A continuación, se estudió la expresión de los marcadores TEM inducidos por TGF- $\beta$ 1 en CEaII. Tras la estimulación con TGF- $\beta$ 1 10ng/ml durante 48h, se estudió la expresión genética de marcadores mesenquimales ( $\alpha$ -SMA, vimentina y colágeno tipo I) y epiteliales (E-cadherina, KRT-18 y ZO-1). Además, se evaluó la expresión genética de TGF- $\beta$ 1 y PDE5A, ambos implicados en el proceso TEM.

La administración de TGF- $\beta$ 1 aumentó significativamente la expresión genética de los marcadores mesenquimales (Figura 9) y de TGF- $\beta$ 1 y PDE5A (Figura 11), mientras que, consecuentemente, disminuyó significativamente la expresión de los marcadores epiteliales estudiados (Figura 10).

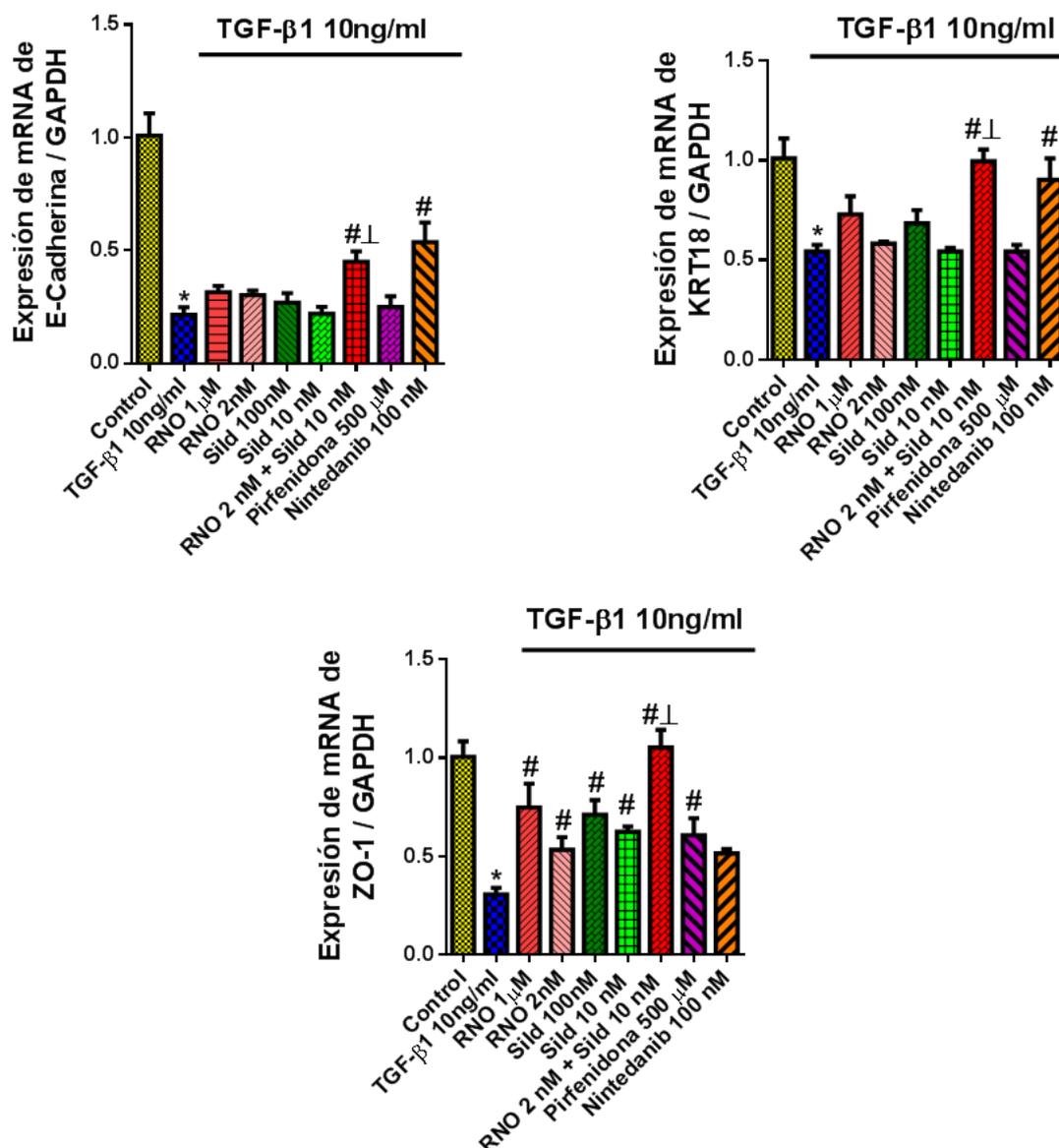
La administración de los fármacos RNO (1 $\mu$ M), sildenafilo (100nM), pirfenidona y nintedanib, lograron disminuir significativamente la sobreexpresión de  $\alpha$ -SMA, vimentina y colágeno tipo 1 (Figura 9). Sin embargo, RNO (2nM) y sildenafilo (10nM) no mostraron diferencias significativas. Por el contrario, la combinación de ambos logró disminuir de forma significativa la sobreexpresión de estos marcadores mesenquimales. Además, se mostraron efectos aditivos de la combinación *vs* a la monoterapia.



**Figura 9. Efectos de la combinación de inhibidores PDE4 y PDE5 sobre la expresión de marcadores mesenquimales tras la estimulación del proceso TEM en CEAIL.** Las células fueron estimuladas con TGF-β1 10ng/ml durante 48h. Previamente se administraron RNO (1μM;2nM), sildenafil (Sild) (100nM; 10nM), RNO (2nM) + sildenafil (10nM) y, pirfenidona (500μM) y nintedanib (100nM), como controles, durante 30min. A continuación, se aisló el RNA y se realizó una RT-PCR de los marcadores mesenquimales α-SMA, vimentina y colágeno tipo 1 (Col 1A). Se evaluó la cuantificación relativa mediante el método 2-ΔΔCt. Los resultados son la media ± SD de tres experimentos independientes (n=3). La estadística se basa en: \*p<0.05 vs. control; #p<0.05 vs. TGF-β1; ±p<0.05 vs. Monoterapia.

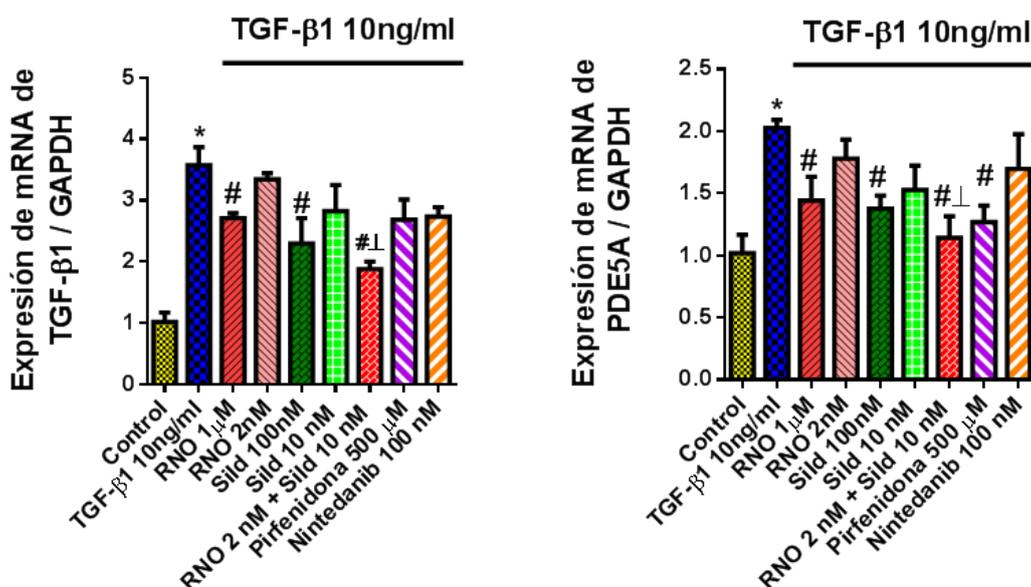
En cuanto al estudio de los marcadores epiteliales, se observó que, sobre la expresión de E-Cadherina y KRT18, solo la combinación de RNO (2nM) y sildenafil

(10nM) y, nintedanib, lograban aumentar sus niveles significativamente (Figura 10). Por el contrario, todos los fármacos, excepto nintedanib, conseguían revertir el efecto de TGF- $\beta$ 1 sobre la expresión de ZO-1. Además, la combinación de RNO (2nM) y sildenafilo (10nM) también demostró efectos aditivos vs la monoterapia.



**Figura 10.** Efectos de la combinación de inhibidores PDE4 y PDE5 sobre la expresión de marcadores epiteliales tras la estimulación del proceso TEM en CEAII. Las células fueron estimuladas con TGF- $\beta$ 1 10ng/ml durante 48h. Previamente se administraron RNO (1 $\mu$ M;2nM), sildenafilo (Sild) (100nM; 10nM), RNO (2nM) + sildenafilo (10nM) y, pirfenidona (500 $\mu$ M) y nintedanib (100nM), como controles, durante 30min. A continuación, se aisló el RNA y se realizó una RT-PCR de los marcadores epiteliales E-cadherina, KRT18 y ZO-1. Se evaluó la cuantificación relativa mediante el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Los resultados son la media  $\pm$  SD de tres experimentos independientes (n=3). La estadística se basa en: \*p<0.05 vs. control; #p<0.05 vs. TGF- $\beta$ 1; #|p<0.05 vs. Monoterapia.

La expresión de TGF- $\beta$ 1 y PDE5A disminuyó significativamente tras la administración de RNO (1 $\mu$ M), sildenafil (100nM) y la combinación de RNO (2nM) y sildenafil (10nM). Además, la combinación de RNO y sildenafil presentó efectos aditivos vs la monoterapia (Figura 11).

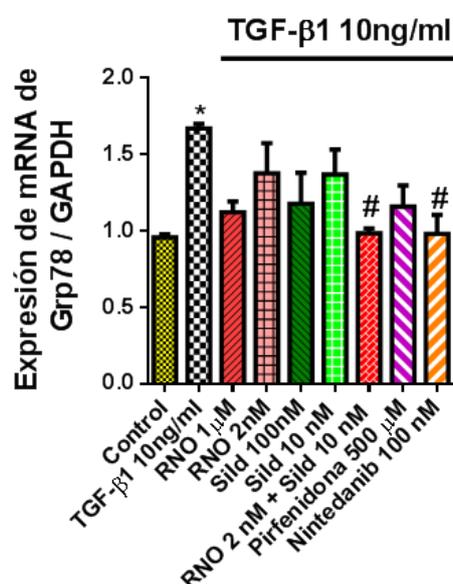


**Figura 11. Efectos de la combinación de inhibidores PDE4 y PDE5 sobre la expresión de TGF- $\beta$ 1 y PDE5A tras la estimulación del proceso TEM en CEAIL.** Las células fueron estimuladas con TGF- $\beta$ 1 10ng/ml durante 48h. Previamente se administraron RNO (1 $\mu$ M;2nM), sildenafil (Sild) (100nM; 10nM), RNO (2nM) + sildenafil (10nM) y, pirfenidona (500 $\mu$ M) y nintedanib (100nM), como controles, durante 30min. A continuación, se aisló el RNA y se realizó una RT-PCR de TGF- $\beta$ 1 y PDE5A. Se evaluó la cuantificación relativa mediante el método 2- $\Delta\Delta$ Ct. Los resultados son la media  $\pm$  SD de tres experimentos independientes (n=3). La estadística se basa en: \*p<0.05 vs. control; #p<0.05 vs. TGF- $\beta$ 1; -p<0.05 vs. Monoterapia.

#### 4.2. Estudio de los efectos de inhibidores PDE4 y PDE5, y su combinación, sobre el estrés del RE/UPR en células epitelial-alveolares tipo II.

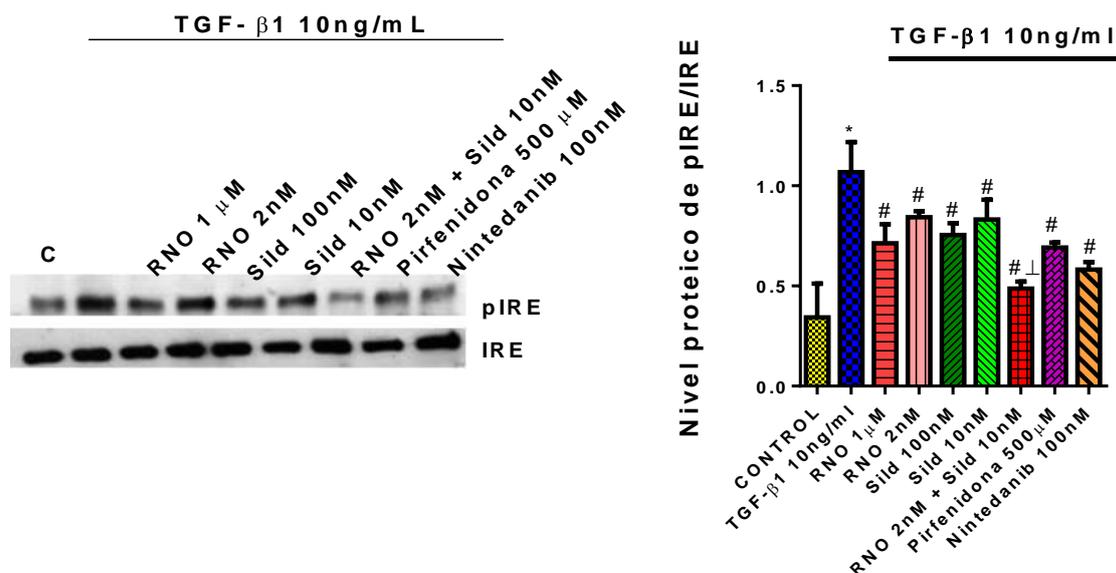
Se estudió la expresión de los marcadores de estrés del RE y la UPR en CEAIL. Tras la estimulación con TGF- $\beta$ 1 (10ng/ml), se llevó a cabo el análisis genético de Grp78 (Figura 12), la expresión mediante inmunofluorescencia y western blot de IRE / pIRE (Figura 13 y 14) y, la expresión ERK / pERK por western blot (Figura 15).

Grp78 incrementó su expresión tras ser estimuladas con TGF- $\beta$ 1. Los compuestos de ensayo, en monoterapia, no lograron disminuir significativamente su expresión. Sin embargo, la combinación de RNO (2nM) y sildenafil (10nM), mostró una disminución significativa y aditiva de los niveles de Grp78, inducidos por TGF- $\beta$ 1. Además, los efectos observados de la combinación fueron los mismos que se obtuvieron de nintedanib (Figura 12).



**Figura 12. Efectos de la combinación de inhibidores de PDE4 y PDE5 sobre el estrés del RE inducido por TGF- $\beta$ 1 en AECIL.** Se estimularon las células con TGF- $\beta$ 1 10ng/ml durante 48h. Previamente, se administró RNO (1 $\mu$ M;2nM), sildenafil (Sild) (100nM; 10nM), RNO (2nM) + sildenafil (10nM) y, pirfenidona (500 $\mu$ M) y nintedanib (100nM), como controles, durante 30min. A continuación, se aisló el RNA y se realizó una RT-PCR de Grp78. Se evaluó la cuantificación relativa mediante el método 2- $\Delta\Delta$ Ct. Los resultados son la media  $\pm$  SD de tres experimentos independientes (n=3). La estadística se basa en: \*p<0.05 vs. control; #p<0.05 vs. TGF $\beta$ 1;  $\pm$ p<0.05 vs. Monoterapia.

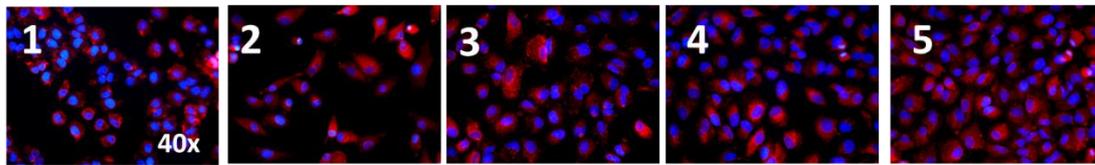
La expresión proteica de la forma no fosforilada de IRE, demostró una expresión constante en todas las condiciones estudiadas. Por el contrario, tras la administración de TGF- $\beta$ 1 (10ng/ml), pIRE aumentó su expresión. Todos los fármacos disminuyeron significativamente la expresión de pIRE y, la combinación de RNO (2nM) y sildenafil (5nM), demostró efectos aditivos vs la monoterapia (Figura 13).



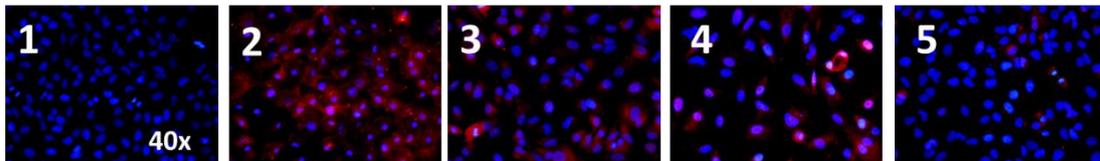
**Figura 13.** Efectos de la combinación de RNO y sildenafil sobre la expresión proteica de señaladores UPR (IRE y pIRE) en CEAIL. Se administró RNO (1μM;2nM), sildenafil (Sild) (100nM; 10nM), RNO (2nM) + sildenafil (10nM) y, pirfenidona (500μM) y nintedanib (100nM), como controles, durante 30min. A continuación, se estimularon las células con TGF-β1 10ng/ml durante 48h, con el objetivo de inducir el proceso MET. Se evaluó la cualificación relativa mediante la técnica western blot. Los resultados son la media ± SD de tres experimentos independientes (n=3). La estadística se basa en: \*p<0.05 vs. control; #p<0.05 vs. TGFβ1; †p<0.05 vs. Monoterapia.

El estudio de inmunofluorescencia demostró los mismos efectos (Figura 14). La forma no fosforilada de IRE mantuvo una expresión constante en todas las condiciones, mientras que, pIRE aumentó su expresión tras la administración de TGF-β1 (Figura 14.2) y los fármacos revirtieron el efecto, siendo la combinación (Figura 14.5), la condición que más se aproximó a valores control.

