



VNIVERSITAT
ID VALÈNCIA

Doctorado en Biomedicina y Farmacia

Cristina Estornut Navarro

**ACTIVADORES DEL FACTOR DE
TRANSCRIPCIÓN NRF2
(FACTOR NUCLEAR
ERITROIDE 2)
EN EL TRATAMIENTO DE LA
ENFERMEDAD PULMONAR
OBSTRUCTIVA CRÓNICA**

Tesis Doctoral dirigida por:

Julio Cortijo Gimeno

Valencia, 2022

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA
DOCTORADO EN BIOMEDICINA Y FARMACIA



**ACTIVADORES DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN NRF2
(FACTOR NUCLEAR ERITROIDE 2) EN EL TRATAMIENTO DE
LA ENFERMEDAD PULMONAR OBSTRUCTIVA CRÓNICA**

TESIS DOCTORAL

Presentada por:

CRISTINA ESTORNUT NAVARRO

Dirigida por:

DR. D. JULIO CORTIJO GIMENO

VALÈNCIA, 2022



VNIVERSITATIS
VALÈNCIE

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

Certifica:

Que la Tesis Doctoral presentada por Doña Cristina Estornut Navarro, con el título:

“Activadores del factor de transcripción NRF2 (Factor Nuclear Eritroide 2) en el tratamiento de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica”

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

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

En València, septiembre de 2022.

Dr. Julio Cortijo Gimeno

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis que tenéis delante jamás en la vida podría haberla realizado sin la ayuda y apoyo de algunas personas, a las que me gustaría, con estas palabras, dar las gracias.

En primer lugar, me gustaría agradecer al Dr. Julio Cortijo la oportunidad que me dio de formar parte de su equipo y por confiar en mi para trabajar en proyectos de tan alto nivel. Pero, sobre todo por enseñarme no solo a nivel científico, sino a nivel personal y de la vida. Este proyecto, además, no hubiese sido posible sin las becas de investigación SAF2017-82913-R, CIBERES (CB06/06/0027) del Gobierno de España y Prometeo 2017/023/UV del Gobierno Regional de la Generalitat Valenciana.

Me gustaría dar las gracias también a la Dra. Celia Sanz por cuidarnos tanto y escuchar nuestros (bueno especialmente mis) mil y un problemas. Al Dr. Javier Milara por su gran sentido del humor y por animarnos siempre a continuar investigando y trabajando. Al Dr. Alfredo de Diego del servicio de neumología del Hospital Universitario y Politécnico de la Fe de Valencia por su gran colaboración.

A toda persona que haya compartido conmigo algún ratito de bancada, porque siempre he aprendido algo de cada uno. Pero, especialmente al **LABTEAM**, con mayúsculas y en negrita. Amparo, Anselm, Antonio, Bea, Inés, Martín, Paula, Pilar y Xavi. Gracias por reír, pero sobre todo, llorar conmigo. Por enseñarme a aprender y, también, a desaprender. Por ser apoyo e impulso en los momentos más duros, por compartir mis logros y olvidar rápidamente los fracasos. Por ayudarme a aprender de mis errores y no dejar que estos marcaran el camino. Este doctorado ha sido un viaje lleno de experiencias, emociones y vivencias, gracias por compartir este viaje conmigo.

También me gustaría agradecer a Ana, Eva, Musta y todo el equipo del animalario. Sin ellos/as gran parte de esta tesis no hubiese sido posible. Gracias por enseñarme tanto, por la inmensa paciencia y por estar siempre al pie del cañón conmigo.

Gracias a mis amigas/os. A los que comparten este mundo científico, por entenderme y dejarme compartir la carga. Y a los que ni siquiera entienden muy bien qué hago, precisamente por eso, por ser un soplo de aire fresco y ayudarme a restarle importancia a las cosas.

A Alberto por darle el toque artístico a esta tesis tan desinteresadamente.

A mi familia, toda la completo, por su apoyo indiscutible, por hacerme sentir siempre una ganadora y enseñarme que lo importante es de quien nos rodeamos.

A Aitor porque, a pesar de que ya no continua este viaje conmigo, estos dos últimos años ha sido mi calma en plena tempestad. Gracias.

Pero esta tesis, realmente, se la debo a tres personas.

A mi madre y mi padre porque sin ellos yo no hubiese podido llegar a donde he llegado. Gracias por ser siempre mi refugio y mi salvavidas. Por hacerme sentir que soy suficiente y que, si me lo propongo, puedo conseguir todo, pero que haga lo que haga ellos siempre estarán a mi lado y bien orgullosos.

A mi hermano, por ser fuerza cuando la mía flaqueaba, por abrirme los ojos en más de una ocasión y por nunca dejarme caminar sola. Gracias por ser un ejemplo a seguir y ser la persona que más cree en mí.

Gracias a todos y todas los que habéis colaborado en esta tesis experimental o sentimentalmente.

Os quiero.

A mi familia,

ÍNDICE

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS.....	17
ÍNDICE DE FIGURAS.....	19
ÍNDICE DE TABLAS.....	24
ABREVIATURAS.....	25
INTRODUCCIÓN.....	31
1. <i>Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica</i>	33
1.1 Definición.....	33
1.2 Epidemiología.....	34
1.2.1 Prevalencia.....	35
1.2.2 Morbilidad y Mortalidad.....	37
1.3 Presentación clínica.....	39
1.3.1 Exacerbaciones.....	40
1.3.2 Comorbilidades.....	41
1.3.3 Diagnóstico.....	43
1.3.4 Estadios.....	46
1.4 Factores de riesgo.....	46
1.4.1 Sustancias inhaladas.....	47
1.4.2 Genéticos.....	49
1.4.3 Género.....	50
1.4.4 Edad.....	50
1.4.5 Asma.....	50
1.4.6 Infecciones.....	51
1.4.7 Otros.....	51
1.5 Patología.....	52
1.6 Patogenia.....	53
1.6.1 Inflamación.....	54
1.6.2 Estrés oxidativo.....	63
1.6.3 Efectos del incremento del estrés oxidativo.....	65
1.7 Fisiopatología.....	69
1.8 Tratamiento clínico.....	72
1.8.1 Tratamiento farmacológico.....	73
1.9 Modelos animales.....	79
2. <i>Factor Nuclear Eritroide 2</i>	84
2.1 Estructura y función biológica.....	84
2.2 Relación de la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica con NRF2.....	88
HIPÓTESIS.....	91
OBJETIVOS.....	95
MATERIAL Y MÉTODOS.....	99
1. <i>Material</i>	101

1.1.	Reactivos utilizados	101
1.2	Estímulos	105
1.2.1	Humo de tabaco / Extracto humo tabaco.....	105
1.2.2	Lipopolisacárido	106
1.3	Fármacos ensayados.....	106
1.3.1	Electrofílicos.....	106
1.3.2	No electrofílicos	109
1.3.3	Antioxidantes naturales	110
1.3.4	Péptidos.....	112
1.3.5	Inhibidores PDE4.....	113
1.4	Muestras biológicas.....	115
1.4.1	Sangre periférica	115
1.4.2	Tejido pulmonar.....	116
1.5	Animales.....	117
2.	<i>Métodos</i>	119
2.1	Cultivos celulares.....	119
2.1.1	Líneas celulares inmortalizadas	119
2.1.2	Células primarias	120
2.2	Diseño experimental: estimulación in vitro con fármaco y EHT.....	123
2.2.1	Preparación Extracto Humo de Tabaco	123
2.2.2	Estimulación in vitro	124
2.3	Ensayo de viabilidad celular mediante MTT.....	124
2.4	Liberación de GSH mediante técnica luminiscencia	125
2.5	Detección de Especies Reactivas de Oxígeno	127
2.6	Inmunofluorescencia	129
2.7	Determinación de la apoptosis celular mediante citometría de flujo.....	129
2.8	Modelos animales.....	130
2.8.1	Inflamación pulmonar aguda por instilación intratraqueal de LPS.....	130
2.8.2	Modelo animal de exacerbación en la EPOC inducido por instilación de LPS y exposición a humo de tabaco.....	132
2.8.3	Preparación de fármacos y estímulos.....	134
2.9	Imagen IN VIVO: TC - IVIS	135
2.9.1	TC.....	135
2.9.2	IVIS - LUMINA X5 (Perkin-Elmer).....	136
2.10	Extracción de muestras: LBA y tejido.....	137
2.11	Recuento de células totales y diferenciadas en LBA	137
2.11.1	Células totales	138
2.11.2	Células diferenciadas	138
2.12	Expresión génica mediante qPCR	138
2.12.1	Extracción de ARN total y cuantificación	139
2.12.2	Transcripción reversa.....	140
2.12.3	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR)	141
2.13	Expresión proteica.....	144
2.13.1	Western blot.....	144
2.13.2	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)	147