### Expresión de IRE (Rojo)



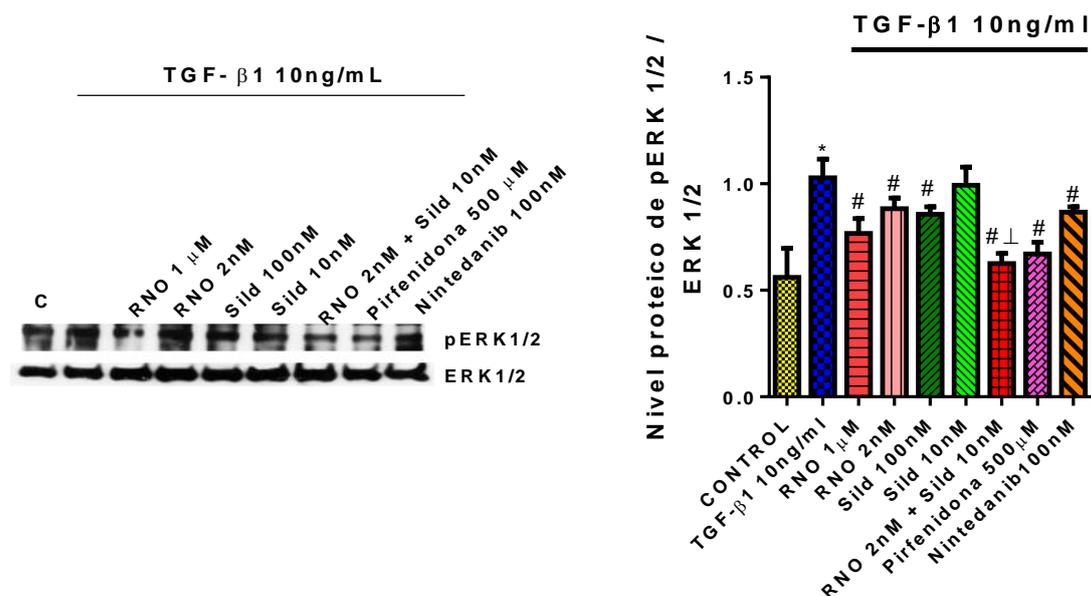
### Expresión de pIRE (Rojo)



**Figura 14. Efectos de la combinación de RNO y sildenafil sobre la expresión de señalizadores UPR (IRE y pIRE) en CEAI.** Las CEAI fueron estimuladas con TGF- $\beta$ 1 10ng/ml durante 48h. Previamente, se administraron RNO (2nM), sildenafil (10nM) y RNO (2nM) + sildenafil (10nM) durante 30min. Se evaluó la cualificación relativa mediante inmunofluorescencia. Las imágenes se corresponden con: 1. Control; 2.TGF- $\beta$ 1 10ng/ml; 3. TGF- $\beta$ 1 10ng/ml + RNO 2nM; 4. TGF- $\beta$ 1 10ng/ml + sildenafil 10nM; 5. TGF $\beta$ -1 10ng/ml + RNO 2nM + sildenafil 10nM. Se muestran los valores obtenidos a partir de una n=3. La estadística se basa en: \*p<0.05 vs. control; #p<0.05 vs. TGF- $\beta$ 1;  $\pm$ p<0.05 vs. Monoterapia. El final de la escala es de 400x.

En cuanto a la expresión de pERK1/2, se observó que, tras la estimulación de las CEAI con TGF- $\beta$ 1 (10ng/ml), pERK1/2 aumentó su expresión. Por el contrario, la forma no fosforilada, ERK1/2, mantuvo una expresión constante en todas las condiciones.

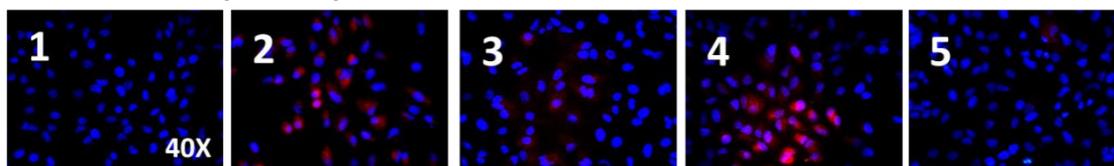
Todos los fármacos, excepto sildenafil (10nM), lograron disminuir significativamente la expresión pERK1/2 inducida por TGF- $\beta$ 1. Además, la combinación de RNO (2nM) y sildenafil (10nM) presentó efectos aditivos vs monoterapia (Figura 15).



**Figura 15. Efectos de la combinación de RNO y sildenafil sobre la expresión proteica de ERK1/2 / pERK1/2 implicadas en la UPR de CEAI.** Se administró RNO (1μM;2nM), sildenafil (Sild) (100nM; 10nM), RNO (2nM) + sildenafil (10nM) y, pirfenidona (500μM) y nintedanib (100nM), como controles, durante 30min. A continuación, se estimularon las células con TGF-β1 10ng/ml durante 48h, con el objetivo de inducir el proceso MET. Se evaluó la cualificación relativa mediante la técnica western blot de la proteína fosforilada de ERK1/2. Los resultados son la media ± SD de tres experimentos independientes (n=3). La estadística se basa en: \*p<0.05 vs. control; #p<0.05 vs. TGFβ1; †p<0.05 vs. Monoterapia.

#### 4.3. Efectos de los inhibidores PDE4 y PDE5, y su combinación, sobre la viabilidad celular en células epitelial-alveolares tipo II.

Se estudió el efecto del TGF-β1 y la combinación de los inhibidores de PDE4 y PDE5 sobre la viabilidad celular de las CEAI (Figura 16). Se observó que las CEAI en condiciones normales (Figura 16.1) no expresaba anexina, utilizada como control de apoptosis. Por el contrario, tras la administración de TGF-β1 (Figura 16.2), las células expresaban anexina. La monoterapia de RNO (Figura 16.3) y sildenafil (Figura 16.4) a dosis 2nM y 10nM respectivamente, expresaban, aunque en menor medida, anexina. Sin embargo, la combinación de RNO (2nM) y sildenafil (10nM) (Figura 16.5) disminuyó la expresión de anexina hasta alcanzar valores control.

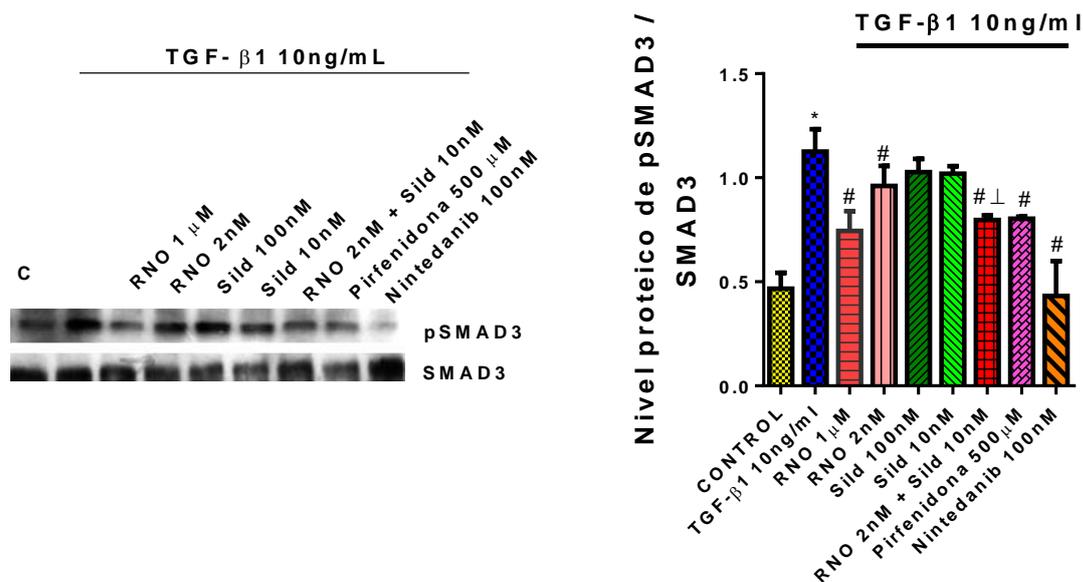
**ANEXINA V (ROJO)**

**Figura 16. Efectos de la combinación de RNO y sildenafil sobre la viabilidad celular de CEAI tras el proceso TEM.** Las CEAI fueron estimuladas con TGF- $\beta$ 1 10ng/ml durante 48h. Previamente, se administraron RNO (2nM), sildenafil (10nM) y RNO (2nM) + sildenafil (10nM) durante 30min. Se evaluó la cualificación relativa mediante inmunofluorescencia. Las imágenes se corresponden con: 1. Control; 2. TGF- $\beta$ 1 10ng/ml; 3. TGF- $\beta$ 1 10ng/ml + RNO 2nM; 4. TGF- $\beta$ 1 10ng/ml + sildenafil 10nM; 5. TGF- $\beta$ 1 10ng/ml + RNO 2nM + sildenafil 10nM. Se muestran los valores obtenidos a partir de una n=3. La estadística se basa en: \*p<0.05 vs. control; #p<0.05 vs. TGF- $\beta$ 1; +p<0.05 vs. Monoterapia. El final de la escala es de 400x.

#### **4.4. Estudio de los efectos de los inhibidores PDE4 y PDE5, y su combinación, sobre la expresión de SMAD3 en células epitelial-alveolares tipo II.**

Se llevó a cabo el estudio de una de las principales proteínas implicadas en el proceso TEM de FPI, SMAD3. Para ello, se realizaron 2 western blot correspondientes a SMAD3 y pSMAD3 (Figura 17).

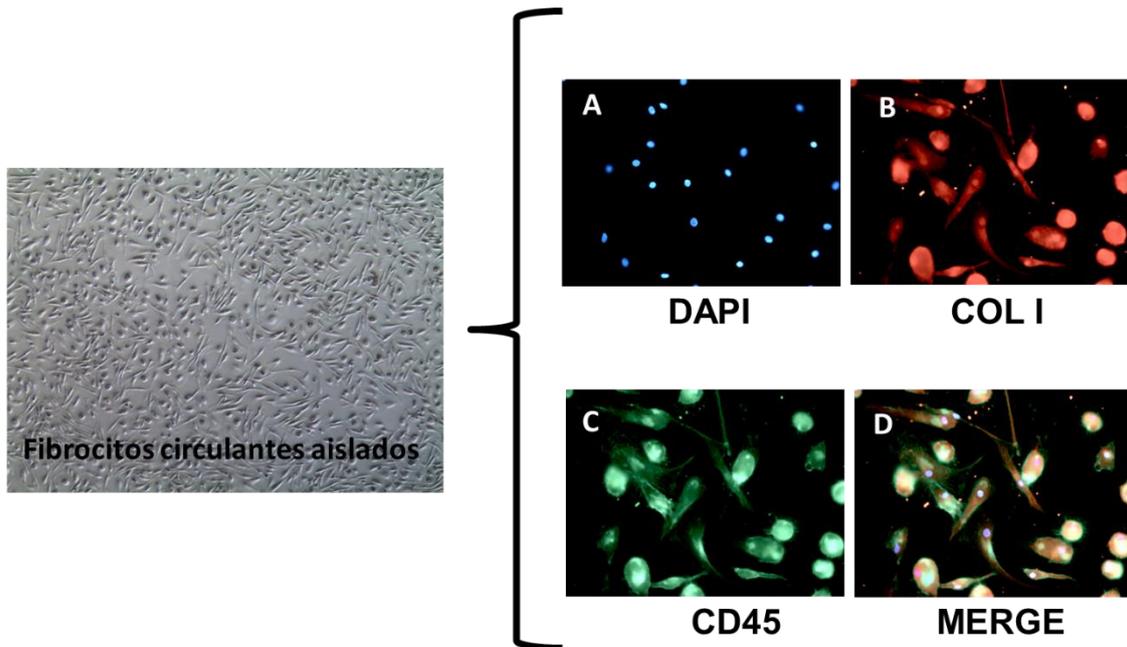
Tras la estimulación de las CEAI con TGF- $\beta$ 1 (10ng/ml), pSMAD3 aumentó su expresión, mientras que la forma no fosforilada, SMAD3, mantuvo una expresión constante en todas las condiciones. Todos los fármacos, excepto sildenafil (10nM), lograron disminuir significativamente la expresión pSMAD3 inducida por TGF- $\beta$ 1. Además, la combinación de RNO (2nM) y sildenafil (10nM) presentó efectos aditivos vs monoterapia.



**Figura 17. Efectos de la combinación de RNO y sildenafil sobre la expresión proteica de SMAD3 implicada en el proceso FPI de CEAIL.** Se administró RNO (1μM;2nM), sildenafil (Sild) (100nM; 10nM), RNO (2nM) + sildenafil (10nM) y, pirfenidona (500μM) y nintedanib (100nM), como controles, durante 30min. A continuación, se estimularon las células con TGF-β1 10ng/ml durante 48h, con el objetivo de inducir el proceso MET. Se evaluó la cualificación relativa mediante la técnica western blot de la proteína fosforilada de SMAD3. Los resultados son la media ± SD de tres experimentos independientes (n=3). La estadística se basa en: \*p<0.05 vs. control; #p<0.05 vs. TGFβ1; †p<0.05 vs. Monoterapia.

#### 4.5. Estudio del efecto de los inhibidores de PDE4 y PDE5, y su combinación, sobre la diferenciación de fibrocitos a miofibroblastos.

Tras el aislamiento de fibrocitos, se realizó un estudio de pureza celular por inmunofluorescencia con marcadores característicos de este tipo celular, colágeno I (COL I) y CD45 (Figura 18). Se observó que las células expresaban ambos marcadores.

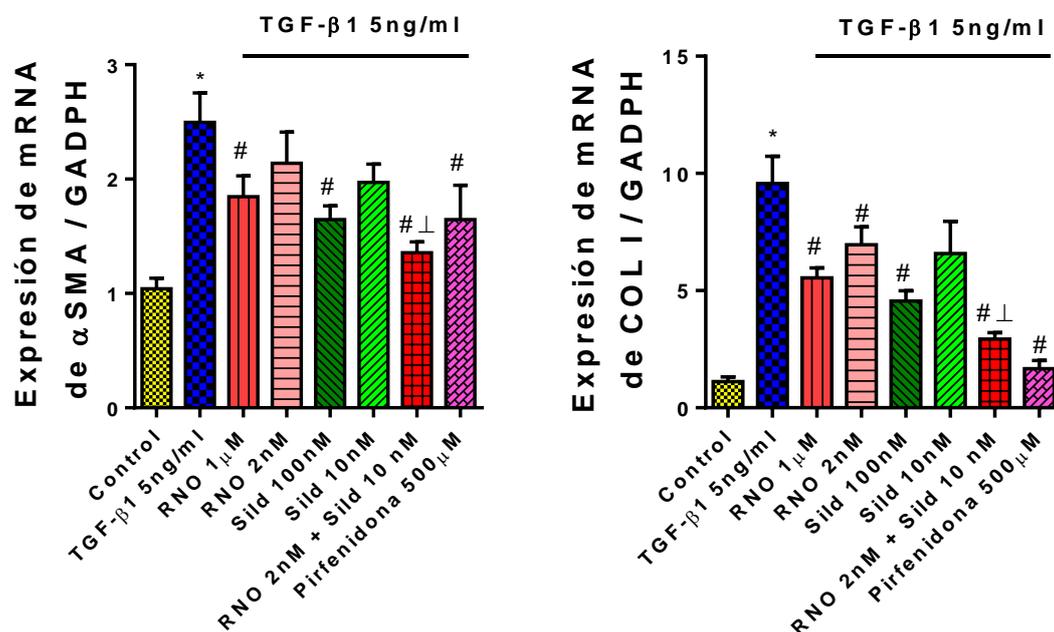


**Figura 18. Estudio de la pureza celular tras el aislamiento de fibroblastos desde sangre periférica venosa.** Se realizó la técnica de inmunofluorescencia de los marcadores colágeno tipo 1 (COL I) y CD45, característicos de este tipo celular. Los colores de la imagen representan: (A) tinción DAPI del núcleo; (B) ensayo de inmunofluorescencia para colágeno tipo I; (C) ensayo de inmunofluorescencia para CD45; (D) superposición.

Una vez ya aislados y diferenciados a fibroblastos, se llevó a cabo el análisis genético y proteico de los marcadores mesenquimales  $\alpha$ -SMA y colágeno tipo 1 (Figuras 19 y 20).

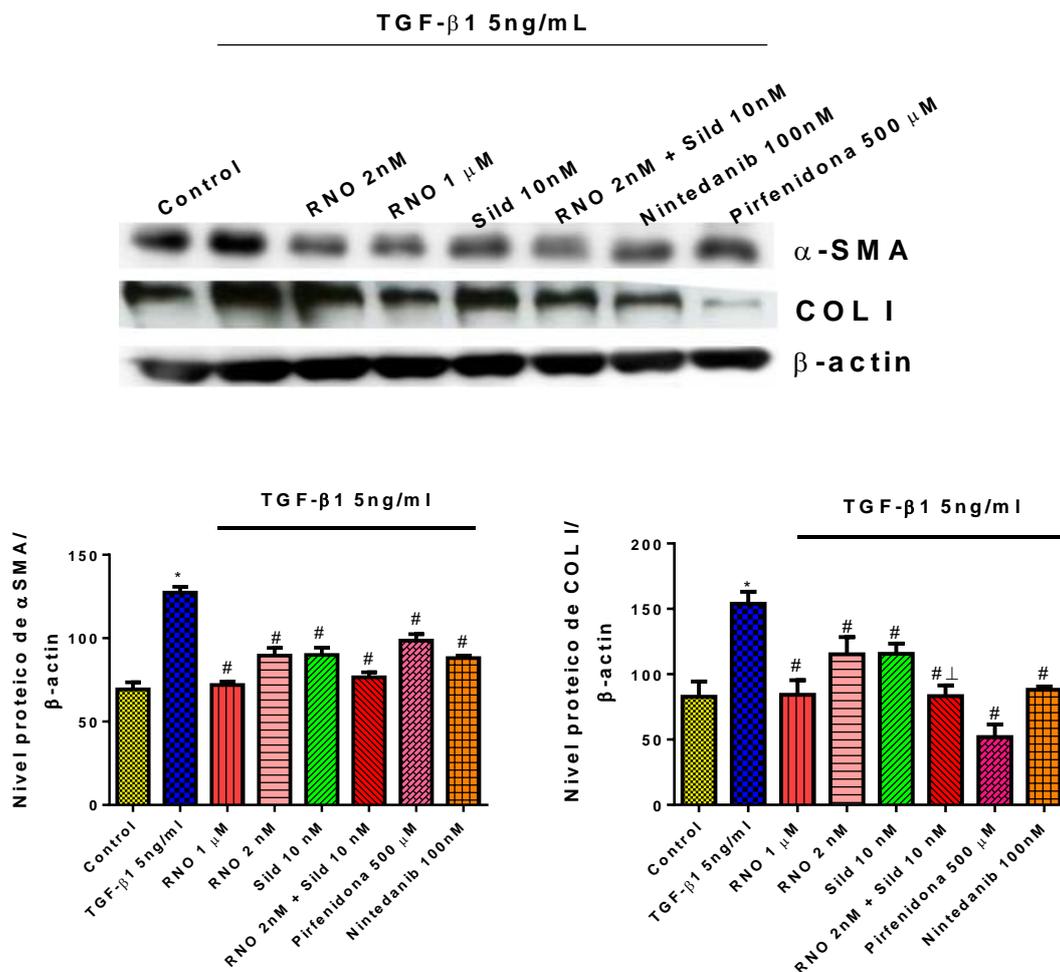
Tanto en el estudio genético como proteico de  $\alpha$ -SMA y colágeno tipo 1, se observó un aumento significativo cuando los fibroblastos eran estimulados con TGF- $\beta$ 1 5ng/ml.

Genéticamente se observó que, RNO (1 $\mu$ M), sildenafil (100nM), la combinación de RNO (2nM) y sildenafil (10nM) y la pirfenidona disminuyeron significativamente la sobreexpresión de  $\alpha$ -SMA inducida por TGF- $\beta$ 1 (10ng/ml) (Figura 19). Sin embargo, todos los fármacos, excepto sildenafil (10nM), disminuyeron significativamente la sobreexpresión de colágeno tipo 1. En ambos casos, la combinación de RNO y sildenafil mostró efectos aditivos vs la monoterapia.



**Figura 19.** Efectos de la combinación de RNO y sildenafil sobre la expresión proteica de los marcadores mesenquimales  $\alpha$ -SMA y colágeno tipo 1 (COL I) en fibroцитos diferenciados a miofibroblastos. Se estimularon las células con TGF- $\beta$ 1 5ng/ml durante 72h. Previamente, se administró RNO (1 $\mu$ M;2nM), sildenafil (Sild) (100nM; 10nM), RNO (2nM) + Sildenafil (10nM) y pirfenidona (500 $\mu$ M) como control, durante 30min. A continuación, se aisló el RNA y se realizó una RT-PCR ambos marcadores. Se evaluó la cuantificación relativa mediante el método 2- $\Delta\Delta$ Ct. Los resultados son la media  $\pm$  SD de tres experimentos independientes (n=3). La estadística se basa en: \*p<0.05 vs. control; #p<0.05 vs. TGF- $\beta$ 1;  $\perp$ p<0.05 vs. Monoterapia.

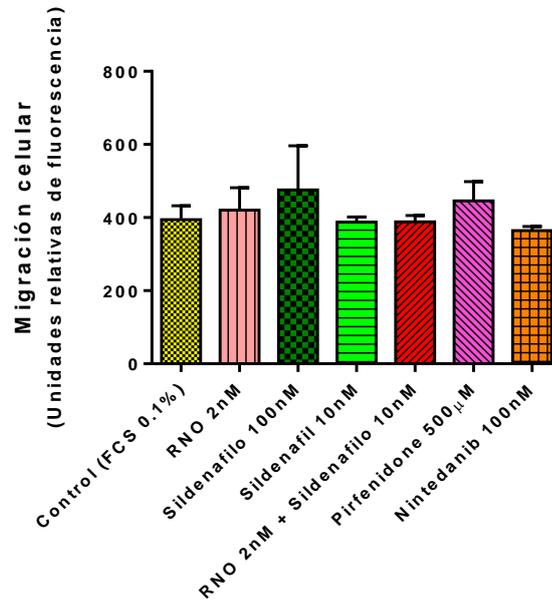
La expresión proteica de  $\alpha$ -SMA y colágeno tipo 1 mostró los mismos efectos que en se observaron en la expresión genética, excepto que, en ambos casos, todos los fármacos lograron disminuir significativamente su expresión y, la combinación, no mostró efectos aditivos vs la monoterapia en la expresión de  $\alpha$ -SMA (Figura 20).



**Figura 20.** Efectos de la combinación de RNO y sildenafil sobre la expresión proteica de los marcadores mesenquimales  $\alpha$ -SMA y colágeno tipo 1 (COL1). Se administró RNO (1 $\mu$ M;2nM), sildenafil (Sild) (10nM), RNO (2nM) + Sildenafil (10nM) y, pirfenidona (500 $\mu$ M) y nintedanib (100nM), como controles, durante 30min. A continuación, se estimularon las células con TGF- $\beta$ 1 10ng/ml durante 48h, con el objetivo de inducir el proceso MET. Se evaluó la cualificación relativa mediante la técnica western blot de ambas proteínas utilizando como control endógeno  $\beta$ -actina. Los resultados son la media  $\pm$  SD de tres experimentos independientes (n=3). La estadística se basa en: \*p<0.05 vs. control; #p<0.05 vs. TGF- $\beta$ 1;  $\pm$ p<0.05 vs. Monoterapia.

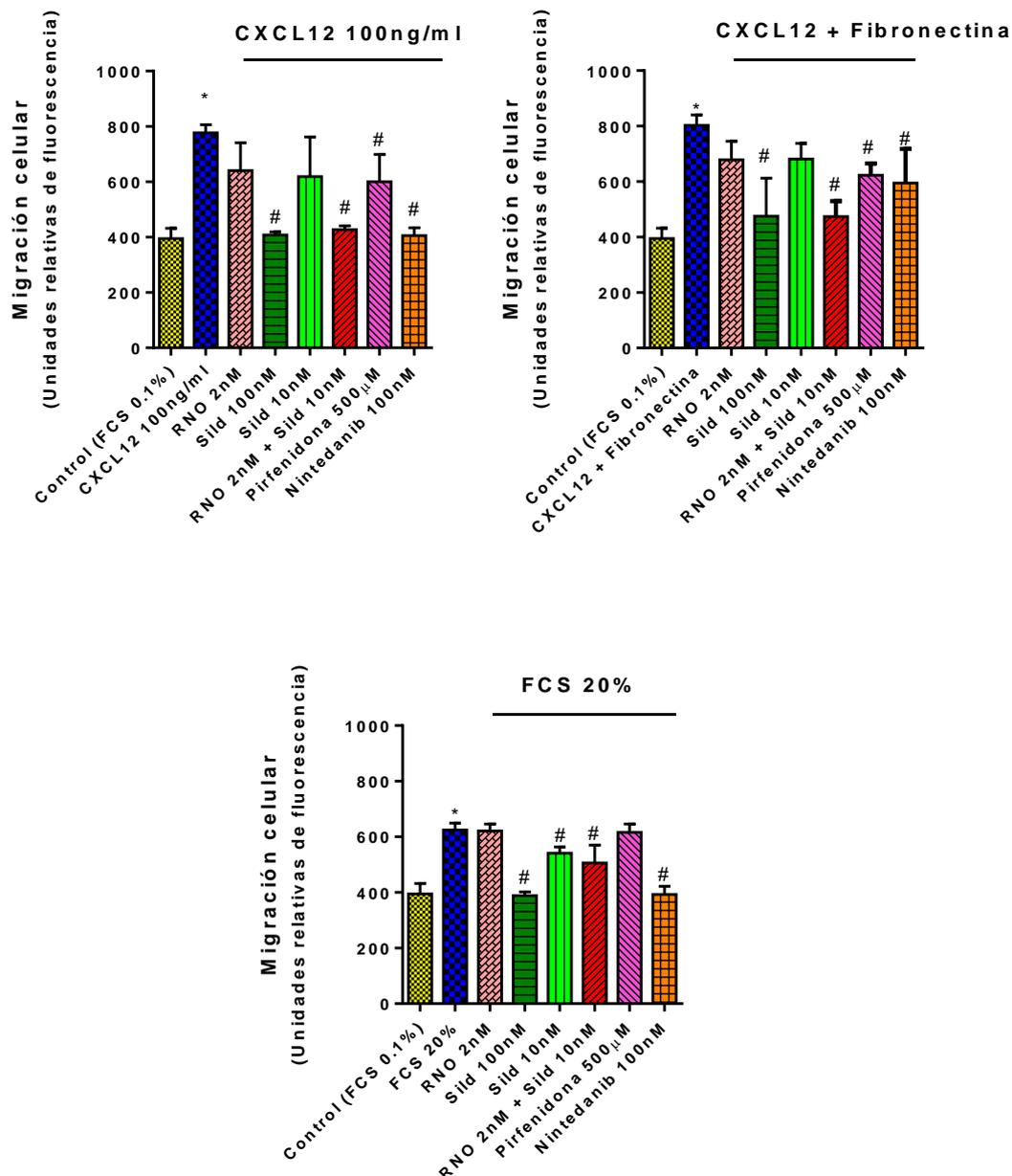
#### 4.6. Estudio del efecto de inhibidores PDE4 y PDE5, y su combinación, sobre la migración celular de fibrocitos circulantes.

En primer lugar, se llevó a cabo un estudio preliminar de los efectos *per se* de los fármacos en la migración celular (Figura 21) y se observó que, tras el tratamiento con los fármacos, no se observaron efectos migratorios significativos. De este modo se descartó la posibilidad de que los fármacos presentaran una propiedad migratoria.



**Figura 21. Estudio del efecto *per se* de los fármacos sobre la migración de fibrocitos circulantes.** Los fibrocitos fueron aislados a partir de sangre periférica de donadores sanos y tratadas con RNO (2nM), sildenafilo (10nM; 100nM), la combinación de RNO (2nM) y sildenafilo (10nM) y, pirfenidona (500 $\mu$ M) y nintedanib (100nM) como compuestos control, durante 30min. A continuación, se dejaron migrar durante 6h. Los resultados muestran la media  $\pm$ SEM de tres experimentos independientes con triplicados.

Seguidamente, se realizó el estudio de migración añadiendo a las células los estímulos migratorios CXCL12 100ng/ml, CXCL12 + Fibronectina y FCS 20% (Figura 22). En los tres ensayos experimentales se observó que los fibrocitos aumentaban significativamente la migración hacia la placa migratoria, donde se encontraban los estímulos migratorios. En los tres casos se observó que la administración de RNO (1 $\mu$ M), sildenafilo (100nM) y la combinación de RNO (2nM) y sildenafilo (10nM) consiguió reducir significativamente la migración celular, mientras que, en monoterapia, RNO (2nM) y sildenafilo (10nM) no mostraban diferencias significativas *vs* al estímulo migratorio (CXCL12 100ng/ml, CXCL12 + Fibronectina, FCS20%). Además, la combinación de RNO (2nM) y sildenafilo (10nM) mostraron mayor eficacia inhibitoria de la migración que la pirfenidona.



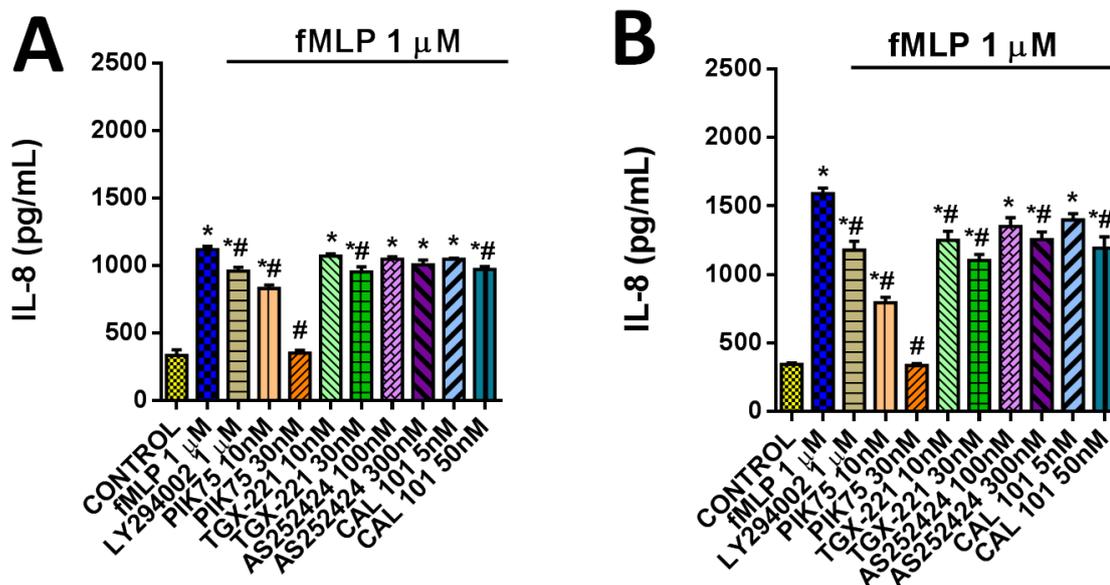
**Figura 22. Estudio del efecto de los inhibidores de PDE4 y PDE5 sobre la migración de fibrocitos circulantes.** Los fibrocitos fueron aislados a partir de sangre periférica de donadores sanos y tratadas con RNO (2nM), sildenafilo (Sild) (10nM; 100nM), la combinación de RNO (2nM) y sildenafilo (10nM) y, pirfenidona (500µM) y nintedanib (100nM) como compuestos control, durante 30min. A continuación, se dejaron migrar durante 6h. Los resultados muestran la media  $\pm$ SEM de tres experimentos independientes con triplicados.

**4.7. Estudio de los efectos de inhibidores PDE4 y PI3K $\delta$ , y su combinación, en la liberación de IL-8 por neutrófilos de pacientes con EPOC severa.**

Los neutrófilos fueron aislados de sangre periférica extraída de donadores sanos, no fumadores y fumadores, pacientes con EPOC estables y pacientes con EPOC severa de inicio temprano. La curva dosis respuesta de la combinación de RNO y CAL-101 (inhibidor de PI3K $\delta$ ) se realizó solo en pacientes EPOC severa de inicio temprana puesto que, los efectos de dicha combinación, ya han sido estudiados en los demás grupos. El estudio de los efectos de los inhibidores de subtipos de PI3K se estudió en los 4 grupos.

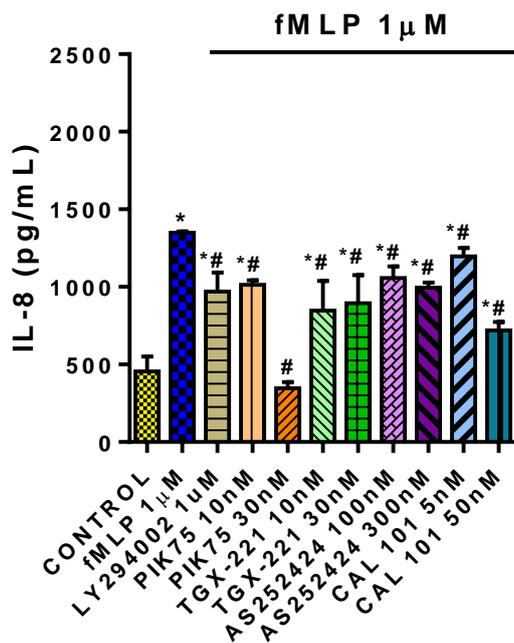
Se observó que, tras la administración de fMLP (1 $\mu$ M), los neutrófilos aislados de donantes sanos no fumadores y fumadores y, pacientes con EPOC estable y severa de inicio temprano, aumentaban significativamente la liberación de IL-8 (Figuras 23,24 y 25). Las basales de IL-8 (condición control), presentaron diferencias entre los grupos de donadores sanos, EPOC estable y EPOC severa de inicio temprano. Los pacientes EPOC severa de inicio temprano mostraron una basal mucho más elevada que las de los donadores sanos (no fumadores y fumadores) y EPOC estables.

El perfil obtenido en los grupos de donadores sanos fumadores y no fumadores fue muy similar (Figura 23). Se observó que, en sanos no fumadores (Figura 23A), LY294002 (1 $\mu$ M), PIK 75 (10nM; 30nM), TGX-221 (30nM) y CAL-101 (50nM) disminuían significativamente la liberación de IL-8 estimulada por fMLP. Por otro lado, en sanos fumadores (Figura 23B) se vio que todos los inhibidores, excepto AS252424 100nM, disminuían significativamente los niveles de IL-8 liberados.



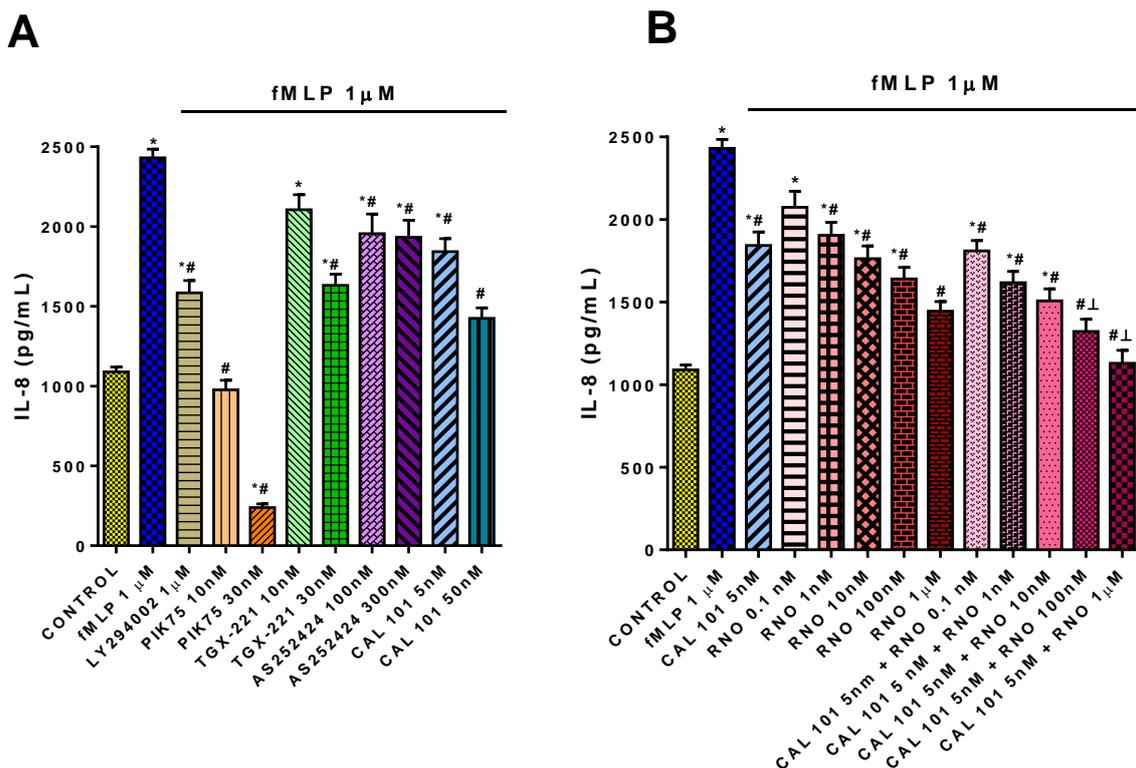
**Figura 23.** Estudio de los efectos de inhibidores de los subtipos de PI3K en la liberación de IL-8 por neutrófilos aislados de donadores sanos no fumadores (A) y sanos fumadores (B). Los neutrófilos fueron estimulados con fMLP 1 $\mu$ M durante 16h. Previamente, se incubaron con los inhibidores selectivos de los subtipos de PI3K: LY294002 (1 $\mu$ M), PIK75 (10nM;30nM), TGX-221 (10nM;30nM), AS252424 (100nM;300nM) y CAL-101 (5nM;50nM). Posteriormente, se llevó a cabo un estudio ELISA y se determinó, por absorbancia, el nivel de IL-8. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM de 3 donadores por triplicados (n=3). La estadística se basa en: \*p<0.05 vs. control; #p<0.05 vs. fMLP 1 $\mu$ M.

En neutrófilos aislados de pacientes EPOC estables se observó que, todos los inhibidores de los subtipos de PI3K, disminuían significativamente la liberación de IL-8 estimulada por fMLP (Figura 24), siendo PIK-75 (30nM), el fármaco con mayor capacidad inhibitoria.



**Figura 24. Estudio de los efectos de inhibidores de los subtipos de PI3K en la liberación de IL-8 por neutrófilos aislados de pacientes EPOC estables.** Los neutrófilos fueron estimulados con fMLP 1 μM durante 16h. Previamente, se incubaron con los inhibidores selectivos de los subtipos de PI3K: LY294002 (1 μM), PIK75 (10nM;30nM), TGX-221 (10nM;30nM), AS252424 (100nM;300nM) y CAL-101 (5nM;50nM). Posteriormente, se llevó a cabo un estudio ELISA y se determinó, por absorbancia, el nivel de IL-8. Los resultados se expresan como la media ± SEM de 3 donadores por triplicados (n=3). La estadística se basa en: \*p<0.05 vs. control; #p<0.05 vs. fMLP 1 μM.