2.14	Histología	149
2.14.1	Fijación y deshidratación de tejidos	149
2.14.2	Tinción hematoxilina eosina	149
2.14.3	Inmunohistoquímica	151
2.15	Presentación de datos y análisis estadístico	152
RESULTADOS		153
1.	<i>Expresión del sistema nrf2 en pacientes epoc</i>	155
1.1.	Neutrófilos periféricos	155
1.2.	Expresión de los genes implicados en la ruta NRF2.....	155
2.	<i>Determinación de glutatión</i>	159
2.1	Neutrofilos periféricos	159
2.2	Células epiteliales primarias	160
2.3	Fármacos activadores de NRF2 en células epiteliales bronquiales de línea.....	161
2.4	Fármacos activadores de NRF2 en células epiteliales bronquiales primarias	166
2.5	Fármacos activadores de NRF2 en células inflamatorias.....	171
3.	<i>Determinación de especies reactivas oxígeno</i>	173
3.1	Fármacos activadores de NRF2 en células epiteliales bronquiales de línea y primarias 173	
4.	<i>Expresión de genes antioxidantes por fármacos activadores de NRF2</i>	178
4.1	Células epiteliales bronquiales de línea.....	178
4.2	Células epiteliales primarias	181
4.3	Neutrófilos periféricos	186
5.	<i>Expresión proteínas antioxidantes por fármacos activadores de NRF2</i>	191
5.1	Células epiteliales de línea BEAS-2B.....	192
5.2	Células epiteliales primarias	194
6.	<i>Efecto antiinflamatorio de fármacos activadores de NRF2</i>	197
6.1	Interleucina 8	197
6.2	Metaloproteinasa 9.....	199
7.	<i>Inhibición de la muerte celular por los farmacos activadores NRF2</i>	202
7.1	Células epiteliales bronquiales de línea y primarias.....	202
8.	<i>Translocación al núcleo de NRF2</i>	207
8.1	Células epiteliales bronquiales de línea y primarias.....	208
9.	<i>Modelo murino de inflamación pulmonar aguda inducido por instilación intratraqueal de LPS</i> 211	
9.1	Validación del modelo murino de inflamación pulmonar aguda	211
9.2	Células totales y diferenciadas en LBA.....	212

9.3	Marcadores inflamatorios en el LBA y en parénquima pulmonar en el modelo murino de inflamación pulmonar aguda	214
9.4	Cambios histológicos generados en el modelo murino de inflamación pulmonar aguda	221
9.5	Efecto antioxidante en el modelo de inflamación pulmonar aguda.....	224
10.	<i>Modelo murino de exacerbación generado por la combinación de lps y humo de tabaco</i>	<i>231</i>
10.1	Validación del modelo murino inducido por la combinación de instilación intratraqueal de LPS y exposición a humo de tabaco	231
10.2	Células totales y diferenciadas en LBA	233
10.3	Marcadores inflamatorios en el LBA y en parénquima pulmonar en modelo murino de exacerbación	234
10.4	Cambios histológicos generados en el modelo murino de exacerbación.....	241
10.5	Cuantificación del tejido inflamatorio pulmonar con la técnica de imagen in vivo IVIS en el modelo de exacerbación.....	244
10.6	Efecto antioxidante en el modelo de exacerbación.....	246
	DISCUSIÓN	253
1.	<i>Expresión del sistema NRF2 en pacientes EPOC</i>	<i>255</i>
2.	<i>Evidencias in vitro sobre la eficacia de los fármacos en modelos celulares de estrés oxidativo</i>	<i>256</i>
3.	<i>Evidencias in vivo sobre la eficacia de los fármacos en modelos murinos de inflamación pulmonar aguda y de exacerbación de la EPOC</i>	<i>261</i>
	CONCLUSIONES	267
	BIBLIOGRAFÍA	271
	ANEXOS	318
	<i>Anexo I – Documentación comité ético de investigación clínica (CEIC) del Consorcio Hospital General Universitario de Valencia</i>	<i>320</i>
	<i>Anexo I – Documentación comité ético de la investigación con medicamentos (CEIm) del Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia</i>	<i>322</i>
	<i>Anexo II – Autorización procedimiento “Activation of Nuclear Factor Erythroid 2-related (Nrf2) system as an antioxidant therapy in COPD and ARDS patients: insights in human and animal models”</i>	<i>324</i>
	<i>Anexo III – Autorización procedimiento “Activación del Factor Nuclear Eritroide 2 (Nrf2) como terapia antioxidante en pacientes EPOC”</i>	<i>325</i>

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Obstrucción aérea en la EPOC.	34
Figura 2. Prevalencia de la EPOC (%) en los países europeos.	36
Figura 3. Tasa de mortalidad por EPOC.....	38
Figura 4. Efectos sistémicos de la EPOC.	42
Figura 5. Gráficos de espirometrías normal (izquierda) y de un paciente con enfermedad obstructiva (derecha).	45
Figura 6. Factores de riesgo que pueden contribuir a la EPOC.	47
Figura 7. Cambios patológicos observados en la EPOC.....	53
Figura 8. Patogenia en la EPOC..	54
Figura 9. Principales células implicadas en la respuesta inflamatoria de la EPOC y los mediadores inflamatorios liberados por éstas.....	57
Figura 10. Posibles vías y mecanismos del humo del tabaco en el desarrollo de la EPOC.	62
Figura 11. Diagrama de los efectos del estrés oxidativo generado por el humo de tabaco.....	69
Figura 12. Atrapamiento aéreo.	72
Figura 13. Imagen de sistema nose only (A) e imagen del sistema whole body (B)..	80
Figura 14. Ruta de activación de Nrf2 y sus genes diana.	87
Figura 15. Cigarrillos de investigación 1RF6 de la Universidad de Kentucky.	105
Figura 16. CDDO-Me activa Nrf2 y induce la respuesta antioxidante a la vez que inhibe NFκβ y disminuye la señal proinflamatoria.....	108
Figura 17. Estructura de los fármacos ensayados.	115
Figura 18. Morfología de las líneas celulares inmortalizadas utilizadas.	120
Figura 19. Morfología de las células epiteliales bronquiales humanas.....	121
Figura 20. Eritrocitos sedimentados una hora después de la mezcla con Dextrano 500.	121
Figura 21. Pasos en el aislamiento de neutrófilos.....	122
Figura 22. Bomba de respiración empleada para generar extracto de humo de tabaco.	124
Figura 23. Esquema general de la reacción ocurrida en el ensayo GSH-Glo™ Glutathione.....	125
Figura 24. Procotolo ensayo GSH-Glo™ Glutathione.	127
Figura 25. Esquema del modelo animal de daño pulmonar y exacerbación por LPS en ratones C57BL6/J.....	132
Figura 26. Sistema semiautomático de exposición pasiva al humo del tabaco de TSE systems ®	133
Figura 27. Esquema del modelo animal de exacerbación por LPS y exposición a humo de tabaco en ratones C57BL6/J.....	134
Figura 28. Diagrama de las etapas de la reacción de transcripción reversa.	141
Figura 29. Sistema TaqMan® de cuantificación fluorimétrica de la expresión génica.....	142
Figura 30. PCR a tiempo real.	144
Figura 31. Esquema de la técnica Western Blot.....	146
Figura 32. Esquema de la técnica ELISA de cuantificación de proteínas por inmuno-detección indirecta, en el que se describen las diferentes fases del proceso. Creado con BioRender.....	148
Figura 33. Recuento de neutrófilos en sangre de sujetos sanos y pacientes EPOC de distintos GOLD.	155