En neutrófilos de pacientes con EPOC severa de inicio temprano se observó que, todos los inhibidores selectivos de los subtipos de PI3K (excepto TGX-221 a 10nM), disminuían significativamente la liberación de IL-8 estimulada por fMLP (Figura 25A). Además, RNO a dosis de 1nM a 1 μM, también reducía significativamente la liberación de IL-8, pero no a 0,1nM. Por el contrario, la combinación de RNO (0,1nM-1 μM) con CAL-101 5nM (inhibidor de PI3Kδ), logró disminuir significativamente los niveles de IL-8, siendo, además, diferencialmente significativas las combinaciones RNO (100nM; 1 μM) + CAL-101 (5nM) vs monoterapia (Figura 25B).



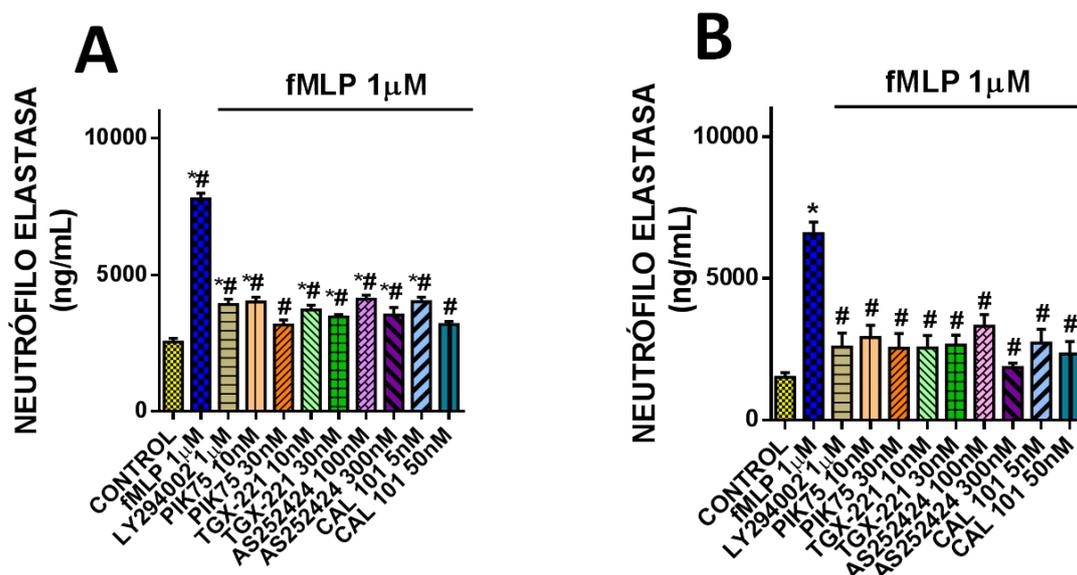
**Figura 25.** Estudio de los efectos de inhibidores de los subtipos de PI3K, RNO y su combinación, en la liberación de IL-8 por neutrófilos aislados de pacientes EPOC severa de inicio temprano. Los neutrófilos fueron estimulados con fMLP 1  $\mu$ M durante 16h. Previamente, se incubaron con los inhibidores selectivos de los subtipos de PI3K: LY294002 (1  $\mu$ M), PIK75 (10nM;30nM), TGX-221 (10nM;30nM), AS252424 (100nM;300nM) y CAL-101 (5nM;50nM), con un inhibidor de PDE4, RNO (0,1nM-1  $\mu$ M) y la combinación de RNO (0,1nM-1  $\mu$ M) con una dosis fija de CAL-101 (5nM). Posteriormente, se llevó a cabo un estudio ELISA y se determinó, por absorbancia, el nivel de IL-8. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM de 5 donadores por triplicados (n=3). La estadística se basa en: \*p<0.05 vs. control; #p<0.05 vs. fMLP 1  $\mu$ M; p<0.05 vs. Monoterapia.

#### 4.8. Estudio del perfil farmacológico de los inhibidores de PDE4 y PI3K $\delta$ , y su combinación, sobre la liberación de la neutrófilo elastasa en pacientes con EPOC severa.

Los neutrófilos fueron aislados de sangre periférica extraída de donadores sanos no fumadores, sanos fumadores, pacientes EPOC estables y pacientes EPOC severa de inicio temprano. La curva dosis respuesta de la combinación de RNO y CAL-101 se realizó solo en pacientes EPOC severa de inicio temprana puesto que, los efectos de dicha combinación sobre la neutrófilo elastasa ya han sido estudiados en los demás

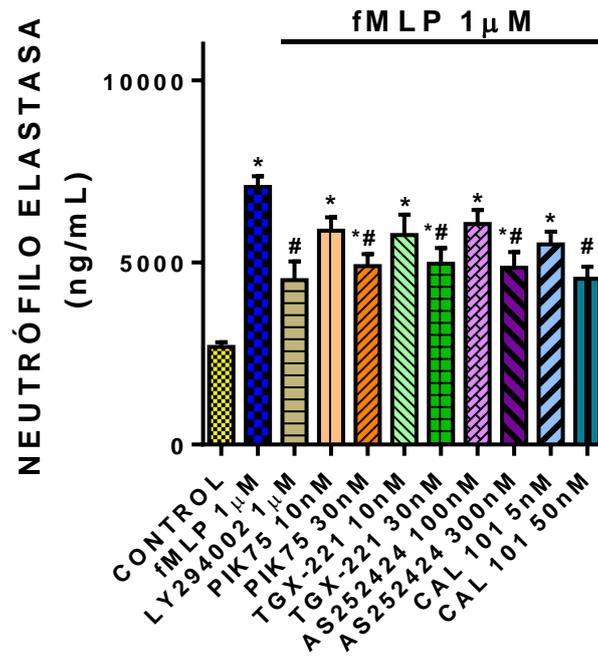
grupos. El estudio de los efectos de los inhibidores de subtipos de PI3K se estudió en los 4 grupos.

Tras la estimulación con fMLP ( $1\mu\text{M}$ ), todos los grupos aumentaron significativamente la liberación de elastasa (Figuras 26, 27, 28). El perfil farmacológico de los inhibidores selectivos de PI3K fue el mismo en neutrófilos aislados de sanos no fumadores (Figura 26A) y sanos fumadores (Figura 26B). Todos los inhibidores selectivos de PI3K disminuyeron significativamente la liberación de elastasa inducida por fMLP.



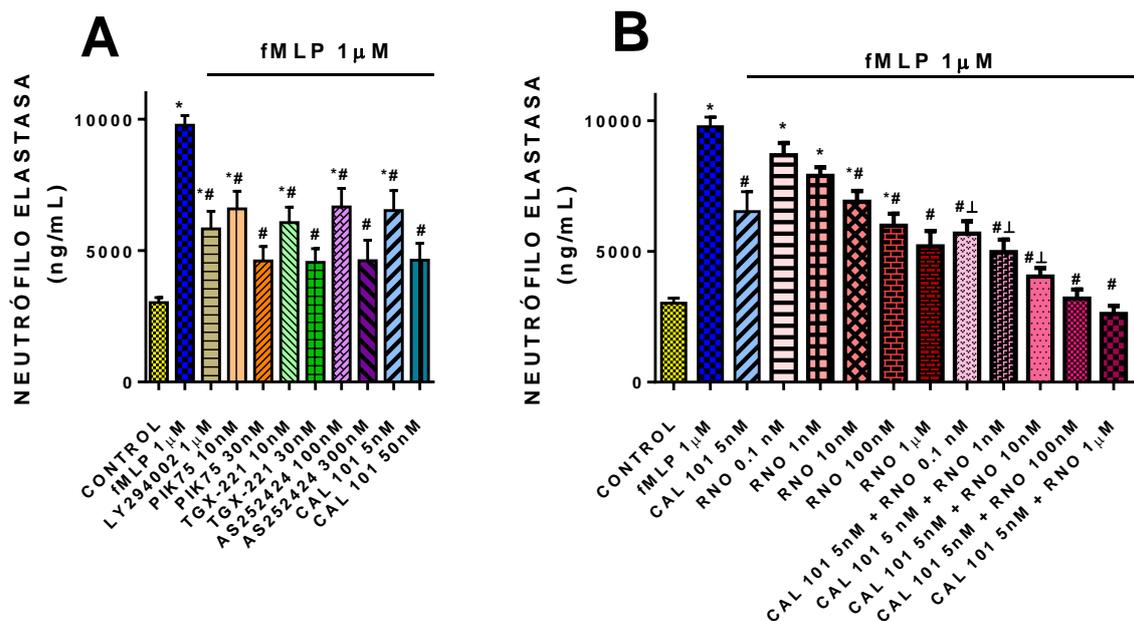
**Figura 26.** Efectos de los inhibidores selectivos de subtipos de PI3K sobre la liberación de la neutrófilo elastasa de donadores sanos no fumadores (A) y sanos fumadores (B). Los neutrófilos fueron estimulados con fMLP  $1\mu\text{M}$  durante 30min. Previamente, se incubaron con los inhibidores selectivos de los subtipos de PI3K: LY294002 ( $1\mu\text{M}$ ), PIK75 (10nM;30nM), TGX-221 (10nM;30nM), AS252424 (100nM;300nM) y CAL-101 (5nM;50nM). Posteriormente, se llevó a cabo un estudio ELISA y se determinó, por absorbancia, el nivel de elastasa. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM de 3 donadores por triplicados (n=3). La estadística se basa en: \* $p < 0.05$  vs. control; # $p < 0.05$  vs. fMLP  $1\mu\text{M}$ .

En el caso de pacientes EPOC estables, pese a observarse disminución de los niveles de elastasa en todas las condiciones, solo resultaron significativos LY294002 ( $1\mu\text{M}$ ), PIK 75 (30nM), TGX-221 (30nM), AS252424 (300nM) y CAL-101 (50nM) vs fMLP (Figura 27).



**Figura 27. Efectos de los inhibidores selectivos de subtipos de PI3K sobre la liberación de la neutrófilo elastasa de pacientes EPOC estables.** Los neutrófilos fueron estimulados con fMLP 1 $\mu$ M durante 30min. Previamente, se incubaron con los inhibidores selectivos de los subtipos de PI3K: LY294002 (1 $\mu$ M), PIK75 (10nM;30nM), TGX-221 (10nM;30nM), AS252424 (100nM;300nM) y CAL-101 (5nM;50nM). Posteriormente, se llevó a cabo un estudio ELISA y se determinó, por absorbancia, el nivel de elastasa. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM de 3 donadores por triplicados (n=3). La estadística se basa en: \*p<0.05 vs. control; #p<0.05 vs. fMLP 1 $\mu$ M.

En neutrófilos aislados de pacientes con EPOC severa de inicio temprano (Figura 28), se observó una disminución significativa de la liberación de elastasa tras la administración de todos los inhibidores selectivos de PI3K (Figura 28A), mientras que, tras la administración de RNO solo se observaron diferencias significativas en las concentraciones de 10nM a 1 $\mu$ M vs fMLP (Figura 28B). Sin embargo, la combinación de RNO (0,1nM a 1 $\mu$ M) con CAL-101 (5nM), consiguió disminuir significativamente la liberación de elastasa, presentando efectos aditivos vs a la monoterapia, las condiciones de RNO (0,1nM-10nM) + CAL-101 (5nM).



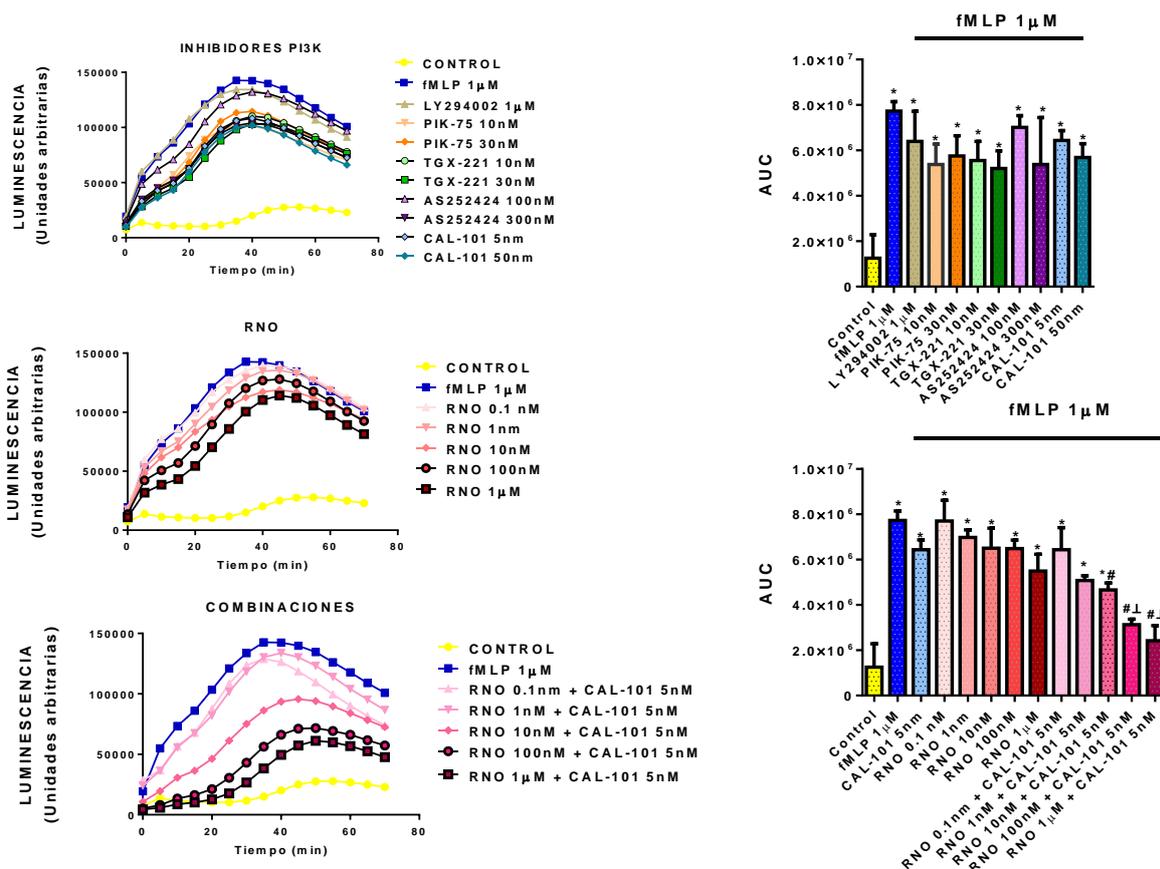
**Figura 28. Estudio de los efectos de inhibidores de los subtipos de PI3K, PDE4 y su combinación, en la liberación de la neutrófilo elastasa de pacientes EPOC severa de inicio temprano.** Los neutrófilos fueron estimulados con fMLP 1  $\mu$ M durante 30min. Previamente, se incubaron con los inhibidores selectivos de los subtipos de PI3K: LY294002 (1  $\mu$ M), PIK75 (10nM;30nM), TGX-221 (10nM;30nM), AS252424 (100nM;300nM) y CAL-101 (5nM;50nM), con un inhibidor de PDE4, RNO (0,1nM-1  $\mu$ M) y, la combinación de RNO (0,1nM-1  $\mu$ M) con una dosis fija de CAL-101 (5nM). Posteriormente, se llevó a cabo un estudio ELISA y se determinó, por absorbancia, el nivel de elastasa. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM de 5 donadores por triplicados (n=3). La estadística se basa en: \*p<0.05 vs. control; #p<0.05 vs. fMLP 1  $\mu$ M; p<0.05 vs. Monoterapia.

#### 4.9. Estudio del perfil farmacológico de los inhibidores de PDE4 y PI3K $\delta$ , y su combinación, sobre especies reactivas de oxígeno liberadas por neutrófilos de pacientes con EPOC severa.

Los neutrófilos fueron aislados de sangre periférica extraída de donadores sanos no fumadores, sanos fumadores, pacientes EPOC estables y pacientes EPOC severa de inicio temprano. Se realizó el estudio de los efectos de los inhibidores selectivos de PI3K, la curva dosis-respuesta de RNO y la combinación de RNO (0,01nM- 1  $\mu$ M) junto a una dosis fija de CAL-101 (5nM), en todos los grupos establecidos.

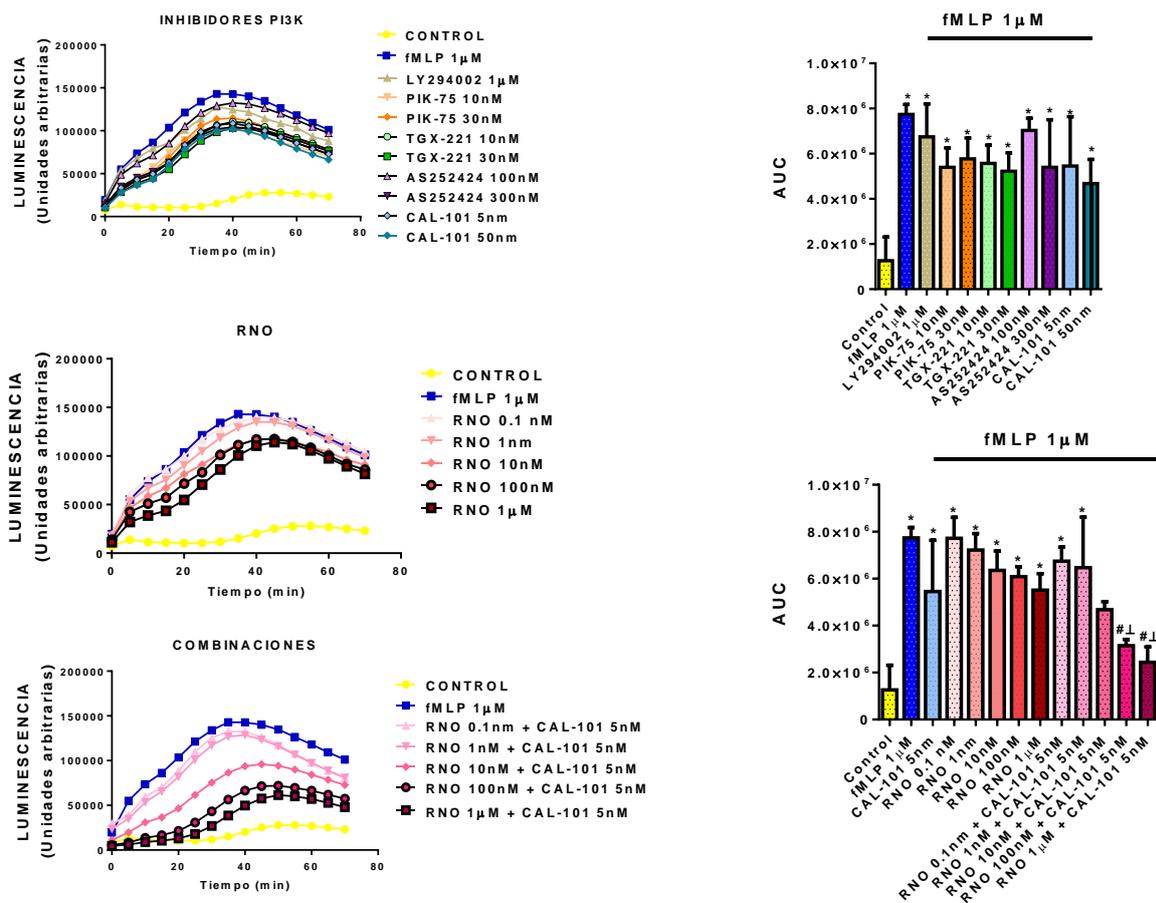
Tras la estimulación con fMLP 1  $\mu$ M se vio que, en los 4 grupos establecidos, los neutrófilos aumentaron significativamente la producción de ROS (Figuras 29-32).

En pacientes sanos no fumadores se observó una tendencia de disminución de la producción de moléculas ROS cuando los neutrófilos eran tratados con los inhibidores selectivos de los subtipos de PI3K y RNO (0,1nM-1 $\mu$ M), sin embargo, sólo presentaron diferencias significativas las combinaciones RNO 10nM + CAL-101 5nM, RNO 100nM + CAL-101 5nM y RNO 1 $\mu$ M + CAL-101 5nM *vs* fMLP, siendo diferencialmente significativas las combinaciones RNO (100nM; 1nM) + CAL-101 (5nM) *vs* monoterapia (Figura 29).



**Figura 29. Estudio de los efectos de inhibidores de PDE4 y de los subtipos de PI3K, y su combinación, en la liberación de ROS por neutrófilos aislados de donadores sanos no fumadores.** Los neutrófilos fueron estimulados con fMLP 1 μM durante 1h. Previamente, se incubaron con los inhibidores selectivos de los subtipos de PI3K: LY294002 (1 μM), PIK75 (10nM;30nM), TGX-221 (10nM;30nM), AS252424 (100nM;300nM) y CAL-101 (5nM;50nM), con un inhibidor de PDE4, RNO (0,1nM-1 μM) y, la combinación de RNO (0,1nM-1 μM) con una dosis fija de CAL-101 (5nM). Posteriormente, se llevó a cabo una medida de luminiscencia cada 5min durante 1h. Se realizó un cálculo del área bajo la curva (AUC) para obtener los valores gráficos. Los resultados se expresan como la media ± SEM de 3 donadores por triplicados (n=3). La estadística se basa en: \*p<0.05 vs. control; #p<0.05 vs. fMLP 1 μM; p<0.05 vs. Monoterapia.

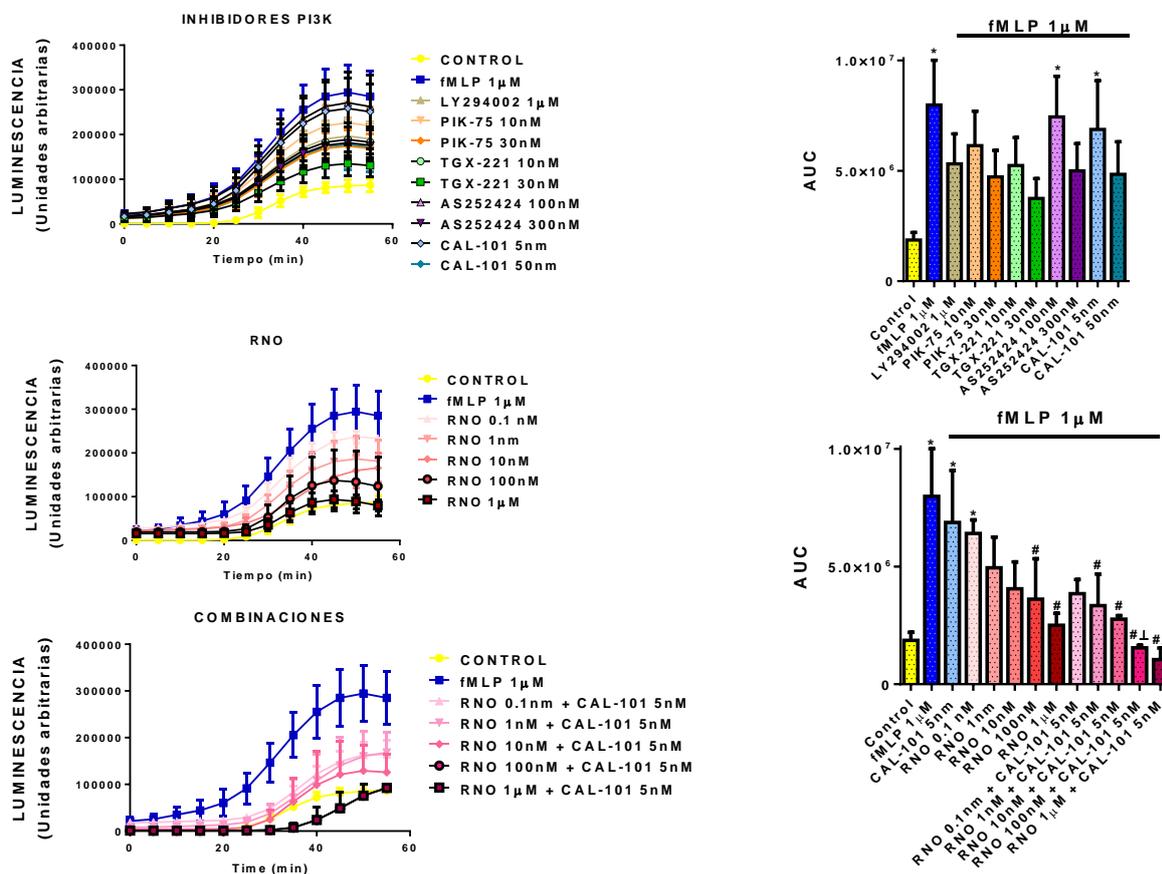
En el caso de los neutrófilos de sujetos sanos fumadores solo se observó una disminución significativa en las combinaciones de RNO (100nM; 1 μM) + CAL-101 (5nM), las cuales mostraron efectos aditivos vs a la monoterapia (Figura 30).



**Figura 30. Estudio de los efectos de inhibidores de PDE4 y de los subtipos de PI3K, y su combinación, en la liberación de ROS por neutrófilos aislados de donadores sanos fumadores.** Los neutrófilos fueron estimulados con fMLP 1μM durante 1h. Previamente, se incubaron con los inhibidores selectivos de los subtipos de PI3K: LY294002 (1μM), PIK75 (10nM;30nM), TGX-221 (10nM;30nM), AS252424 (100nM;300nM) y CAL-101 (5nM;50nM), con un inhibidor de PDE4, RNO (0,1nM-1μM) y la combinación de RNO (0,1nM-1μM) con una dosis fija de CAL-101 (5nM). Posteriormente, se llevó a cabo una medida de luminiscencia cada 5min durante 1h. Se realizó un cálculo del área bajo la curva (AUC) para obtener los valores gráficos. Los resultados se expresan como la media ± SEM de 3 donadores por triplicados (n=3). La estadística se basa en: \*p<0.05 vs. control; #p<0.05 vs. fMLP 1μM; p<0.05 vs. Monoterapia.

En pacientes con EPOC estable, tras aplicar los inhibidores selectivos de subtipos de PI3K y de RNO, se observó que, pese a observarse una tendencia de disminución de los niveles de ROS en todas las condiciones, ninguno de los inhibidores selectivos de los subtipos de PI3K presentaron diferencias significativas vs fMLP. Por el contrario, el tratamiento con RNO, a dosis de 100nM y 1μM, disminuyó significativamente los niveles de ROS inducidos por fMLP. Además, se observó que la combinación con RNO (a dosis de 1nM a 1μM) y CAL-101 (5nM) logró disminuir la producción de ROS por

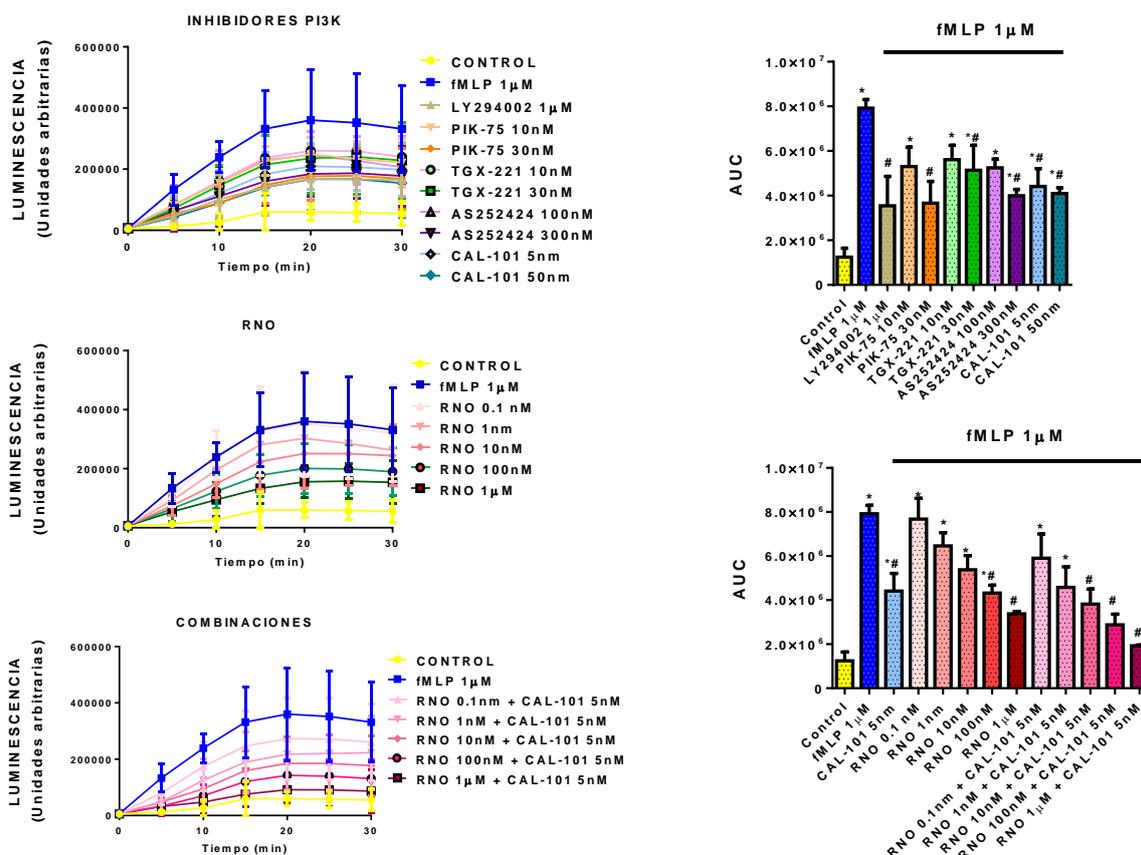
los neutrófilos, resultando diferencialmente significativas las condiciones RNO 100nM + CAL-101 5nM y RNO 1µM + CAL 101 5nM vs monoterapia (Figura 31).



**Figura 31. Estudio de los efectos de inhibidores de PDE4 y de los subtipos de PI3K, y su combinación, en la liberación de ROS por neutrófilos aislados pacientes con EPOC estable.** Los neutrófilos fueron estimulados con fMLP 1µM durante 1h. Previamente, se incubaron con los inhibidores selectivos de los subtipos de PI3K: LY294002 (1µM), PIK75 (10nM;30nM), TGX-221 (10nM;30nM), AS252424 (100nM;300nM) y CAL-101 (5nM;50nM), con un inhibidor de PDE4, RNO (0,1nM-1µM) y, la combinación de RNO (0,1nM-1µM) con una dosis fija de CAL-101 (5nM). Posteriormente, se llevó a cabo una medida de luminiscencia cada 5min durante 1h. Se realizó un cálculo del área bajo la curva (AUC) para obtener los valores gráficos. Los resultados se expresan como la media ± SEM de 3 donadores por triplicados (N=3). La estadística se basa en: \*p<0.05 vs. control; #p<0.05 vs. fMLP 1µM; p<0.05 vs. Monoterapia.

En pacientes con EPOC severa de inicio temprano, se observó una disminución significativa tras la administración de los inhibidores selectivos de subtipos de PI3K: LY294002 (1µM), PIK-75 (30nM), TGX-221 (30nM), AS252424 (300nM), CAL-101 (5nM; 50nM) vs fMLP (Figura 32). Por otro lado, sólo las concentraciones de RNO a

100nM y 1µM consiguieron disminuir significativamente la producción de ROS inducida por fMLP. Sin embargo, se observó una disminución significativa de ROS tras la combinación de RNO (10nM a 1µM) y CAL-101 (5nM). Ninguna de las combinaciones mostró diferencias significativas vs monoterapia.



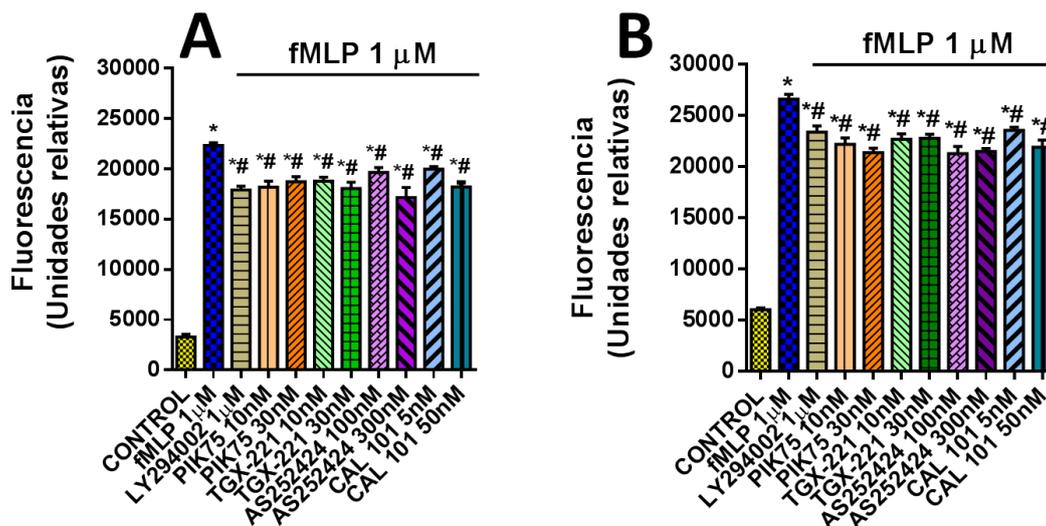
**Figura 32. Estudio de los efectos de inhibidores de PDE4 y de los subtipos de PI3K, y su combinación, en la liberación de ROS por neutrófilos aislados pacientes con EPOC severa de inicio temprano.** Los neutrófilos fueron estimulados con fMLP 1µM durante 1h. Previamente, se incubaron con los inhibidores selectivos de los subtipos de PI3K: LY294002 (1µM), PIK75 (10nM;30nM), TGX-221 (10nM;30nM), AS252424 (100nM;300nM) y CAL-101 (5nM;50nM), con un inhibidor de PDE4, RNO (0,1nM-1µM) y, la combinación de RNO (0,1nM-1µM) con una dosis fija de CAL-101 (5nM). Posteriormente, se llevó a cabo una medida de luminiscencia cada 5min durante 1h. Se realizó un cálculo del área bajo la curva (AUC) para obtener los valores gráficos. Los resultados se expresan como la media ± SEM de 3 donadores por triplicados (n=3). La estadística se basa en: \*p<0.05 vs. control; #p<0.05 vs. fMLP 1µM; p<0.05 vs. Monoterapia.

**4.10. Estudio de los efectos de los inhibidores de PDE4 y PI3K $\delta$ , y su combinación, en la migración de neutrófilos aislados de pacientes con EPOC severa.**

Para realizar el estudio de migración celular, los neutrófilos fueron aislados de sangre periférica extraída de donadores sanos no fumadores, sanos fumadores, pacientes EPOC estables y pacientes EPOC severa de inicio temprano. La curva dosis respuesta de la combinación de RNO y CAL-101 se realizó solo en pacientes EPOC severa de inicio temprana. El estudio de los efectos de los inhibidores de subtipos de PI3K se estudió en los 4 grupos.

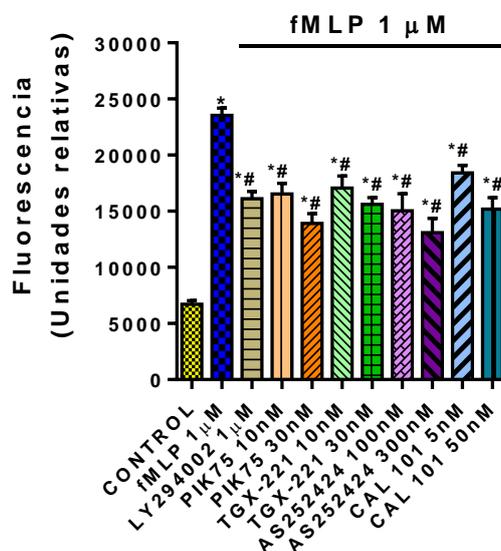
En los 4 grupos estudiados se observó que, tras la estimulación con fMLP (1 $\mu$ M), utilizado como agente migratorio, los neutrófilos aumentaban la migración (Figuras 33-35).

En ambos grupos de donadores sanos, no fumadores (Figura 33A) y fumadores (Figura 33B), se observó que, tras la administración de los inhibidores selectivos de subtipos de PI3K, la migración celular se reducía significativamente.



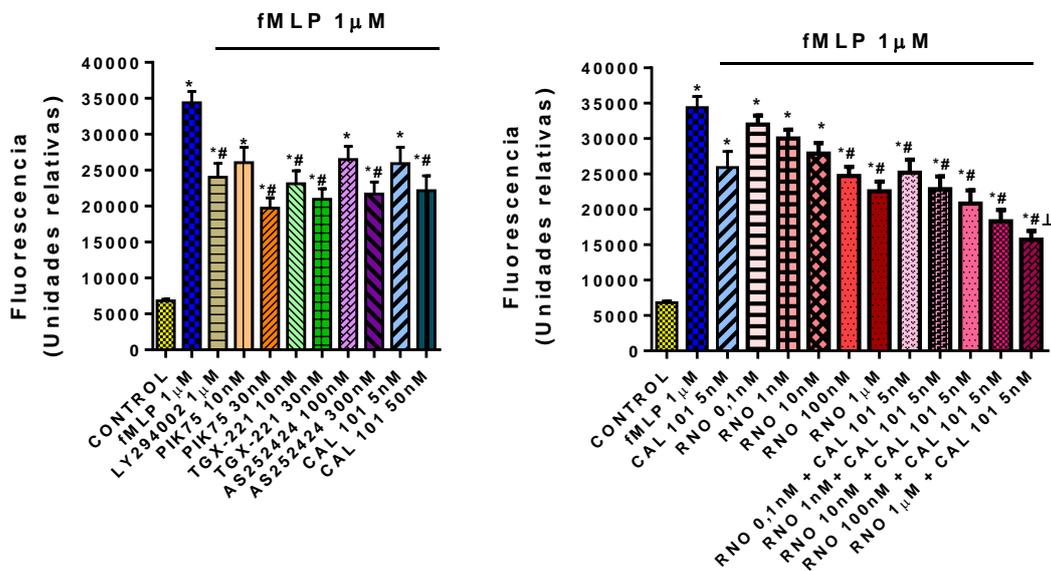
**Figura 33.** Estudio de los efectos de los inhibidores selectivos de PI3K sobre la migración de neutrófilos aislados de donadores sanos no fumadores (A) y sanos fumadores (B). Los neutrófilos fueron estimulados con fMLP 1 $\mu$ M durante 30min. Previamente, se incubaron con los inhibidores selectivos de los subtipos de PI3K: LY294002 (1 $\mu$ M), PIK75 (10nM;30nM), TGX-221 (10nM;30nM), AS252424 (100nM;300nM) y CAL-101 (5nM;50nM). Posteriormente, se siguió el protocolo descrito por el fabricante del kit “Cytoselect TM 96 well cell migration assay (3 $\mu$ m, fluorometric)” (Cell Biolabs, CBA-104). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM de 3 donadores por triplicados (n=3). La estadística se basa en: \*p<0.05 vs. control; #p<0.05 vs. fMLP 1 $\mu$ M.