Figura 34. Expresión de genes de la ruta Nrf2 y antioxidantes en neutrófilos de sangre periférica de sujetos sanos y pacientes EPOC.....	156
Figura 35. Expresión de genes de la ruta NRF2 y antioxidantes en neutrófilos de sangre de voluntarios sanos y pacientes EPOC según GOLD.....	157
Figura 36. Expresión de genes de la ruta NRF2 y antioxidantes en parénquima pulmonar procedente de sujetos sanos y pacientes EPOC.....	158
Figura 37. La expresión de NRF2 en parénquima pulmonar y en los bronquiolos se encuentra disminuida en pacientes con EPOC en comparación a sujetos sanos.....	159
Figura 38. Niveles de GSH basales y tras estimularse con EHT 3% en neutrófilos de sangre periférica de sujetos sanos y pacientes EPOC.....	160
Figura 39. Niveles de GSH basales y tras estimularse con EHT 3% en células epiteliales bronquiales primarias de sanos y pacientes EPOC.	160
Figura 40. Niveles de GSH tras el tratamiento con los fármacos electrofílicos CDDO-Me y omaveloxolona y no electrofílico astemizol y la posterior estimulación con EHT 3% en células epiteliales bronquiales de línea.	162
Figura 41. Niveles de GSH tras el tratamiento con los compuestos peptídicos TAT-14, LK1-14 o LAS200813:8 y la posterior estimulación con EHT 3% en células epiteliales bronquiales de línea.	163
Figura 42. Niveles de GSH tras el tratamiento con los compuestos naturales BH4, aspalatina, taurina y obacunona y el inhibidor de PDE4 glaucina y la posterior estimulación con EHT 3% en células epiteliales bronquiales de línea.	165
Figura 43. Niveles de GSH tras el tratamiento con los compuestos CDDO-Me, omaveloxolona, el péptido LAS200813:8 y obacunona y posterior estimulación con EHT 3% en células epiteliales bronquiales primarias obtenidas de sujetos sanos.....	167
Figura 44. Niveles de GSH tras el tratamiento con los compuestos CDDO-Me, omaveloxolona, el péptido LAS200813:8 y obacunona y posterior estimulación con EHT 3% en células epiteliales bronquiales primarias obtenidas de pacientes EPOC.	169
Figura 45. Comparación de los efectos en los niveles de GSH de los fármacos seleccionados en células epiteliales bronquiales primarias de sujetos sanos y pacientes EPOC.....	170
Figura 46. Niveles de GSH tras el tratamiento con los compuestos CDDO-Me, omaveloxolona, el péptido LAS200813:8 y obacunona y posterior estimulación con EHT 3% en monocitos U937.	172
Figura 47. Niveles de ERO tras el tratamiento con los compuestos CDDO-Me, omaveloxolona, el péptido LAS200813:8 y obacunona y posterior estimulación con EHT 5% en BEAS-2B..	174
Figura 48. Niveles de ERO tras el tratamiento con los compuestos CDDO-Me, omaveloxolona, el péptido LAS200813:8 y obacunona y posterior estimulación con EHT 5% en células epiteliales bronquiales primarias obtenidas de sujetos sanos.....	174
Figura 49. Niveles de ERO tras el tratamiento con los compuestos CDDO-Me, omaveloxolona, el péptido LAS200813:8 y obacunona y posterior estimulación con EHT 5% en células epiteliales bronquiales primarias obtenidas de pacientes EPOC.	176
Figura 50. Comparación de los efectos en la inhibición de las ERO de los fármacos seleccionados en células epiteliales bronquiales primarias de sujetos sanos y pacientes EPOC.....	177
Figura 51. Los fármacos CDDO-Me, omaveloxolona, el péptido LAS200813:8 y el compuesto natural obacunona aumentan la expresión de NRF2 y de los genes antioxidantes NQO1, HO-1 y GPX-1 en células epiteliales bronquiales de línea.....	180

Figura 52. Los fármacos CDDO-Me, omaveloxolona, el péptido LAS200813:8 y el compuesto natural obacunona aumentan la expresión de NRF2 y de los genes antioxidantes NQO1 y HO-1 en células epiteliales bronquiales procedentes de sujetos sanos. 182

Figura 53. Los fármacos CDDO-Me, omaveloxolona, el péptido LAS200813:8 y el compuesto natural obacunona aumentan la expresión de NRF2 y de los genes antioxidantes NQO1 y HO-1 en células epiteliales bronquiales procedentes de pacientes EPOC..... 184

Figura 54. Comparación de los efectos en la inducción de la expresión del gen NQO1 en células epiteliales bronquiales primarias de sujetos sanos y pacientes EPOC..... 185

Figura 55. Comparación de los efectos en la inducción de la expresión del gen HO-1 en células epiteliales bronquiales primarias de sujetos sanos y pacientes EPOC..... 186

Figura 56. Los fármacos CDDO-Me, omaveloxolona, el péptido LAS200813:8 y el compuesto natural obacunona aumentan la expresión de los genes antioxidantes NQO1, HO-1 y GPX1 y del factor NRF2 en neutrófilos de sangre periférica procedentes de sujetos sanos. 188

Figura 57. Los fármacos CDDO-Me, omaveloxolona, el péptido LAS200813:8 y el compuesto natural obacunona aumentan la expresión de los genes antioxidantes NQO1, HO-1 y GPX1 y del factor NRF2 en neutrófilos de sangre periférica procedentes de pacientes EPOC..... 189

Figura 58. Comparación de los efectos en la inducción de la expresión del gen NQO1 en neutrófilos procedentes de sujetos sanos y pacientes EPOC. 190

Figura 59. Comparación de los efectos en la inducción de la expresión del gen HO-1 en neutrófilos procedentes de sujetos sanos y pacientes EPOC. 191

Figura 60. Los fármacos CDDO-Me, omaveloxolona, el péptido LAS200813:8 y el compuesto natural obacunona aumentan la expresión proteica de NQO1 y HO-1 en células epiteliales bronquiales de línea..... 193

Figura 61. Los fármacos CDDO-Me, omavexolona, LAS200813:8 y obacunona aumentan la expresión proteica de NQO1 y HO-1 en células epiteliales bronquiales primarias procedentes de sujetos sano..... 195

Figura 62. Los fármacos CDDO-Me, omavexolona, LAS200813:8 y obacunona aumentan la expresión proteica de NQO1 y HO-1 en células epiteliales bronquiales primarias procedentes de pacientes EPOC. 196

Figura 63. Liberación de interleucina IL-8 basal y tras la estimulación con EHT 3% en neutrófilos de sangre periférica de sujetos sanos y pacientes EPOC. 197

Figura 64. Liberación de metaloproteinasa MMP-9 basal y tras estimulación con EHT 3% en neutrófilos de sangre periférica de sujetos sanos y pacientes EPOC. 198

Figura 65. Los fármacos CDDO-Me, omavexolona, LAS200813:8 y obacunona disminuyen la liberación de interleucina IL-8 en neutrófilos de sangre periférica de sujetos sanos y pacientes EPOC..... 200

Figura 66. Los fármacos CDDO-Me, omavexolona, LAS200813:8 y obacunona disminuyen la liberación de proteasa MMP-9 en neutrófilos de sangre periférica de sujetos sanos y pacientes EPOC..... 201

Figura 67. El tratamiento con los compuestos CDDO-Me, omaveloxolona, el péptido LAS200813:8 y obacunona es capaz de inhibir el proceso de apoptosis generado por la estimulación con EHT 8.5% en BEAS-2B..... 204

Figura 68. El tratamiento con los compuestos CDDO-Me, omaveloxolona, el péptido LAS200813:8 y obacunona es capaz de inhibir el proceso de apoptosis generado por la estimulación con EHT 8.5% en células epiteliales bronquiales procedentes de sujetos sanos 205

Figura 69. El tratamiento con los compuestos CDDO-Me, omaveloxolona, el péptido LAS200813:8 y obacunona es capaz de inhibir el proceso de apoptosis generado por la estimulación con EHT 8.5% en células epiteliales bronquiales procedentes de pacientes EPOC.	206
Figura 70. El tratamiento con los compuestos CDDO-Me, omaveloxolona, el péptido LAS200813:8 y obacunona genera la translocación de NRF2 al núcleo en células epiteliales bronquiales de línea.....	208
Figura 71. El tratamiento con los compuestos CDDO-Me, omaveloxolona, el péptido LAS200813:8 y obacunona genera la translocación de NRF2 al núcleo en células epiteliales bronquiales procedentes de sujetos sanos.....	209
Figura 72. El tratamiento con los compuestos CDDO-Me, omaveloxolona, el péptido LAS200813:8 y obacunona genera la translocación de NRF2 al núcleo en células epiteliales bronquiales procedentes de pacientes EPOC.	210
Figura 73. Indicadores de la inflamación pulmonar como validación del modelo murino de inflamación pulmonar aguda.	212
Figura 74. Recuento de células inflamatorias totales en lavado broncoalveolar.	213
Figura 75. Recuento de células inflamatorias por tipo, macrófagos y neutrófilo.....	214
Figura 76. Liberación del marcador inflamatorio IL-6 en LBA del modelo murino de inflamación pulmonar aguda.	215
Figura 77. Expresión génica del marcador inflamatorio IL-6 en parénquima pulmonar del modelo murino de inflamación pulmonar aguda.....	216
Figura 78. Liberación del marcador inflamatorio CXCL15 en LBA del modelo murino de inflamación pulmonar aguda.	217
Figura 79. Expresión génica del marcador inflamatorio CXCL15 en parénquima pulmonar del modelo murino de inflamación pulmonar aguda.	218
Figura 80. Liberación del marcador inflamatorio TNF- α en LBA del modelo murino de inflamación pulmonar aguda.	219
Figura 81. Expresión génica del marcador inflamatorio TNF- α en parénquima pulmonar del modelo murino de inflamación pulmonar aguda.	220
Figura 82. Liberación del marcador inflamatorio IL-1 β en LBA del modelo murino de inflamación pulmonar aguda.	221
Figura 83. Los fármacos activadores de NRF2 mejoran los cambios histológicos en el parénquima pulmonar en el modelo murino de daño pulmonar agudo producidos por LPS.	223
Figura 84. Expresión génica de NRF2 en parénquima pulmonar aislado del modelo murino de inflamación pulmonar aguda.	225
Figura 85. Expresión génica de HO-1 en parénquima pulmonar aislado del modelo murino de inflamación pulmonar aguda.	226
Figura 86. Expresión proteica de HO-1 en parénquima pulmonar aislado del modelo murino de inflamación pulmonar aguda.	227
Figura 87. Expresión génica de NQO1 en parénquima pulmonar aislado del modelo murino de inflamación pulmonar aguda.	228
Figura 88. Expresión proteica de NQO1 en parénquima pulmonar aislado del modelo murino de inflamación pulmonar aguda.	229
Figura 89. Expresión génica de iNOS en parénquima pulmonar aislado del modelo murino de inflamación pulmonar aguda.	230