En pacientes con EPOC estable se observó el mismo perfil farmacológico de los inhibidores de PI3K que en los neutrófilos de donantes sanos. Tras la administración del tratamiento con los inhibidores de PI3K, la migración celular disminuía significativamente (Figura 34).



**Figura 34. Estudio de los efectos de los inhibidores selectivos de subtipos de PI3K sobre la migración de neutrófilos aislados de pacientes con EPOC estable.** Los neutrófilos fueron estimulados con fMLP 1μM durante 30min. Previamente, se incubaron con los inhibidores selectivos de los subtipos de PI3K: LY294002 (1μM), PIK75 (10nM;30nM), TGX-221 (10nM;30nM), AS252424 (100nM;300nM) y CAL-101 (5nM;50nM). Posteriormente, se siguió el protocolo descrito por el fabricante del kit “Cytoselect TM 96 well cell migration assay (3μM, fluorometric)” (Cell Biolabs, CBA-104). Los resultados se expresan como la media ± SEM de 3 donadores por triplicados (n=3). La estadística se basa en: \*p<0.05 vs. control; #p<0.05 vs. fMLP 1μM.

En neutrófilos de pacientes EPOC de inicio temprano se vio que, tras la administración de los inhibidores selectivos de subtipos de PI3K: LY294002 (1μM), PIK 75 (30nM), TGX-221 (10nM; 30nM), AS252424 (300nM) y CAL-101 (50nM) y, de RNO (100nM; 1μM), se produjo una disminución significativa de la migración celular. Además, todas las combinaciones de RNO (0,1nM a 1μM) con CAL-101 (5nM) disminuyeron significativamente la migración celular estimulada por el fMLP, presentando diferencias significativas la condición RNO 1μM + CAL-101 5nM vs la monoterapia (Figura 35).



**Figura 35.. Estudio de los efectos de los inhibidores selectivos de subtipos de PI3K, PDE4 y su combinación, sobre la migración de neutrófilos aislados de pacientes con EPOC severa de inicio temprano.** Los neutrófilos fueron estimulados con fMLP 1 μM durante 30min. Previamente, se incubaron con los inhibidores selectivos de los subtipos de PI3K: LY294002 (1 μM), PIK75 (10nM;30nM), TGX-221 (10nM;30nM), AS252424 (100nM;300nM) y CAL-101 (5nM;50nM), con un inhibidor de PDE4, RNO (0,1nM-1 μM) y, la combinación de RNO (0,1nM-1 μM) con una dosis fija de CAL-101 (5nM). Posteriormente, se siguió el protocolo descrito por el fabricante del kit "Cytoselect TM 96 well cell migration assay (3 μm, fluorometric)" (Cell Biolabs, CBA-104). Los resultados se expresan como la media ± SEM de 3 donadores por triplicados (n=3). La estadística se basa en: \*p<0.05 vs. control; #p<0.05 vs. fMLP 1 μM.

## **5. DISCUSIÓN**



**5.1. ESTUDIO I. LOS INHIBIDORES PDE4 INHIBEN PROCESOS CELULARES FUNDAMENTALES EN LA FPI Y, SU COMBINACIÓN CON INHIBIDORES DE PDE5, PRESENTA UN EFECTO ADITIVO SOBRE LAS TRANSFORMACIONES CELULARES OBSERVADAS EN LA FPI.**

A continuación, se describen los principales resultados obtenidos en el primer estudio de esta tesis doctoral, que hacen referencia al objetivo planteado:

- (1) Roflumilast N-óxido (RNO), un inhibidor de PDE4, muestra un efecto inhibitorio de la etapa TEM, inducida por TGF- $\beta$ 1, en CEAI.
- (2) RNO, es capaz de frenar la diferenciación y migración celular inducida por TGF- $\beta$ 1, en fibrocitos.
- (3) La adición de sildenafil, un inhibidor de PDE5, a RNO, mejora el perfil farmacológico estudiado en CEAI y fibrocitos, demostrando efectos aditivos tras su combinación.

Estos novedosos resultados sugieren que los inhibidores de PDE4 y, la adición de un inhibidor PDE5 al mismo, mejora el perfil patogénico característico de la FPI en procesos como el estrés en el RE y la UPR en CEAI, la migración celular de fibrocitos y el proceso TEM en ambos tipos celulares, resultando un tratamiento beneficioso en las principales células involucradas en el proceso FPI. Este hecho apuntaría a un nuevo tratamiento para la FPI dirigido a los procesos moleculares de la enfermedad.

Las CEAI y fibroblastos han sido implicadas en el proceso TEM característico de la FPI. De hecho, las CEAI sufren una proliferación hiperplásica cuando las CEAI se reducen en número, dejando expuesta la MB [16]. Se piensa que la disfunción de las CEAI es la primera causa de FPI [32], pero el mecanismo por el que la enfermedad progresa es desconocido. Además, en pacientes con FPI, la población de fibroblastos también se ve incrementada, pero no se tiene claro su origen [25, 26, 118]. Bucala y

colaboradores [28], describieron que la fibroproliferación podría deberse al proceso de TEM en las CEAI o al reclutamiento de fibrocitos circulantes que acuden a las lesiones para repararlas. Además, también se ha descrito que las CEAI podrían desarrollar un proceso de estrés en el RE que resultaría en la TEM o en apoptosis [37].

El perfil de las enzimas PDE4 y PDE5 y su implicación en fibroblastos de pulmón, ya ha sido estudiado. Además, se demostró que ambas enzimas eran cruciales en el control de TGF- $\beta$  inducida por un cambio fenotípico de fibroblasto a miofibroblasto [61]. Este hecho ponía de manifiesto que un tratamiento con inhibidores de PDE4 y PDE5 podría ser beneficioso para tratar modelos de fibrosis.

Por otro lado, se ha demostrado que inhibidores PDE4 reducen la proliferación de fibroblastos en pulmón y la síntesis de MEC [119]. Adicionalmente, Cortijo y colaboradores [59], demostraron que, roflumilast, el primer inhibidor de PDE4 aprobado como tratamiento para la EPOC por sus características antiinflamatorias entre otras, también podría ejercer un efecto beneficioso sobre la remodelación arquitectónica del pulmón. Sin embargo, los efectos de los inhibidores de PDE4 en fibrocitos circulantes no habían sido estudiados hasta el momento.

Los inhibidores PDE5 por su parte, son capaces de reducir la sobreexpresión de  $\alpha$ -SMA inducida por TGF- $\beta$ 1 en 3 líneas de fibroblastos y en fibroblastos primarios de pulmón [61]. Sin embargo, su efecto sobre la TEM de las CEAI no había sido estudiado. Además, su combinación con inhibidores de PDE4, en células musculares del pulmón, consiguió disminuir significativamente los efectos fibróticos asociados a la enfermedad de Duchenne [63]. De hecho, este trabajo realizó un estudio de la implicación de PDE5 y TGF- $\beta$ 1 en el proceso TEM de CEAI (Figura 11), donde se ha podido ver que, tanto TGF- $\beta$ 1 como PDE5 se encontraban aumentadas en dicho proceso.

En relación con los objetivos planteados, en este trabajo se ha analizado la expresión de marcadores mesenquimales ampliamente referenciados en estudios de TEM, como las proteínas del citoesqueleto  $\alpha$ -SMA y vimentina, así como, la proteína de matriz extracelular COL tipo I [120]. Cabe destacar que tanto  $\alpha$ -SMA como COL tipo I son marcadores específicos para el fenotipo característico de la TEM [120, 121]. Además, puesto que la TEM también se caracteriza por la pérdida de las células epiteliales y, por consiguiente, por una marcada reducción de la expresión de marcadores epiteliales como E-cadherina, ZO-1 y KRT18, también se ha analizado la pérdida de expresión de estos marcadores epiteliales como indicador del proceso de TEM.

Respecto a la presencia de marcadores de TEM, cabe destacar que, tanto las CEAI como los fibrocitos diferenciados, fueron positivas para los marcadores mesenquimales  $\alpha$ -SMA y COL tipo I (Figuras 9, 19 y 20). La presencia de ambos marcadores podría explicarse teniendo en cuenta que, la co-expresión de algunos marcadores epiteliales y mesenquimales en células individuales, ha sido descrita previamente durante la transición [121, 122]. Además, las CEAI también dieron un resultado positivo de vimentina tras ser estimuladas con TGF- $\beta$ 1 (Figura 9). El tratamiento con RNO, el inhibidor de PDE4, resultó beneficioso a altas dosis (1 $\mu$ M), pero no revertió la sobreexpresión por TGF- $\beta$ 1 cuando se administraba a una dosis baja (2nM). Sin embargo, la combinación de inhibidores demostró un efecto aditivo beneficioso, siendo la condición más eficiente con una acentuada reducción en la expresión genética de estos marcadores.

En cuanto a la expresión de marcadores epiteliales, se ha observado una disminución proteica de E-cadherina, ZO-1 y KRT-18 en CEAI tras la estimulación con TGF- $\beta$ 1. Sólo RNO (1 $\mu$ M) fue capaz de revertir el efecto causado por TGF- $\beta$ 1 en la

expresión de ZO-1. Sin embargo, el tratamiento combinatorio de los inhibidores PDE4 y PDE5 consiguió aumentar, de forma aditiva, la expresión de los 3 marcadores epiteliales estudiados en las CEAI (Figura 10).

En base a la literatura disponible, este trabajo es el primero en mostrar los efectos de inhibidores de PDE4 sobre el proceso de diferenciación de fibrocitos a miofibroblastos y, los efectos de la combinación de inhibidores PDE4 y PDE5 en CEAI y fibrocitos.

A continuación, se realizó el estudio de la inducción del estrés en el RE y la señalización UPR en las células CEAI. Existen claras evidencias de que TGF- $\beta$  es un candidato primordial en la inducción de la TEM, sin embargo, el aumento del estrés en el RE de las CEAI ha demostrado jugar un papel importante [32]. De hecho, cada vez más evidencias apuntan a un papel prominente del estrés en el RE y una considerable UPR en la FPI. Además, se ha demostrado que, pacientes con FPI, poseen un número de marcadores UPR y apoptosis elevado, siendo IRE el “interruptor” de la apoptosis por excelencia, aunque no el único envuelto en esta vía [35]. Estos hechos, evidencian que un efecto farmacológico sobre el estrés del RE y la UPR, podría disminuir el proceso de TEM y, por tanto, la fibroproliferación.

Este trabajo ha demostrado que la chaperona Grp78, implicada en el estrés del RE, sufre un aumento de expresión tras ser expuesta a TGF- $\beta$ 1 (Figura 12). Los inhibidores de PDE4 y PDE5, pese a demostrar una tendencia significativa, por si solos, no fueron capaces de disminuir significativamente la expresión de Grp78. Sin embargo, su combinación proporciona una disminución significativa de dicha chaperona. Por otra parte, el estudio de la viabilidad celular realizado con anexina V, un marcador de apoptosis celular, reveló que, los efectos de TGF- $\beta$ 1 pueden desencadenar un efecto apoptótico en las CEAI (Figura 16). El tratamiento farmacológico con RNO (2nM) y

sildenafil (10nM), disminuyó relativamente los efectos apoptóticos inducidos por TGF- $\beta$ 1. Sin embargo, la combinación RNO (2nM) y sildenafil (10nM) fue la que mostró mayor semejanza a la condición control.

La sobreexpresión de IRE y ERK1/2 fosforiladas observada en este trabajo, puso de manifiesto la activación de la señalización UPR (Figuras 13-15). Aunque IRE es considerado como “el interruptor de la apoptosis” más relevante, pERK1/2, también juega un papel importante en la activación de las vías pro-apoptóticas. RNO (2nM; 1 $\mu$ M) y sildenafil (10nM; 100nM), disminuyeron significativamente la sobreexpresión de pIRE inducida por TGF- $\beta$ 1 en CEAI (Figura 13 y 14). Sin embargo, la sobreexpresión de pERK1/2 disminuyó tras la adición del tratamiento con RNO (2nM; 1 $\mu$ M) y sildenafil (100nM), pero no con sildenafil a 10nM (Figura 15). Por el contrario, la combinación de RNO (2nM) y sildenafil (10nM), demostró, en ambas proteínas, efectos aditivos que superaban la eficacia de compuestos ya utilizados como terapia en la FPI, como lo son la pirfenidona y el nintedanib.

Actualmente, es bastante conocido el papel desempeñado de SMAD3 sobre la fibrosis. La inducción por TGF- $\beta$  desencadena la activación de la ruta SMAD3, donde, la translocación de SMAD al núcleo genera la activación de factores pro-apoptóticos desencadenantes de la fibrosis [123]. Este trabajo, ha llevado a cabo el estudio de la sobreexpresión de pSMAD3 en CEAI, tras la inducción por TGF- $\beta$ 1, donde se observó una sobreexpresión de pSMAD3 (Figura 17). El tratamiento con RNO (2nM; 1 $\mu$ M) consiguió reducir significativamente la sobreexpresión de pSMAD3, pero sildenafil no logró el mismo efecto. Sin embargo, la combinación de ambos inhibidores consiguió disminuir de forma aditiva la sobreexpresión de pSMAD3 inducida por TGF- $\beta$ 1.

En relación a la migración celular, se han encontrado evidencias de que, la inhibición de la migración de fibrocitos en ratones con FPI, disminuía la fibrosis [25,

26]. También, se ha evidenciado que, el número de fibrocitos en tejido pulmonar fibrótico estaba directamente correlacionado con el número de focos fibroblásticos [124]. Se piensa que, las células epiteliales, pueden inducir esta migración con la liberación de CXCL12 y CCL2 que interaccionarían con CXCR4 o CCR2. La concentración en plasma de CXCL12 ya fue estudiada en pacientes FPI y parece ser que estaba incrementada[125]. De la misma forma, se estudió la expresión de CXCL12 y CXCR4 en tejido de pulmón fibrótico y como resultado se obtuvo un aumento *vs* control [126]. Estrategias dirigidas a CXCL12 ya han sido probadas y parecen reducir la respuesta fibrótica inducida tras el estímulo con bleomicina [122, 126].

En este trabajo, se estudiaron los efectos de inhibidores de PDE4 y PDE5, y su combinación, en la migración de fibrocitos mediada por quimioatrayentes como CXCL12, fibronectina o FBS (Figura 22). Los fibrocitos circulantes aumentaban su migración tras ser estimulados con los quimioatrayentes. Se observó que RNO (2nM) no era capaz de frenar la migración celular por CXCL12(100ng/ml), CXCL12 + Fibronectina y FBS (20%). Sildenafil, a 10nM, sólo conseguía revertir los efectos migratorios estimulados por FBS, pero, a 100nM, consiguió frenar la migración celular estimulada por todos los quimioatrayentes. Por el contrario, la combinación de RNO (2nM) junto a sildenafil (10nM) consiguió frenar significativamente la migración de los fibrocitos.

En resumen, un tratamiento con inhibidores de PDE4 combinado con inhibidores PDE5 es capaz de disminuir el proceso TEM inducido por TGF- $\beta$ 1, en términos de señalización celular y molecular. Este tratamiento consigue disminuir los marcadores mesenquimales involucrados en el proceso TEM de CEAI y fibrocitos diferenciados a miofibroblastos y, consecuentemente, aumentar la expresión de marcadores epiteliales, perdidos tras dicho proceso. También, es capaz de reducir la expresión de marcadores

de estrés en el RE, como Grp78, señalizadores de la UPR, como pIRE y pER1/2, así como, la sobreexpresión de proteínas activadas por la vía TGF- $\beta$ 1, como SMAD3. Además, consigue frenar la migración de fibrocitos circulantes inducida por quimioatrayentes como CXCL12, fibronectina y FBS.

---

## **5.2. ESTUDIO II. LOS INHIBIDORES DE PDE4 DISMINUYEN LA SOBREATIVACION NEUTROFILICA Y, EN COMBINACION CON INHIBIDORES DE PI3K $\delta$ , PRESENTAN EFECTOS ADITIVOS SOBRE PROCESOS INFLAMATORIOS CLAVE EN LOS FENOTIPOS MAS AGRESIVOS DE LA EPOC SEVERA.**

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

- a) RNO, un inhibidor de PDE4, inhibe el fenotipo súper-activo (en términos de potenciación quimiotáctica, liberación de ROS y elastasa) asumido por los neutrófilos de sangre periférica de pacientes con EPOC severa.
- b) Los inhibidores de subtipos de PI3K disminuyen el fenotipo súper-activo de los neutrófilos de EPOC severa y, la combinación de inhibidores de PI3K $\delta$  con inhibidores PDE4, muestra efectos aditivos beneficiosos.

Estos resultados muestran evidencias, no descritas previamente, del papel de los inhibidores de PDE4 e inhibidores PI3K, y su combinación, en neutrófilos aislados de los fenotipos más agresivos de la EPOC severa, como lo es la EPOC severa de inicio temprano. Así mismo, estudios pasados han demostrado el efecto de inhibidores PDE4 y PI3K $\delta$ , y su combinación, en neutrófilos aislados de donadores sanos.

La participación del AMPc en los procesos antiinflamatorios y, su relación con la enzima PDE4, encargada de su degradación, ha desencadenado una atracción hacia el estudio de los inhibidores de PDE4 como tratamiento de la EPOC. De hecho, desde que se conoce que la PDE4 se expresa en todas las células de relevancia en la EPOC (entre ellos los neutrófilos, células T, macrófagos y células epiteliales de las vías respiratorias), los inhibidores de PDE4 están siendo objeto de estudio [127, 128]. Se conocen infinidad de efectos de los inhibidores de PDE4 tanto en modelos *in vivo* como

*in vitro*, entre los que cabe destacar, su capacidad antiinflamatoria, la inhibición de la remodelación celular y el estrés oxidativo [129-131]. Hasta el momento, sus efectos han sido estudiados en neutrófilos de pacientes con EPOC estable, pero no en los fenotipos más agresivos de la EPOC severa.