Figura 90. Indicadores de la inflamación pulmonar como validación del modelo murino exacerbación de la EPOC generado por LPS y humo de tabaco (HT).....	232
Figura 91. Recuento de células inflamatorias totales en lavado broncoalveolar.	233
Figura 92. Recuento de células inflamatorias por tipo, macrófagos y neutrófilo.	234
Figura 93. Liberación del marcador inflamatorio IL-6 en LBA del modelo murino de exacerbación de la EPOC.	235
Figura 94. Expresión génica del marcador inflamatorio IL-6 en parénquima pulmonar del modelo murino de exacerbación de la EPOC.	236
Figura 95. Liberación del marcador inflamatorio CXCL15 en LBA del modelo murino exacerbación de la EPOC.....	237
Figura 96. Expresión génica del marcador inflamatorio CXCL15 en parénquima pulmonar del modelo murino de exacerbación de la EPOC.	238
Figura 97. Liberación del marcador inflamatorio TNF- α en LBA del modelo murino de exacerbación de la EPOC.....	239
Figura 98. Expresión génica del marcador inflamatorio TNF- α en parénquima pulmonar del modelo murino de exacerbación de la EPOC.....	240
Figura 99. Liberación del marcador inflamatorio IL-1 β en LBA del modelo murino de exacerbación de la EPOC. El lavado broncoalveolar se aisló durante la necropsia de todos los grupos del modelo murino.....	241
Figura 100. Los fármacos activadores de NRF2 mejoran los cambios histológicos en el parénquima pulmonar en el modelo murino de exacerbación de la EPOC.....	243
Figura 102. Efectos de los fármacos en la progresión de la inflamación mediante análisis de imagen por TC e IVIS.	245
Figura 103. Expresión génica de NRF2 en parénquima pulmonar aislado del modelo murino de exacerbación de la EPOC.....	247
Figura 104. Expresión génica de HO-1 en parénquima pulmonar aislado del modelo murino de exacerbación de la EPOC.....	248
Figura 105. Expresión proteica de HO-1 en parénquima pulmonar aislado del modelo murino de exacerbación de la EPOC.....	249
Figura 106. Expresión génica de NQO1 en parénquima pulmonar aislado del modelo murino de exacerbación de la EPOC.	250
Figura 107. Expresión proteica de NQO1 en parénquima pulmonar aislado del modelo murino de exacerbación de la EPOC.....	251
Figura 108. Expresión génica de iNOS en parénquima pulmonar aislado del modelo murino de exacerbación de la EPOC.....	252

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de la gravedad de las alteraciones ventilatorias obstructivas.	44
Tabla 2. Clasificación GOLD de los estadios de la EPOC basada en la severidad de la limitación en el flujo aéreo.	46
Tabla 3. Patrón inflamatorio en los diferentes estadios de la EPOC.....	61
Tabla 4. Terapia farmacológica empleada actualmente en el tratamiento de pacientes con EPOC estable..	78
Tabla 5. Reactivos utilizados en la presente tesis	101
Tabla 6. Características clínicas de los sujetos control y los pacientes EPOC, clasificados de acuerdo las directrices GOLD.	116
Tabla 7. Clasificación de muestras según técnica donde se emplearon.	116
Tabla 8. Número de pacientes en tejido pulmonar	117
Tabla 9. Anticuerpos primario y secundario empleados en inmunofluorescencia.....	129
Tabla 10. Sondas de expresión Taqman humanas empleados en la RT-PCR.....	142
Tabla 11. Sondas de expresión Taqman de ratón empleados en la RT-PCR.	143
Tabla 12. Componentes de la PCR.	143
Tabla 13. Anticuerpos primarios y secundarios empleados en Western Blot.	147
Tabla 14. Protocolo de deshidratación de tejidos.....	149
Tabla 15. Protocolo de desparafinado e hidratación.	150
Tabla 16. Protocolo de deshidratación.	151
Tabla 17. Anticuerpo primario empleado en el ensayo inmunohistoquímico.....	152
Tabla 18. CE50 y máximo efecto de los fármacos testado como activadores de NRF2 en células epiteliales de línea.	166
Tabla 19. CE50 de los fármacos testado activadores de NRF2, los electrofílicos CDDO-Me y omaveloxolona, el péptido LAS200813:8 y el compuesto natural obacunona en células epiteliales primarias procedentes de sujetos sanos y pacientes EPOC.	170
Tabla 20. CE50 de los fármacos testado activadores de NRF2, los electrofílicos CDDO-Me y omaveloxolona, el péptido LAS200813:8 y el compuesto natural obacunona en monocitos U937.	173
Tabla 21. CI50 en los niveles de ERO de los fármacos activadores de NRF2, los electrofílicos CDDO-Me y omaveloxolona, el péptido LAS200813:8 y el compuesto natural obacunona en epiteliales de línea y primarias.....	177
Tabla 22. CI50 en los niveles de apoptosis de los fármacos activadores de NRF2, los electrofílicos CDDO-Me y omaveloxolona, el péptido LAS200813:8 y el compuesto natural obacunona en epiteliales de línea y primarias.....	207

ABREVIATURAS

AAT	α -antitripsina
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AMPc	Monofosfato de Adenosina Cíclico
AMPK	Cinasa Activada por el Monofosfato de 5' Adenosina
ARE	Elementos de Respuesta Antioxidante
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
BH4	tetrahidrobiopterina
BOLD	Burden of Obstructive Lung Disease
CCL	Proteína Quimioatrayente de Monocitos
CDDO-Me	Bardoxolona Metil
CE50	Concentración Efectiva 50
CEBH	Células Epiteliales Bronquiales Humanas
CI50	Concentración Inhibidora 50
CNC-bZIP	Cap'n'collar-basic con Cremallera de Leucinas
CUL3/RBX1	Cullin 3/RING-box 1
CV	Capacidad Vital
CVF	Capacidad Vital Forzada
CXCL	Quimiocina con Motivo CXC
CXCL8 /IL-8	Quimiocina con Motivo CXC 8 – Interleucina 8
DAAT	Deficiencia α -antitripsina
DE	Desviación Estándar
DMSO	Dimetilsulfóxido
EES	Encuesta Europea de Salud
EGFR	Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico
EHT	Extracto de Humo de Tabaco
ELISA	Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas
EPOC	Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica
ERO	Especies Reactivas de Oxígeno
GAPDH	Gliceraldehído 3 Fosfato Deshidrogenasa
GM-CSF	Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos y Monocitos
GOLD	Global Obstructive Lung Disease
GPx	Glutación Peroxidasa
GSH	Glutación

GSK-3	Glucógeno sintasa cinasa 3
GST	Glutación S Transferasa
GST	Glutación S transferasa
HDAC2	Histona Deacetilasa 2
HO-1/HMOX-1	Hemo oxigenasa
HT	Humo de Tabaco
ICS	Corticosteroides Inhalados
Ig	Anticuerpo
IKK β	Cinasa I κ β
IL-	Interleucina
iNOS	Óxido Nítrico Sintasa Inducible
IP	Yoduro de Propidio
KEAP1	Proteína 1 Asociada a ECH tipo Kelch
LABA	Agonistas β 2 Adrenérgicos de Acción Prolongada
LAMA	Antagonista Muscarínico de Acción Prolongada
LBA	Lavado Broncoalveolar
LIN	Límite del Intervalo de Confianza
LPS	Lipopolisacárido
LTB4	Leucotrieno B4
MAF	Proteína Pequeña del Fibrosarcoma Musculoaponeurótico
MCP1	Proteína quimioatrayente de Monocitos
MMP-	Metaloproteinasas de la Matriz
MPO	Mieloperoxidasa
MUC	Mucina
NF- κ β	Factor Nuclear Potenciador de las Cadenas Ligeras Kappa de las Células B Activadas
NO	Óxido Nítrico
NOS	Óxido Nítrico Sintasa
NQO1	NADP(H) Quinona Oxidorreductasa
NRF2	Factor Nuclear Eritroide 2
OECD	Organizacion para la Cooperacion y el Desarrollo Economicos
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBS	Tamón fosfato salino
PDE4	Fosfodiesterasa 4
PRX	Peroxiredoxina

RT-qPCR	Reaccion en Cadena de la Polimerasa con Transcriptasa Inversa
SABA	Agonistas β 2 Adrenérgicos de Acción Corta
SAMA	Antagonista Muscarínico de Acción Corta
SDS	Sodio Dodecyl Sulfato
SEM	Error Estándar de la Media
SOD	Superóxido Dismutasa
TC	Tomografía Computarizada
TGF- β	Factor de Crecimiento Transformante β 1
TH	Linfocito T helper
TLR4	Toll-like Receptor 4
TNF- α	Factor de Necrosis Tumoral alfa
TRX	Tiorredoxina
VEF ₁	Volumen Espiratorio Forzado en el primer segundo,
VEGF	Factor de Crecimiento Endotelial Vascular
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana

INTRODUCCIÓN

I. Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica

I.1 Definición

La Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC) es una enfermedad crónica caracterizada por una obstrucción del flujo de aire de los pulmones no completamente reversible y asociada a una serie de cambios estructurales y funcionales en el pulmón. La EPOC es una enfermedad heterogénea con diversas manifestaciones clínicas, tanto pulmonares como sistémicas¹⁻³.

La iniciativa Global para la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (GOLD), en la que colaboran tanto el National Heart, Lung and Blood Institute (NHLBI) de Estados Unidos (EEUU) como la Organización Mundial de la Salud (OMS), nace en 1998 para promover el conocimiento de la enfermedad, mejorar la prevención y el tratamiento y generar una serie de recomendaciones para su manejo en forma de guía basadas en la más reciente información científica disponible. El primer informe se elaboró en 2001 y desde entonces se realizan continuas revisiones basadas en los estudios científicos publicados.

En el último informe del proyecto GOLD, publicado en 2020, se describe, pero no define, a la EPOC como “una enfermedad común, prevenible y tratable, caracterizada por una limitación en el flujo de aire y unos síntomas respiratorios persistentes debido a anomalías en las vías aéreas y/o alveolares normalmente causadas por una exposición significativa frente a partículas nocivas o gases e influenciadas por factores intrínsecos como el desarrollo anormal del pulmón. Las exacerbaciones y comorbilidades contribuyen a la severidad global de la enfermedad en pacientes individuales”^{4,5}.

La limitación del flujo de aire crónica característica de la EPOC está causada por una combinación de enfermedades de las vías aéreas pequeñas (bronquiolitis obstructiva), destrucción del parénquima (enfisema) y en muchos casos, hipersecreción de moco (bronquitis crónica). Estos cambios no siempre ocurren juntos, sino que pueden evolucionar de forma escalonada a lo largo del tiempo. Esta limitación está asociada a una respuesta inflamatoria anormal de los pulmones, la inflamación crónica genera cambios estructurales, como el estrechamiento de las vías aéreas y la reducción del retroceso elástico de los pulmones. A su vez, estos cambios disminuyen la capacidad de las vías aéreas de permanecer abiertas durante la expiración. La pérdida de las vías aéreas pequeñas (alvéolos) contribuye también en la limitación del flujo de aire. La disfunción mucociliar es una característica distintiva de la enfermedad. La obstrucción progresiva de las

vías aéreas conduce a una disnea, dificultad respiratoria con el ejercicio, y, como resultado, limitación a la hora de realizar cualquier esfuerzo²⁻⁶. (Figura 1).

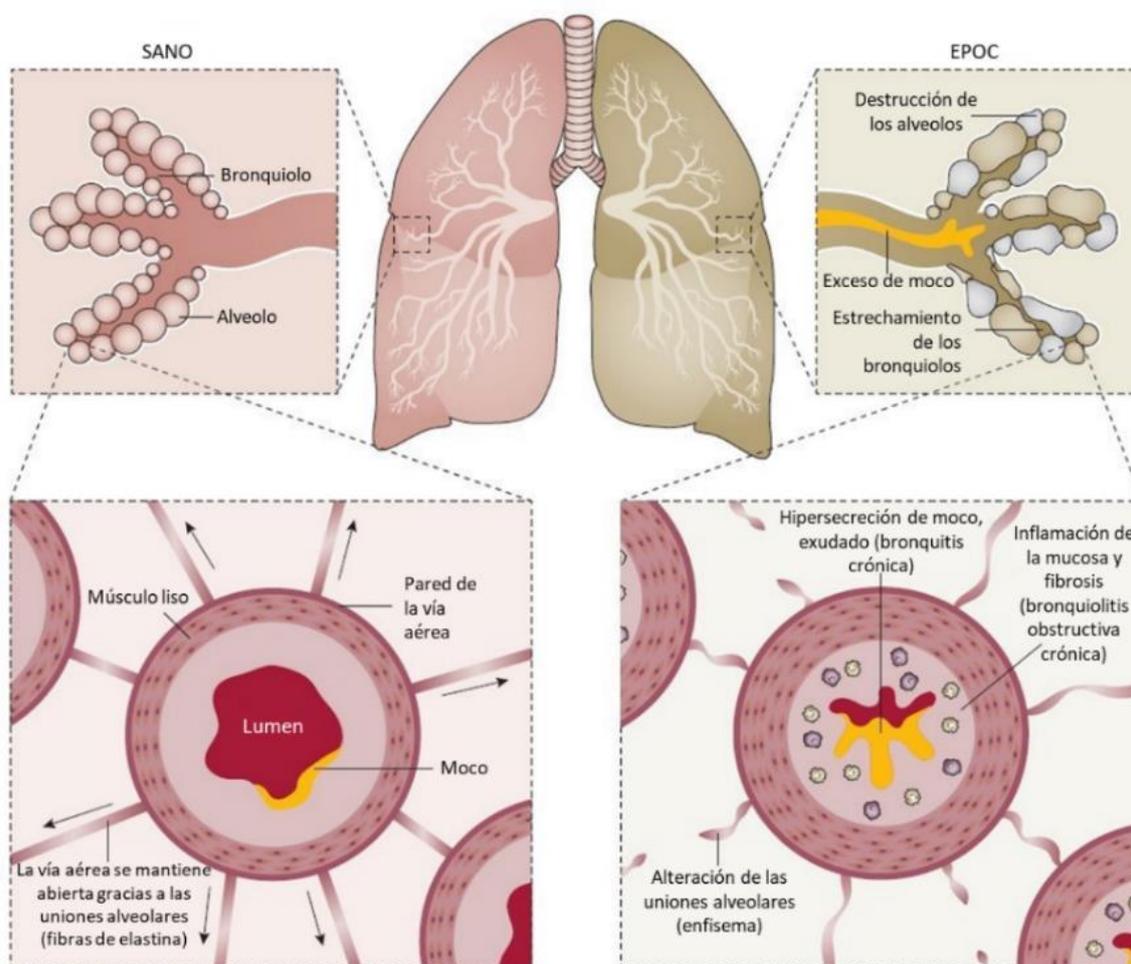


Figura 1. Obstrucción aérea en la EPOC. En pulmones sanos, las vías aéreas menores (bronquiolos) se mantiene abiertas gracias a las uniones alveolares que contiene fibras de elastina. En la EPOC, las vías aéreas menores se estrechan a través del engrosamiento de la pared periférica bronquiolar debido a la inflamación y el estrechamiento fijo, que es resultado de la fibrosis, la oclusión luminal por el moco y el exudado inflamatorio y la interrupción de las uniones alveolares como resultado del enfisema. (Figura adaptada de Barnes PJ, 2015²)

1.2 Epidemiología

La EPOC es un importante problema de salud pública mundial. Según la OMS, un 5-10% de los adultos de más de 40 años sufren EPOC y en 2016 la prevalencia era de 251 millones de casos en todo el mundo. Esta enfermedad es actualmente la tercera causa de muerte en el mundo. Se estima que, en 2015, 3,17 millones de muertes fueron causadas por la EPOC, lo que implica el

5% de las muertes globales ese año. La EPOC ocupa el quinto lugar en términos de costes y carga global de morbilidad.