Se han encontrado evidencias de que todas las familias de PI3K se expresan en los neutrófilos implicados con la activación de células inflamatorias [105, 106]. De hecho, PI3K $\delta$  se encuentra sobreexpresada en pulmones y neutrófilos de sangre periférica de EPOC, lo que podría explicar la respuesta limitada a esteroides en la inflamación neutrofílica de las vías aéreas en EPOC [112], puesto que se ha visto una implicación de PI3K $\delta$  en la resistencia a corticosteroides [132].

Un modelo reciente ha indicado un efecto aditivo tras la combinación de un inhibidor selectivo de PI3K $\delta$  junto a un inhibidor de PDE4, cuyo efecto se basa en la inhibición de la elastasa neutrofílica inducida por fMLP en neutrófilos humanos de donadores sanos [113]. Pese a que los resultados hallados desvelan una terapia potencial para palear el fenotipo sobreexpresado de la EPOC, hasta el momento, no se había llevado a cabo ningún estudio de los efectos combinatorios de los inhibidores de PDE4 y PI3K $\delta$  en neutrófilos aislados de los fenotipos más agresivos de la EPOC severa, como lo es la EPOC severa de inicio temprano.

En este segundo estudio se han observado los efectos de los inhibidores de PDE4 y PI3K $\delta$ , y su combinación, en la EPOC severa de inicio temprano y, comparados con el perfil farmacológico de los inhibidores selectivos de PI3K en neutrófilos aislados de donadores sanos, no fumadores y fumadores, y pacientes con EPOC estable. El perfil farmacológico de RNO y su combinación, solo ha sido realizado en pacientes EPOC severa de inicio temprano, excepto los ensayos de ROS que se realizaron en los 4 grupos. Este hecho se debe a que los estudios del perfil de RNO y PI3K $\delta$  sobre la

liberación de IL-8, elastasa y migración celular en donadores sanos y EPOC estable ya han sido estudiados [133].

Los resultados de este estudio demuestran que RNO (1nM-1 $\mu$ M), es capaz de disminuir significativamente la liberación de IL-8 inducida por fMLP en pacientes EPOC severa de inicio temprano (Figura 25). Por otra parte, el perfil farmacológico de los inhibidores selectivos de PI3K ha demostrado una gran eficiencia en la disminución de la liberación de la IL-8. Estos resultados se han observado en los 4 grupos de estudio (Figuras 23-25). Además, la adición de un inhibidor de PI3K $\delta$  (5nM) a RNO (100nM y 1 $\mu$ M), en pacientes con EPOC severa, ha demostrado efectos aditivos beneficiosos *vs* la monoterapia sobre la liberación de IL-8 estimulada por fMLP.

La combinación de inhibidores de PDE4 y PI3K $\delta$  demostró efectos beneficiosos sobre la liberación de la elastasa inducida por fMLP, en neutrófilos de sujetos sanos [113]. En este trabajo, se ha realizado el estudio de los efectos de RNO sobre la liberación de la elastasa en pacientes con EPOC severa de inicio temprano, y se ha observado que, RNO, a dosis de 10nM a 1 $\mu$ M, consigue disminuir la liberación de elastasa neutrofílica tras la estimulación con fMLP (Figura 28). El perfil farmacológico de los inhibidores selectivos de PI3K demostró una disminución significativa de la elastasa liberada, tras la estimulación por fMLP, en donadores sanos, tanto no fumadores (Figura 26A) como fumadores (Figura 26B) y, en pacientes con EPOC severa de inicio temprano (Figura 28A). Sin embargo, en neutrófilos aislados de pacientes con EPOC estable (Figura 27), sólo se consiguió revertir el efecto causado por el fMLP con la dosis más alta de los inhibidores selectivos de subtipos de PI3K. Por otro lado, la adición del inhibidor de PI3K $\delta$  (5nM) a RNO (0,1nM-10nM), aportó efectos aditivos en los pacientes con EPOC severa de inicio temprano (Figura 28B).

En relación con la liberación de moléculas ROS por neutrófilos, se ha descrito una clara participación de estas moléculas en la gravedad de la EPOC [134]. El daño pulmonar causado por factores desencadenantes de la EPOC, libera una serie de factores endógenos que desencadenan una respuesta inflamatoria caracterizada por la infiltración de células inflamatorias en la mucosa, submucosa y tejido glandular [128]. Este hecho, conlleva a la liberación excesiva de moléculas ROS, producida por un desequilibrio antioxidante/oxidante que generará una amplificación de la respuesta inflamatoria [134]. En este trabajo se ha llevado a cabo el estudio de la liberación de moléculas ROS inducidas por fMLP. El perfil farmacológico de RNO, de los inhibidores selectivos de PI3K y, la combinación de RNO y el inhibidor de PI3K $\delta$ , ha sido estudiado en los 4 grupos establecidos (Figuras 29-32). Se ha observado que, tanto en EPOC estable como en EPOC severa de inicio temprano, RNO ha sido capaz de disminuir la excesiva liberación de ROS, estimulada por fMLP, a dosis de 100nM y 1 $\mu$ M (Figura 31 y 32). Sin embargo, los inhibidores selectivos de PI3K sólo lograron disminuir significativamente la producción de ROS de los neutrófilos de pacientes con EPOC severa y, a sus dosis más elevadas. Por el contrario, la adición del inhibidor de PI3K $\delta$  a RNO presentó efectos aditivos en todos los grupos estudiados.

En cuanto a la migración neutrofílica, se ha descrito la participación de las familias de PI3K sobre este proceso, así como, en la liberación de superóxido, en la supervivencia o en la fagocitosis [105, 106]. La migración de neutrófilos aparece como un ejemplo para la colaboración secuencial de PI3K y su subtipo  $\delta$ . Los efectos de los inhibidores de PDE4 sobre la actividad migratoria de los neutrófilos ya ha sido descrita, pero no en pacientes EPOC severa de inicio temprano. RNO ha demostrado tener una capacidad inhibitoria de la migración en este tipo celular [135]. En este trabajo se ha observado que, en pacientes con EPOC severa de inicio temprano, RNO a dosis de

100nM y 1 $\mu$ M, consigue reducir la migración celular inducida por fMLP (Figura 35B). Referente al perfil farmacológico de los inhibidores selectivos de subtipos de PI3K, se pudo observar que, los neutrófilos de donadores sanos, tanto fumadores como no fumadores, y de pacientes EPOC estable, disminuían la migración tras ser tratados con todos los inhibidores (Figura 33 y 34). En el caso de los neutrófilos de pacientes con EPOC severa de inicio temprana solo lograban disminuir la migración celular inducida por fMLP, las dosis más altas empleadas de los inhibidores selectivos de subtipos de PI3K (Figura 35A). Sin embargo, la adición del inhibidor de PI3K $\delta$  (5nM) a RNO (0,1nM-1 $\mu$ M) redujo significativamente la migración celular, mientras que, la combinación del inhibidor de PI3K $\delta$  y RNO (1 $\mu$ M) demostró efectos aditivos *vs* la monoterapia.

En resumen, tal como han descrito otros autores, la combinación de inhibidores de PDE4 y PI3K $\delta$  tiene un efecto importante en la disminución de la respuesta inflamatoria neutrofílica, en concreto en parámetros asociados a la progresión de la EPOC. Este trabajo pone de manifiesto que dicha combinación es efectiva en pacientes con neutrófilos sobreactivados, en concreto en pacientes con EPOC severa de inicio temprano. Todo ello, presenta una gran ventana terapéutica para el tratamiento de los fenotipos más agresivos de la EPOC, abriendo el campo de la investigación para el desarrollo de nuevos abordajes que mejoren la vida de este tipo de pacientes [113]. Sin embargo, si dicho tratamiento también podría reducir la remodelación de las vías aéreas, la disminución progresiva del FEV1 y/o el riesgo de mortalidad asociada en estos pacientes, aún no ha sido estudiado.

## **6. CONCLUSIONES**



1. Los inhibidores PDE4 y PDE5 revierten la transición epitelial mesenquimal, el estrés en el retículo endoplasmático y la UPR, además de, mejorar la supervivencia en células epitelial-alveolares primarias de tipo II. Su combinación ejerce efectos aditivos beneficiosos sobre estos mecanismos.
2. Los inhibidores de PDE4 y PDE5 disminuyen el proceso de diferenciación de fibrocitos a miofibroblastos y la migración celular. La combinación de ambos inhibidores muestra efectos anti-fibróticos aditivos sobre la diferenciación de fibrocitos a miofibroblastos.
3. La combinación de inhibidores PDE4 y PDE5 presenta efectos prometedores en los principales procesos moleculares de la FPI, pudiendo ser una nueva diana terapéutica para el tratamiento de esta enfermedad.
4. Los inhibidores de PDE4 y PI3K reducen la migración de los neutrófilos aislados de pacientes con fenotipo EPOC severa, como la EPOC severa de inicio temprano. La combinación de inhibidores de PDE4 con inhibidores de PI3K $\delta$  demuestra efectos aditivos.
5. Los inhibidores de PDE4 y PI3K reducen la generación de elastasa neutrofílica, IL-8 y moléculas ROS en pacientes con EPOC severa. La combinación de inhibidores PDE4 y PI3K $\delta$  aporta efectos aditivos, mejorando el fenotipo súper-activo de los neutrófilos de EPOC severa.
6. La combinación de inhibidores PDE4 y PI3K $\delta$  potencia los efectos antiinflamatorios de la EPOC severa, pudiendo ser una alternativa al tratamiento con corticoides.



## **7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**



1. Contreras, S., et al., *Selective inhibition of phosphodiesterases 4A, B, C and D isoforms in chronic respiratory diseases: current and future evidences*. Curr Pharm Des, 2017.
2. Soto, F.J. and N.A. Hanania, *Selective phosphodiesterase-4 inhibitors in chronic obstructive lung disease*. Curr Opin Pulm Med, 2005. **11**(2): p. 129-34.
3. Torphy, T.J., *Phosphodiesterase isozymes: molecular targets for novel antiasthma agents*. Am J Respir Crit Care Med, 1998. **157**(2): p. 351-70.
4. Page, C.P. and D. Spina, *Phosphodiesterase inhibitors in the treatment of inflammatory diseases*. Handb Exp Pharmacol, 2011(204): p. 391-414.
5. Press, N.J. and K.H. Banner, *PDE4 inhibitors - a review of the current field*. Prog Med Chem, 2009. **47**: p. 37-74.
6. Jin, S.L., S.L. Ding, and S.C. Lin, *Phosphodiesterase 4 and its inhibitors in inflammatory diseases*. Chang Gung Med J, 2012. **35**(3): p. 197-210.
7. Souness, J.E., D. Aldous, and C. Sargent, *Immunosuppressive and anti-inflammatory effects of cyclic AMP phosphodiesterase (PDE) type 4 inhibitors*. Immunopharmacology, 2000. **47**(2-3): p. 127-62.
8. Avdeev, S.N., *[Idiopathic pulmonary fibrosis: A new paradigm]*. Ter Arkh, 2017. **89**(1): p. 112-122.
9. Vasakova, M. and R. Matej, *[Idiopathic pulmonary fibrosis - news in multidisciplinary diagnostic and therapeutic approaches]*. Cesk Patol, 2016. **52**(2): p. 85-92.
10. Bjoraker, J.A., et al., *Prognostic significance of histopathologic subsets in idiopathic pulmonary fibrosis*. Am J Respir Crit Care Med, 1998. **157**(1): p. 199-203.
11. Nicholson, A.G., *Classification of idiopathic interstitial pneumonias: making sense of the alphabet soup*. Histopathology, 2002. **41**(5): p. 381-91.
12. Crystal, R.G., et al., *Idiopathic pulmonary fibrosis. Clinical, histologic, radiographic, physiologic, scintigraphic, cytologic, and biochemical aspects*. Ann Intern Med, 1976. **85**(6): p. 769-88.
13. Keogh, B.A. and R.G. Crystal, *Alveolitis: the key to the interstitial lung disorders*. Thorax, 1982. **37**(1): p. 1-10.
14. Selman, M., et al., *Idiopathic pulmonary fibrosis: prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy*. Ann Intern Med, 2001. **134**(2): p. 136-51.
15. Maher, T.M., A.U. Wells, and G.J. Laurent, *Idiopathic pulmonary fibrosis: multiple causes and multiple mechanisms?* Eur Respir J, 2007. **30**(5): p. 835-9.
16. Strieter, R.M. and B. Mehrad, *New mechanisms of pulmonary fibrosis*. Chest, 2009. **136**(5): p. 1364-1370.
17. Almudever, P., et al., *Role of tetrahydrobiopterin in pulmonary vascular remodelling associated with pulmonary fibrosis*. Thorax, 2013. **68**(10): p. 938-48.

18. Nataraj, D., A. Ernst, and R. Kalluri, *Idiopathic pulmonary fibrosis is associated with endothelial to mesenchymal transition*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2010. **43**(2): p. 129-30.
19. Corrin, B., et al., *Fine structural changes in cryptogenic fibrosing alveolitis and asbestosis*. J Pathol, 1985. **147**(2): p. 107-19.
20. Kuhn, C., 3rd, et al., *An immunohistochemical study of architectural remodeling and connective tissue synthesis in pulmonary fibrosis*. Am Rev Respir Dis, 1989. **140**(6): p. 1693-703.
21. McDonald, J.A., *Idiopathic pulmonary fibrosis. A paradigm for lung injury and repair*. Chest, 1991. **99**(3 Suppl): p. 87S-93S.
22. Strieter, R.M., *Pathogenesis and natural history of usual interstitial pneumonia: the whole story or the last chapter of a long novel*. Chest, 2005. **128**(5 Suppl 1): p. 526S-532S.
23. Wallace, W.A., et al., *Inflammation-associated remodelling and fibrosis in the lung - a process and an end point*. Int J Exp Pathol, 2007. **88**(2): p. 103-10.
24. Mehrad, B., M.D. Burdick, and R.M. Strieter, *Fibrocyte CXCR4 regulation as a therapeutic target in pulmonary fibrosis*. Int J Biochem Cell Biol, 2009. **41**(8-9): p. 1708-18.
25. Moore, B.B., et al., *CCR2-mediated recruitment of fibrocytes to the alveolar space after fibrotic injury*. Am J Pathol, 2005. **166**(3): p. 675-84.
26. Phillips, R.J., et al., *Circulating fibrocytes traffic to the lungs in response to CXCL12 and mediate fibrosis*. J Clin Invest, 2004. **114**(3): p. 438-46.
27. Strieter, R.M. and B. Mehrad, *New mechanisms of pulmonary fibrosis*. Chest, 2009. **136**(5): p. 1364-70.
28. Bucala, R., et al., *Circulating fibrocytes define a new leukocyte subpopulation that mediates tissue repair*. Mol Med, 1994. **1**(1): p. 71-81.
29. Epperly, M.W., et al., *Bone marrow origin of myofibroblasts in irradiation pulmonary fibrosis*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2003. **29**(2): p. 213-24.
30. Hashimoto, N., et al., *Bone marrow-derived progenitor cells in pulmonary fibrosis*. J Clin Invest, 2004. **113**(2): p. 243-52.
31. Hong, K.M., et al., *Differentiation of human circulating fibrocytes as mediated by transforming growth factor-beta and peroxisome proliferator-activated receptor gamma*. J Biol Chem, 2007. **282**(31): p. 22910-20.
32. Wolters, P.J., H.R. Collard, and K.D. Jones, *Pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis*. Annu Rev Pathol, 2014. **9**: p. 157-79.
33. Tanjore, H., T.S. Blackwell, and W.E. Lawson, *Emerging evidence for endoplasmic reticulum stress in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2012. **302**(8): p. L721-9.
34. Lenna, S. and M. Trojanowska, *The role of endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response in fibrosis*. Curr Opin Rheumatol, 2012. **24**(6): p. 663-8.
35. Cha, S.I., et al., *Cleaved cytokeratin-18 is a mechanistically informative biomarker in idiopathic pulmonary fibrosis*. Respir Res, 2012. **13**: p. 105.

36. Dobashi, N., et al., *Elevation of anti-cytokeratin 18 antibody and circulating cytokeratin 18: anti-cytokeratin 18 antibody immune complexes in sera of patients with idiopathic pulmonary fibrosis*. Lung, 2000. **178**(3): p. 171-9.
37. Zhong, Q., et al., *Role of endoplasmic reticulum stress in epithelial-mesenchymal transition of alveolar epithelial cells: effects of misfolded surfactant protein*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2011. **45**(3): p. 498-509.
38. Hamman, L. and A.R. Rich, *Fulminating Diffuse Interstitial Fibrosis of the Lungs*. Trans Am Clin Climatol Assoc, 1935. **51**: p. 154-63.
39. Katzenstein, A.L. and J.L. Myers, *Idiopathic pulmonary fibrosis: clinical relevance of pathologic classification*. Am J Respir Crit Care Med, 1998. **157**(4 Pt 1): p. 1301-15.
40. *American Thoracic Society. Idiopathic pulmonary fibrosis: diagnosis and treatment. International consensus statement. American Thoracic Society (ATS), and the European Respiratory Society (ERS)*. Am J Respir Crit Care Med, 2000. **161**(2 Pt 1): p. 646-64.
41. Raghu, G., et al., *An official ATS/ERS/JRS/ALAT statement: idiopathic pulmonary fibrosis: evidence-based guidelines for diagnosis and management*. Am J Respir Crit Care Med, 2011. **183**(6): p. 788-824.
42. Ley, B. and H.R. Collard, *Epidemiology of idiopathic pulmonary fibrosis*. Clin Epidemiol, 2013. **5**: p. 483-92.
43. Gribbin, J., et al., *Incidence and mortality of idiopathic pulmonary fibrosis and sarcoidosis in the UK*. Thorax, 2006. **61**(11): p. 980-5.
44. Nalysnyk, L., et al., *Incidence and prevalence of idiopathic pulmonary fibrosis: review of the literature*. Eur Respir Rev, 2012. **21**(126): p. 355-61.
45. Ley, B., H.R. Collard, and T.E. King, Jr., *Clinical course and prediction of survival in idiopathic pulmonary fibrosis*. Am J Respir Crit Care Med, 2011. **183**(4): p. 431-40.
46. Hutchinson, J., et al., *Global incidence and mortality of idiopathic pulmonary fibrosis: a systematic review*. Eur Respir J, 2015. **46**(3): p. 795-806.
47. Moeller, A., et al., *Circulating fibrocytes are an indicator of poor prognosis in idiopathic pulmonary fibrosis*. Am J Respir Crit Care Med, 2009. **179**(7): p. 588-94.
48. Demedts, M., et al., *High-dose acetylcysteine in idiopathic pulmonary fibrosis*. N Engl J Med, 2005. **353**(21): p. 2229-42.
49. Nakayama, S., et al., *Pirfenidone inhibits the expression of HSP47 in TGF-beta1-stimulated human lung fibroblasts*. Life Sci, 2008. **82**(3-4): p. 210-7.
50. Conte, E., et al., *Effect of pirfenidone on proliferation, TGF-beta-induced myofibroblast differentiation and fibrogenic activity of primary human lung fibroblasts*. Eur J Pharm Sci, 2014. **58**: p. 13-9.
51. Di Sario, A., et al., *Effect of pirfenidone on rat hepatic stellate cell proliferation and collagen production*. J Hepatol, 2002. **37**(5): p. 584-91.