Esta enfermedad es altamente infradiagnosticada desde el punto de vista clínico, especialmente en atención primaria, o se diagnostica en los estados más tardíos. En consecuencia, ha surgido un esfuerzo global para promover la sensibilización y conocimiento sobre esta enfermedad y poder identificar a los pacientes con mayor precisión, lo que permitiría un tratamiento precoz y reducir así el gran impacto socioeconómico que genera ^{1,2,7,8}.

1.2.1 Prevalencia

Más de 100 estudios sobre la prevalencia de la EPOC se han publicado desde 1970 y la mayoría de ellos estima que la prevalencia de la enfermedad está entre 5% y 10%, aumenta con la edad y según estudios recientes la diferencia entre sexo es pequeña. Estos estudios varían en la metodología de las encuestas, en los criterios de diagnóstico, las técnicas de análisis y la distribución de edad de la población examinada, lo que hace la comparación entre estudios algo muy complejo ⁷.

Según los datos de la Encuesta Europea de Salud (EES), llevada a cabo en la Unión Europea en 2014, la media de prevalencia de la EPOC en los países miembros de la UE era del 4%. El porcentaje de prevalencia variaba de menos del 2% en Malta y Suecia, a más del 6% en Lituania. Sin embargo, los datos, actualizados recientemente, recogidos por la OMS desde 1980 hasta 2020, muestran una prevalencia de la EPOC en la región europea del 1,6%. Los rangos van desde un 0,1% en Malta, Croacia y Suiza hasta un 4,2% en la República Checa. Por otro lado, estudios recientes han mostrado que el 5-10% de los adultos mayores de 40 años padecen EPOC en la UE. Las personas con un nivel de educación más bajo tienen más del doble de probabilidad de padecer EPOC que aquellas con un nivel más alto. Esto puede deberse a que una mayor proporción de personas con baja educación se encuentra en grupos de población de mayor edad, otra razón puede ser que las personas con una menor educación tienen más probabilidades de fumar, principal factor de riesgo de la EPOC. Estos datos pueden aumentar con los años a causa de la alta prevalencia del tabaquismo y de progresivo envejecimiento de la población en muchos países ^{7,9-11} (**Figura 2**).

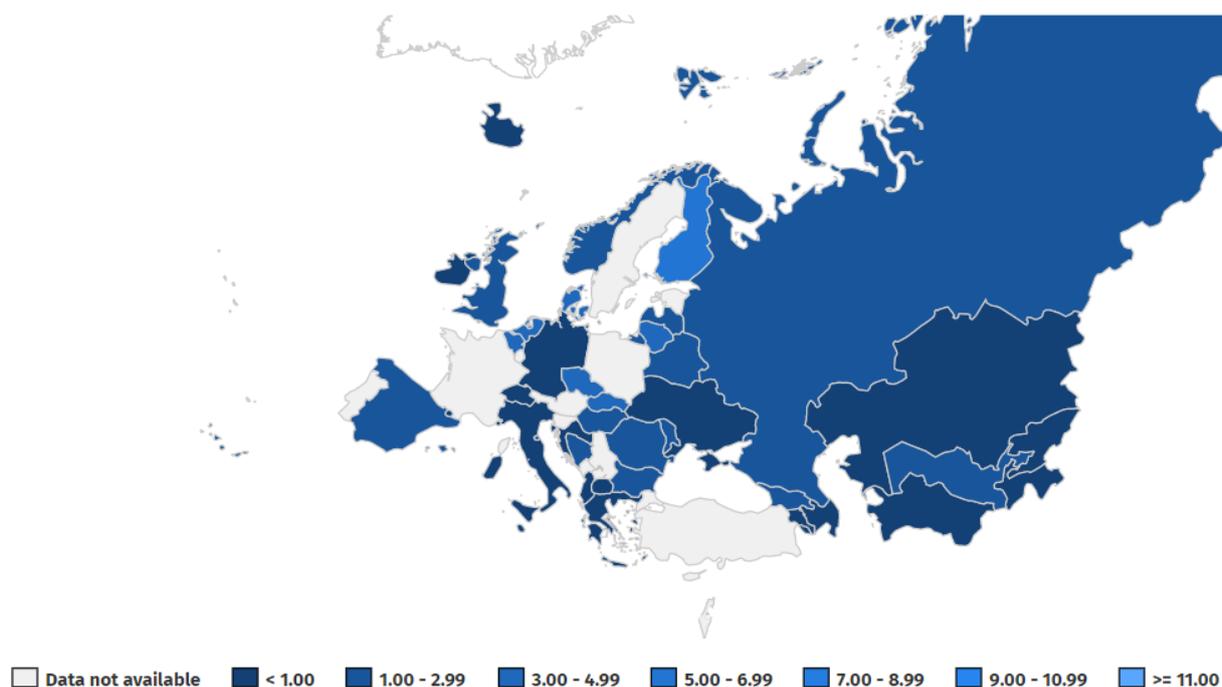


Figura 2. Prevalencia de la EPOC (%) en los países europeos. (Figura obtenida de WHO. European Health Information Gateway ¹⁰)

En 1997 se elaboró un estudio para medir la prevalencia y la variación de la distribución de la EPOC en España, el IBERCOP. Según este estudio, la EPOC tenía una prevalencia del 9,2% (14,3% en hombres y 3,9% en mujeres) en los individuos adultos de 40 a 69 años, es decir, que 1.228.000 personas de entre esas edades padecían esta enfermedad respiratoria. A partir de este estudio también se determinó que el 78,2% de los casos confirmados por espirometría no tenían un diagnóstico previo de la enfermedad, lo que ponía de manifiesto el alto grado de infradiagnóstico de la enfermedad. Posteriormente, en 2008, se realizó otro estudio epidemiológico de la EPOC en España, EPISCAN, según éste, el 10,2% de las personas fumadoras de entre 40 y 80 años padecen EPOC. De estos individuos el 73%, de nuevo por encima del 70%, no estaba diagnosticado. De este estudio, además, se desprende que la prevalencia de la EPOC en España es mayor en los hombres que en las mujeres y que aumenta con la edad. En 2014 el Ministerio de Salud, Servicios e Igualdad llevó a cabo la Encuesta Europea de Salud en España, investigación dirigida a la población mayor de 15 años en todo el territorio nacional. Esta encuesta recogida por la OMS muestra una prevalencia de la EPOC del 2,7%. Según los datos preliminares del estudio epidemiológico reciente realizado en España EPISCAN II, la prevalencia de la EPOC es del 11,8% en la población mayor de 40 años (14,6% en hombres y 9,4% en mujeres). Este estudio muestra un infradiagnóstico del 74,7% ^{1,12-18}.

I.2.2 Morbilidad y Mortalidad

La EPOC esta entre las principales causas de morbilidad crónica y mortalidad en la Unión Europea. En 1990, la OMS estimó que la tasa de mortalidad de la EPOC era de 50 por cada 100.000 hombres y 20 por cada 100.000 mujeres en los países europeos. Por lo que aproximadamente por esa época entre 200.000 y 300.000 personas morían cada año en Europa por EPOC. Según la OMS, en 1997, la EPOC era la causa de muerte en 4,1% de los hombres y 2,4% de las mujeres en Europa. La tasa de mortalidad era de dos a tres veces mayor en hombres que en mujeres. Los países con las mayores tasas (más de 80 por cada 100.000) en hombres eran Ucrania, Irlanda y Rumanía y los países con las mayores tasas en mujeres (más de 30 por cada 100.000) eran Rumanía, Irlanda y Dinamarca. Las menores tasas (menos de 20 por cada 100.000) en hombres se observaron en Grecia, Suecia, Islandia y Noruega y en mujeres (menos de 10 por cada 100.000) en Grecia, Finlandia, Suiza y Suecia. En general, según datos de la OMS, en 2011, la tasa de mortalidad por EPOC era de 18 por cada 100.000 habitantes en Europa. Se podía observar una tendencia general en mayores tasas de mortalidad para países con mayor prevalencia de tabaquismo ^{1,7}.

Según estudios realizados por la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OECD) EUROSTAT se calcula que cerca de 170.000 personas murieron en países de la Unión Europea en 2013 debido a la EPOC y 180.000 personas en 2015, lo que representa más del 40% de la mortalidad debida a todas las enfermedades respiratorias. La mortalidad debida a EPOC varia significativamente entre los diferentes países. Hungría, Dinamarca y Reino Unido son los que presentan actualmente las tasas más altas de mortalidad por EPOC según estos estudios. **(Figura 3)**. En las próximas décadas, la OMS pronostica que la EPOC será causante del 7,8% de todas las muertes a nivel mundial ^{1,11,19}.

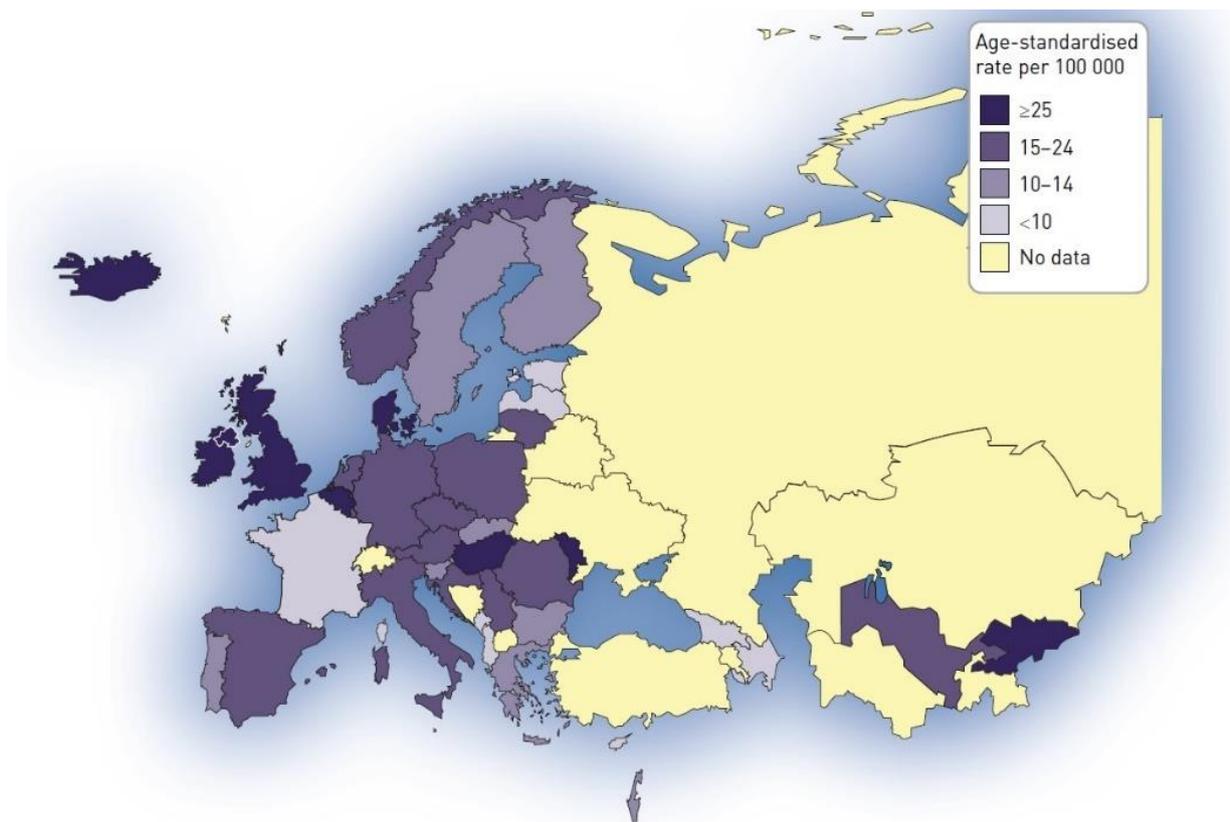


Figura 3. Tasa de mortalidad por EPOC. (Figura obtenida de *Chronic obstructive pulmonary disease - ERS European Lung White Book* ⁷). Datos actualizados noviembre 2011.

La EPOC es causa de elevada morbilidad, mortalidad y discapacidad en España. Según los datos recogidos por el Centro Nacional de Epidemiología en el año 2005 murieron en España 17.571 personas a causa de la EPOC (74,3% hombres y 25,7 % mujeres). Estudios más recientes sitúan a la EPOC como la quinta causa de muerte en nuestro país con alrededor de 180.000 personas cada año, lo que significa una tasa de 33 fallecimientos por cada 100.000 habitantes. Esta tasa de mortalidad varía significativamente en función del género y la edad. En nuestro país, tres de cada cuatro fallecidos son hombres. En 2005, la EPOC fue la quinta causa de muerte entre los varones (61 por cada 100.000 habitantes) y la séptima para las mujeres (20 por cada 100.000 habitantes). Como recoge la Estrategia de EPOC del Sistema Nacional de Salud, en 1990 la edad media de mortalidad de la EPOC era de 76,3 para los hombres y 79,7 para las mujeres; en 2005 era de 79,7 para los hombres y 83,7 para las mujeres; y en 2007 la edad media era de 80,3 para los hombres y 83,73 para las mujeres ^{16,20}.

La EPOC genera una elevada carga socioeconómica debido a las graves incapacidades que provoca y al alto consumo de recursos sanitarios. En España, la EPOC supone un 10-12% de las consultas de atención primaria, un 35-40% de las consultas de neumología y un 7% de los

ingresos hospitalarios. Se produce además un efecto altamente negativo en la calidad de vida de los enfermos. Todo esto conlleva una reducción de las actividades laborales de la población activa, una limitación de la capacidad de llevar a cabo tareas domésticas, así como, un incremento de la dependencia en la población anciana ¹⁶.

1.3 Presentación clínica

En sus inicios la EPOC puede no generar ningún síntoma o que estos sean muy leves. Conforme la enfermedad empeora, los síntomas se vuelven más severos. Los síntomas más importantes y característicos de la EPOC son la disnea de esfuerzo, es decir, la falta de aliento o la aparición de malestar respiratorio a niveles de actividad que no generan normalmente ningún tipo de malestar; y la tos crónica, normalmente llamada “la tos de fumador”. La disnea es progresiva y suele empeorar con el tiempo, pero en algunas ocasiones en los estadios leve y moderado no está presente. Normalmente, la tos y la flema son los primeros síntomas que aparecen y pueden preceder a la disnea en muchos años. Otros síntomas incluyen sibilancias y opresión en el pecho. Conforme la enfermedad progresa y se alcanzan estadios más severos, se pueden incrementar la fatiga, la pérdida de peso y la anorexia. Además, pueden aparecer síntomas como hinchazón en las extremidades inferiores y menor resistencia muscular. La severidad de los síntomas dependerá del daño pulmonar causado y del tabaquismo, el continuo consumo del tabaco acelera el daño y la severidad de la enfermedad ^{7,21}.

Disnea. La disnea es el síntoma cardinal de la EPOC, es la principal causa de incapacidad y ansiedad asociadas a la enfermedad. Los pacientes con EPOC suelen describir la disnea como una sensación de necesitar un mayor esfuerzo para respirar, pesadez en el pecho, falta de aire o jadeos ^{4,22,23}.

Tos. La tos crónica es a menudo el primer síntoma de la EPOC y es frecuentemente descartado por el paciente como una consecuencia esperable del tabaquismo y/o de las exposiciones ambientales. Inicialmente, la tos puede ser intermitente, pero posteriormente aparece todos los días y, normalmente, a lo largo de todo el día. La tos crónica puede ser seca o productiva. En algunos casos, la limitación en el flujo de aire puede desarrollarse sin presencia de tos. Otras causas de la tos crónica pueden ser intratorácicas como asma, cáncer de pulmón, bronquiectasia, tuberculosis, etc. o extratorácicas como la rinitis alérgica crónica, reflujo gastroesofágico, medicación, etc. ^{4,24}.

Producción de esputo. Los pacientes con EPOC normalmente generan pequeñas cantidades de esputo con la tos. Una producción regular de esputo durante tres meses o más durante dos años consecutivos (en ausencia de otras condiciones que lo puedan explicar) es la definición clásica de bronquitis crónica, pero es una definición algo arbitraria que no refleja toda la gama de producción de esputo que ocurre en la EPOC. La producción de esputo, además, puede ser intermitente con periodos de exacerbación intercalados con periodos de remisión. La presencia de esputos purulentos refleja un incremento en los mediadores inflamatorios, y su desarrollo puede identificar el inicio de una exacerbación bacteriana ^{4,25-28}.

Sibilancias y opresión en el pecho. La presencia de jadeos y opresión en el pecho son síntomas con variabilidad interdía e intradía. La sibilancia audible puede generarse a nivel de laringe y no escucharse ninguna anomalía durante la auscultación. Por otra parte, las sibilancias generalizadas durante la inspiración o la expiración pueden detectarse durante la auscultación. La opresión en el pecho normalmente le sigue a un proceso de esfuerzo, esta vagamente localizado, es de carácter muscular, y puede producirse a partir de una contracción isométrica de los músculos intercostales. La ausencia de estos síntomas no excluye de padecer la EPOC ⁴.