52. Azuma, A., et al., *Double-blind, placebo-controlled trial of pirfenidone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis*. Am J Respir Crit Care Med, 2005. **171**(9): p. 1040-7.
53. Taniguchi, H., et al., *Pirfenidone in idiopathic pulmonary fibrosis*. Eur Respir J, 2010. **35**(4): p. 821-9.
54. Noble, P.W., et al., *Pirfenidone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis (CAPACITY): two randomised trials*. Lancet, 2011. **377**(9779): p. 1760-9.
55. Daniels, C.E., et al., *Imatinib treatment for idiopathic pulmonary fibrosis: Randomized placebo-controlled trial results*. Am J Respir Crit Care Med, 2010. **181**(6): p. 604-10.
56. Richeldi, L., et al., *Efficacy of a tyrosine kinase inhibitor in idiopathic pulmonary fibrosis*. N Engl J Med, 2011. **365**(12): p. 1079-87.
57. Margaritopoulos, G.A., E. Vasarmidi, and K.M. Antoniou, *Pirfenidone in the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis: an evidence-based review of its place in therapy*. Core Evid, 2016. **11**: p. 11-22.
58. Garnock-Jones, K.P., *Roflumilast: A Review in COPD*. Drugs, 2015. **75**(14): p. 1645-56.
59. Cortijo, J., et al., *Roflumilast, a phosphodiesterase 4 inhibitor, alleviates bleomycin-induced lung injury*. Br J Pharmacol, 2009. **156**(3): p. 534-44.
60. Togo, S., et al., *PDE4 inhibitors roflumilast and rolipram augment PGE2 inhibition of TGF- $\beta$ 1-stimulated fibroblasts*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2009. **296**(6): p. L959-69.
61. Dunkern, T.R., et al., *Inhibition of TGF- $\beta$  induced lung fibroblast to myofibroblast conversion by phosphodiesterase inhibiting drugs and activators of soluble guanylyl cyclase*. Eur J Pharmacol, 2007. **572**(1): p. 12-22.
62. Kolosionek, E., et al., *Expression and activity of phosphodiesterase isoforms during epithelial mesenchymal transition: the role of phosphodiesterase 4*. Mol Biol Cell, 2009. **20**(22): p. 4751-65.
63. Nio, Y., et al., *Phosphodiesterase 4 inhibitor and phosphodiesterase 5 inhibitor combination therapy has antifibrotic and anti-inflammatory effects in mdx mice with Duchenne muscular dystrophy*. FASEB J, 2017.
64. Vyas-Read, S., et al., *Nitric oxide attenuates epithelial-mesenchymal transition in alveolar epithelial cells*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2007. **293**(1): p. L212-21.
65. Idiopathic Pulmonary Fibrosis Clinical Research, N., et al., *A controlled trial of sildenafil in advanced idiopathic pulmonary fibrosis*. N Engl J Med, 2010. **363**(7): p. 620-8.
66. Han, M.K., et al., *Sildenafil preserves exercise capacity in patients with idiopathic pulmonary fibrosis and right-sided ventricular dysfunction*. Chest, 2013. **143**(6): p. 1699-708.
67. Bousquet, J., R. Dahl, and N. Khaltaev, *Global alliance against chronic respiratory diseases*. Allergy, 2007. **62**(3): p. 216-23.

68. Hess, M.W., *The 2017 Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease Report and Practice Implications for the Respiratory Therapist*. Respir Care, 2017.
69. Spyrtos, D., D. Chloros, and L. Sichletidis, *Diagnosis of chronic obstructive pulmonary disease in the primary care setting*. Hippokratia, 2012. **16**(1): p. 17-22.
70. Pauwels, R.A. and K.F. Rabe, *Burden and clinical features of chronic obstructive pulmonary disease (COPD)*. Lancet, 2004. **364**(9434): p. 613-20.
71. Johannessen, A., et al., *Post-bronchodilator spirometry reference values in adults and implications for disease management*. Am J Respir Crit Care Med, 2006. **173**(12): p. 1316-25.
72. Foreman, M.G., et al., *Early-onset chronic obstructive pulmonary disease is associated with female sex, maternal factors, and African American race in the COPD Gene Study*. Am J Respir Crit Care Med, 2011. **184**(4): p. 414-20.
73. Rennard, S.I. and M.B. Drummond, *Early chronic obstructive pulmonary disease: definition, assessment, and prevention*. Lancet, 2015. **385**(9979): p. 1778-88.
74. Hogg, J.C., et al., *The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease*. N Engl J Med, 2004. **350**(26): p. 2645-53.
75. Leach, C., G.L. Colice, and A. Luskin, *Particle size of inhaled corticosteroids: does it matter?* J Allergy Clin Immunol, 2009. **124**(6 Suppl): p. S88-93.
76. Tashkin, D.P., et al., *A 4-year trial of tiotropium in chronic obstructive pulmonary disease*. N Engl J Med, 2008. **359**(15): p. 1543-54.
77. Yanai, M., et al., *Site of airway obstruction in pulmonary disease: direct measurement of intrabronchial pressure*. J Appl Physiol (1985), 1992. **72**(3): p. 1016-23.
78. Rabe, K.F., et al., *Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary*. Am J Respir Crit Care Med, 2007. **176**(6): p. 532-55.
79. Decramer, M., W. Janssens, and M. Miravittles, *Chronic obstructive pulmonary disease*. Lancet, 2012. **379**(9823): p. 1341-51.
80. Rahman, I., *Oxidative stress in pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease: cellular and molecular mechanisms*. Cell Biochem Biophys, 2005. **43**(1): p. 167-88.
81. Barnes, P.J., *Chronic obstructive pulmonary disease \* 12: New treatments for COPD*. Thorax, 2003. **58**(9): p. 803-8.
82. Thorley, A.J. and T.D. Tetley, *Pulmonary epithelium, cigarette smoke, and chronic obstructive pulmonary disease*. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis, 2007. **2**(4): p. 409-28.
83. Gorska, K., M. Maskey-Warzechowska, and R. Krenke, *Airway inflammation in chronic obstructive pulmonary disease*. Curr Opin Pulm Med, 2010. **16**(2): p. 89-96.

84. Di Stefano, A., A. Capelli, and C.F. Donner, *Role of interleukin-8 in the pathogenesis and treatment of COPD*. Chest, 2004. **126**(3): p. 676-8.
85. Nocker, R.E., et al., *Interleukin-8 in airway inflammation in patients with asthma and chronic obstructive pulmonary disease*. Int Arch Allergy Immunol, 1996. **109**(2): p. 183-91.
86. Salvi, S.S. and P.J. Barnes, *Chronic obstructive pulmonary disease in non-smokers*. Lancet, 2009. **374**(9691): p. 733-43.
87. Lopez, A.D., et al., *Chronic obstructive pulmonary disease: current burden and future projections*. Eur Respir J, 2006. **27**(2): p. 397-412.
88. Mathers, C.D. and D. Loncar, *Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030*. PLoS Med, 2006. **3**(11): p. e442.
89. Soriano, J.B. and B. Lamprecht, *Chronic obstructive pulmonary disease: a worldwide problem*. Med Clin North Am, 2012. **96**(4): p. 671-80.
90. Fukuchi, Y., et al., *COPD in Japan: the Nippon COPD Epidemiology study*. Respirology, 2004. **9**(4): p. 458-65.
91. Halbert, R.J., et al., *Global burden of COPD: systematic review and meta-analysis*. Eur Respir J, 2006. **28**(3): p. 523-32.
92. Buist, A.S., et al., *International variation in the prevalence of COPD (the BOLD Study): a population-based prevalence study*. Lancet, 2007. **370**(9589): p. 741-50.
93. Menezes, A.M., et al., *Chronic obstructive pulmonary disease in five Latin American cities (the PLATINO study): a prevalence study*. Lancet, 2005. **366**(9500): p. 1875-81.
94. Adeloje, D., et al., *Global and regional estimates of COPD prevalence: Systematic review and meta-analysis*. J Glob Health, 2015. **5**(2): p. 020415.
95. Jemal, A., et al., *Trends in the leading causes of death in the United States, 1970-2002*. JAMA, 2005. **294**(10): p. 1255-9.
96. van Noord, J.A., et al., *Effects of tiotropium with and without formoterol on airflow obstruction and resting hyperinflation in patients with COPD*. Chest, 2006. **129**(3): p. 509-17.
97. Dougherty, J.A., B.L. Didur, and L.S. Aboussouan, *Long-acting inhaled beta 2-agonists for stable COPD*. Ann Pharmacother, 2003. **37**(9): p. 1247-55.
98. Disse, B., et al., *Tiotropium (Spiriva): mechanistical considerations and clinical profile in obstructive lung disease*. Life Sci, 1999. **64**(6-7): p. 457-64.
99. Zhou, Y., et al., *Positive benefits of theophylline in a randomized, double-blind, parallel-group, placebo-controlled study of low-dose, slow-release theophylline in the treatment of COPD for 1 year*. Respirology, 2006. **11**(5): p. 603-10.
100. Spencer, S., et al., *Impact of preventing exacerbations on deterioration of health status in COPD*. Eur Respir J, 2004. **23**(5): p. 698-702.
101. O'Donnell, R.A., et al., *Relationship between peripheral airway dysfunction, airway obstruction, and neutrophilic inflammation in COPD*. Thorax, 2004. **59**(10): p. 837-42.

102. Contreras, S., et al., *Selective Inhibition of Phosphodiesterases 4A, B, C and D Isoforms in Chronic Respiratory Diseases: Current and Future Evidences*. *Curr Pharm Des*, 2017. **23**(14): p. 2073-2083.
103. Cortijo Gimeno, J. and E. Morcillo Sanchez, *[Pharmacological profile of roflumilast]*. *Arch Bronconeumol*, 2010. **46 Suppl 10**: p. 19-24.
104. Milara, J., et al., *Neutrophil activation in severe, early-onset COPD patients versus healthy non-smoker subjects in vitro: effects of antioxidant therapy*. *Respiration*, 2012. **83**(2): p. 147-58.
105. Ferguson, G.J., et al., *PI(3)Kgamma has an important context-dependent role in neutrophil chemokinesis*. *Nat Cell Biol*, 2007. **9**(1): p. 86-91.
106. Martin, E.L., et al., *Phosphoinositide-3 kinase gamma activity contributes to sepsis and organ damage by altering neutrophil recruitment*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2010. **182**(6): p. 762-73.
107. Ong, E., et al., *Role of phosphatidylinositol 3-kinase-gamma in mediating lung neutrophil sequestration and vascular injury induced by E. coli sepsis*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2005. **289**(6): p. L1094-103.
108. Heit, B., et al., *PI3K accelerates, but is not required for, neutrophil chemotaxis to fMLP*. *J Cell Sci*, 2008. **121**(Pt 2): p. 205-14.
109. Yoo, S.K., et al., *Differential regulation of protrusion and polarity by PI3K during neutrophil motility in live zebrafish*. *Dev Cell*, 2010. **18**(2): p. 226-36.
110. Condliffe, A.M., et al., *Sequential activation of class IB and class IA PI3K is important for the primed respiratory burst of human but not murine neutrophils*. *Blood*, 2005. **106**(4): p. 1432-40.
111. Kulkarni, S., et al., *PI3Kbeta plays a critical role in neutrophil activation by immune complexes*. *Sci Signal*, 2011. **4**(168): p. ra23.
112. To, Y., et al., *Targeting phosphoinositide-3-kinase-delta with theophylline reverses corticosteroid insensitivity in chronic obstructive pulmonary disease*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2010. **182**(7): p. 897-904.
113. Dinavahi, S.S., et al., *Combined inhibition of PDE4 and PI3Kdelta modulates the inflammatory component involved in the progression of chronic obstructive pulmonary disease*. *Drug Res (Stuttg)*, 2014. **64**(4): p. 214-9.
114. Hatzelmann, A. and C. Schudt, *Anti-inflammatory and immunomodulatory potential of the novel PDE4 inhibitor roflumilast in vitro*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2001. **297**(1): p. 267-79.
115. Bethke, T.D., et al., *Dose-proportional intraindividual single- and repeated-dose pharmacokinetics of roflumilast, an oral, once-daily phosphodiesterase 4 inhibitor*. *J Clin Pharmacol*, 2007. **47**(1): p. 26-36.
116. Milligan, P.A., S.F. Marshall, and M.O. Karlsson, *A population pharmacokinetic analysis of sildenafil citrate in patients with erectile dysfunction*. *Br J Clin Pharmacol*, 2002. **53 Suppl 1**: p. 45S-52S.
117. Milara, J., et al., *Sphingosine-1-phosphate is increased in patients with idiopathic pulmonary fibrosis and mediates epithelial to mesenchymal transition*. *Thorax*, 2012. **67**(2): p. 147-56.

118. Kasai, H., et al., *TGF-beta1 induces human alveolar epithelial to mesenchymal cell transition (EMT)*. Respir Res, 2005. **6**: p. 56.
119. Bozyk, P.D. and B.B. Moore, *Prostaglandin E2 and the pathogenesis of pulmonary fibrosis*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2011. **45**(3): p. 445-52.
120. Willis, B.C. and Z. Borok, *TGF-beta-induced EMT: mechanisms and implications for fibrotic lung disease*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2007. **293**(3): p. L525-34.
121. Willis, B.C., et al., *Induction of epithelial-mesenchymal transition in alveolar epithelial cells by transforming growth factor-beta1: potential role in idiopathic pulmonary fibrosis*. Am J Pathol, 2005. **166**(5): p. 1321-32.
122. Xu, J., S. Lamouille, and R. Derynck, *TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition*. Cell Res, 2009. **19**(2): p. 156-72.
123. Cutroneo, K.R., *TGF-beta-induced fibrosis and SMAD signaling: oligo decoys as natural therapeutics for inhibition of tissue fibrosis and scarring*. Wound Repair Regen, 2007. **15 Suppl 1**: p. S54-60.
124. Mehrad, B., et al., *Circulating peripheral blood fibrocytes in human fibrotic interstitial lung disease*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. **353**(1): p. 104-8.
125. Andersson-Sjoland, A., et al., *Fibrocytes are a potential source of lung fibroblasts in idiopathic pulmonary fibrosis*. Int J Biochem Cell Biol, 2008. **40**(10): p. 2129-40.
126. Xu, J., et al., *Role of the SDF-1/CXCR4 axis in the pathogenesis of lung injury and fibrosis*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2007. **37**(3): p. 291-9.
127. Hatzelmann, A., et al., *The preclinical pharmacology of roflumilast--a selective, oral phosphodiesterase 4 inhibitor in development for chronic obstructive pulmonary disease*. Pulm Pharmacol Ther, 2010. **23**(4): p. 235-56.
128. Sanz, M.J., J. Cortijo, and E.J. Morcillo, *PDE4 inhibitors as new anti-inflammatory drugs: effects on cell trafficking and cell adhesion molecules expression*. Pharmacol Ther, 2005. **106**(3): p. 269-97.
129. Giembycz, M.A. and S.K. Field, *Roflumilast: first phosphodiesterase 4 inhibitor approved for treatment of COPD*. Drug Des Devel Ther, 2010. **4**: p. 147-58.
130. Giembycz, M.A. and R. Newton, *Harnessing the clinical efficacy of phosphodiesterase 4 inhibitors in inflammatory lung diseases: dual-selective phosphodiesterase inhibitors and novel combination therapies*. Handb Exp Pharmacol, 2011(204): p. 415-46.
131. Spina, D., *PDE4 inhibitors: current status*. Br J Pharmacol, 2008. **155**(3): p. 308-15.
132. Wedzicha, J.A., P.M. Calverley, and K.F. Rabe, *Roflumilast: a review of its use in the treatment of COPD*. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis, 2016. **11**: p. 81-90.
133. Ngkelo, A. and I.M. Adcock, *New treatments for COPD*. Curr Opin Pharmacol, 2013. **13**(3): p. 362-9.
134. Rahman, I., *The role of oxidative stress in the pathogenesis of COPD: implications for therapy*. Treat Respir Med, 2005. **4**(3): p. 175-200.

135. Milara, J., et al., *Roflumilast N-oxide reverses corticosteroid resistance in neutrophils from patients with chronic obstructive pulmonary disease*. J Allergy Clin Immunol, 2014. **134**(2): p. 314-22.



## **8. ABREVIATURAS**



- **6MW** Test de la marcha de seis minutos
- **AMPc** Adenosín monofosfato cíclico
- **$\alpha$ -SMA**  $\alpha$ -actina de músculo liso
- **BSA** Albúmina de suero bovino
- **CEA** Células epitelial-alveolares
- **COL I** Colágeno tipo 1
- **DMEM** Dulbecco's Modified Eagle Medium
- **DMSO** Dimetilsulfóxido
- **EDTA** Ácido etilendiaminotetraacético
- **EPI** Enfermedades pulmonares intersticiales
- **EPOC** Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
- **FBS** Suero fetal bovino
- **fMLP** N-formyl-Met-Leu-Phe
- **FEV1** Volumen espirado máximo en el primer segundo de espiración
- **FPI** Fibrosis pulmonar idiopática
- **FVC** Capacidad vital forzada
- **Fc $\gamma$ R** Receptor Fc $\gamma$
- **GAPDH** Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
- **GMPc** Guanosín monofosfato cíclico
- **IF** Inmunofluorescencia
- **IL** Interleuquina
- **IFN- $\gamma$**  Interferón gamma
- **LPS** Lipopolisacárido
- **LTB4** Leucotrieno B4

- **MEC** Matriz extracelular
- **MB** Membrana basal
- **MMP-9** Metaloproteinasa 9
- **NAC** N-acetil L-cisteína
- **NO** Óxido nítrico
- **NOS** Óxido nítrico sintasa
- **OMS** Organización mundial de la salud
- **PBS** Tampón fosfato salino
- **PI3K** Fosfatidilinositol quinasa-3
- **PIP2** Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato
- **PIP3** Fosfatidilinositol (3,4,5) trifosfato
- **PBMC** Células mononucleares de sangre periférica
- **PDE** Fosfodiesterasas
- **RE** Retículo endoplasmático
- **ROS** Especies de oxígeno reactivo
- **RNO** Roflumilast N-óxido
- **SPC** Proteína surfactante C
- **TGF** Factor de crecimiento transformante
- **TEM** Transición epitelio-mesenquimal
- **UPR** Respuesta a proteínas mal plegadas

## **-ANEXO 1-**

Aprobación del comité ético y modelo de consentimiento  
informado de estudio con pacientes



## APROBACIÓN PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN

### - ANEXO 11 -

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

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

Acuerda respecto a esta documentación:

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

Los miembros que evaluaron esta documentación:

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

Consorcio Hospital General Universitario de Valencia

Comité Ético de Investigación Clínica

	Dr. Rafael Poveda	
	Dra. Inmaculada Sáez	X
	Dr. Alberto Berenguer	X
	Dra. Amparo Perez	
	Dña. Encarna Domingo	X
	Dra. Paloma Escobar	
	Dña. M <sup>a</sup> Dolores Navarro	
	Dra. Lucia Ciancotti	
Secretario	Dra. Ana Mínguez	X

Lo que comunico a efectos oportunos:

Fdo. Dr. Severiano Marín (Presidente CEIC)