Características adicionales en estadios severos. La fatiga, la pérdida de peso y la anorexia con problemas comunes en pacientes severos y muy severos. Estas condiciones tienen importancia pronóstica y pueden ser una señal de otras enfermedades, como tuberculosis o cáncer de pulmón, y, por lo tanto, deben ser siempre examinadas. El desmayo durante la tos ocurre debido al rápido incremento de la presión intratorácica durante ataques prolongados de tos. Los ataques de tos pueden causar fracturas en las costillas, que son normalmente asintomáticas. La hinchazón de los tobillos puede ser el único indicador de la presencia de *cor pulmonale*, una alteración estructural y funcional del ventrículo derecho no relacionada con patología cardíaca. Los síntomas de depresión y/o ansiedad requieren una mención específica a la hora de redactar el historial clínico porque son muy comunes en la EPOC y están asociados con un incremento en el riesgo de exacerbaciones y un empeoramiento del estado de salud ^{4,29-33}.

1.3.1 Exacerbaciones

Una característica de la EPOC es la experimentación de exacerbaciones o episodios de reagudización de los síntomas respiratorios. Se definen en la estrategia GOLD en términos de atención médica como un evento agudo caracterizado por un empeoramiento de los síntomas respiratorios que está más allá de las variaciones normales del día a día y conduce a un cambio en la medicación. Los síntomas principales de las exacerbaciones son incremento de la disnea,

de la purulencia del esputo y de la tos, sin embargo, otros síntomas pueden ser el incremento en la sibilancia y los síntomas de un resfriado. Aunque los cambios en la función pulmonar pueden ocurrir durante las exacerbaciones, estos cambios suelen ser pequeños y no muy útiles en la predicción o monitorización de las exacerbaciones. Las exacerbaciones generalmente duran varios días, pero pueden transcurrir hasta 12 semanas antes de volver al estado basal. Sin embargo, no existen datos exactos sobre la frecuencia, severidad y duración de las exacerbaciones de pacientes con EPOC de diferente estadio. Las causas más comunes de las exacerbaciones son infecciones virales o bacterianas. Un incremento en la contaminación ambiental también parece precipitar la aparición de estos episodios de agudización. Algunos pacientes son particularmente propensos a exacerbaciones mientras que otros no. Dos o más exacerbaciones durante el año previo es el indicador más importante para un futuro episodio de exacerbación. Las exacerbaciones aceleran la disminución de la función pulmonar que caracteriza a la EPOC, esto resulta en una reducción en la actividad física, un empeoramiento de la calidad de vida y un incremento en el riesgo de muerte. Son, además, las exacerbaciones, responsables de una gran proporción de los costos sanitarios atribuibles a la EPOC ^{3,7,34,35}.

1.3.2 Comorbilidades

En muchos pacientes la EPOC coexiste con otras enfermedades (comorbilidades) que pueden tener un impacto significativo en su pronóstico. Estas manifestaciones adicionales pueden deteriorar la capacidad funcional de los pacientes, producir un empeoramiento de la disnea, reducir la calidad de vida e incrementar la mortalidad. Algunas de estas enfermedades surgen independientemente de la EPOC, mientras que otras pueden compartir factores de riesgo o aumentar el riesgo o la severidad de la otra. Pueden tratarse en algunos casos de manifestaciones extrapulmonares o complicaciones derivadas de la EPOC, como por ejemplo disfunción muscular debido a la inactividad. En otros casos las comorbilidades pueden derivar del tratamiento de la EPOC; por ejemplo, osteoporosis debida al tratamiento con corticosteroides orales. Es posible que la EPOC y las enfermedades asociadas compartan elementos y, por tanto, este mecanismo representa un vínculo entre la EPOC y alguna de sus comorbilidades. El riesgo de sufrir alguna enfermedad asociada aumenta con las secuelas de la EPOC, como la reducción de la actividad física o el tabaquismo continuado. Tanto como si la EPOC y la enfermedad comórbida están relacionadas como si no, el control de los pacientes con EPOC debe incluir la identificación y el tratamiento de sus comorbilidades ^{7,36-38}.

Las comorbilidades pueden presentarse en cualquier estadio de la EPOC y el diagnóstico diferencial suele ser difícil, además aumentan el riesgo de hospitalización y mortalidad de la enfermedad, especialmente a medida que la obstrucción de las vías aéreas se vuelve más grave. Además, las comorbilidades aumentan significativamente los costes sanitarios de la EPOC. Las comorbilidades más comunes son enfermedades cardiovasculares, malnutrición, que implica la pérdida de peso y la disfunción de los músculos esqueléticos, ansiedad y depresión, osteoporosis, reflujo gastroesofágico, apnea del sueño, anemia, diabetes y síndrome metabólico. Es importante destacar que la presencia de limitación del flujo de aire aumenta en gran medida la probabilidad de que los pacientes puedan desarrollar cáncer de pulmón con el tiempo. También es muy frecuente encontrar pacientes con hipertensión pulmonar e inflamación pulmonar ^{4,7,36,38,39} (Figura 4).

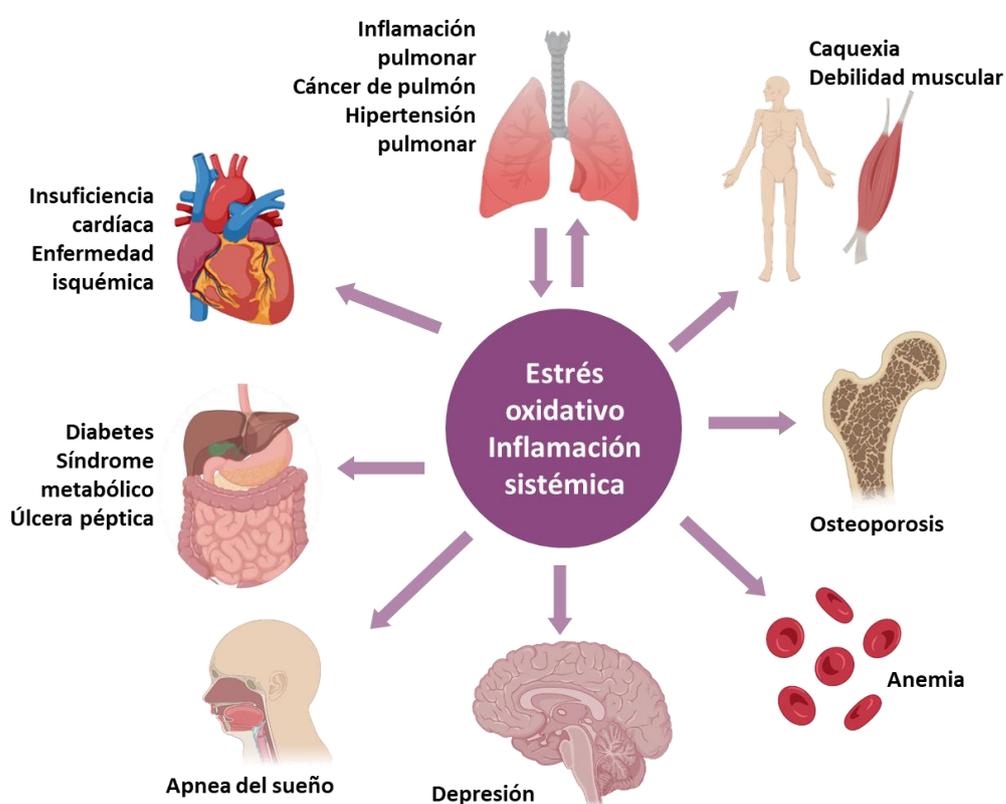


Figura 4. Efectos sistémicos de la EPOC. La EPOC se caracteriza por un componente pulmonar principal y también por una serie de efectos extrapulmonares significativos que contribuyen a que sea considerada una enfermedad heterogénea con diversas manifestaciones clínicas, tanto pulmonares como sistémicas. En la figura se muestran las principales manifestaciones sistémicas, así como los distintos órganos afectados. Imagen creada con BioRender.

1.3.3 Diagnóstico

El diagnóstico de la EPOC debe sospecharse en individuos con síntomas respiratorios, como tos, expectoración de esputo, falta de aliento tras el ejercicio o infecciones en el tracto respiratorio inferior frecuentes o que duran más de lo esperado (más de dos semanas). La sospecha debe incrementar si los individuos además informan de factores de riesgo relacionados con la EPOC, como exposición al humo del tabaco, contaminantes ambientales u ocupacionales y/o la presencia de antecedentes familiares de enfermedades pulmonares obstructivas o factores de la infancia, como bajo peso de nacimiento y infecciones respiratorias en la infancia. En este contexto es necesario realizar una espirometría para confirmar el diagnóstico ^{4,6,40}.

1.3.3.1 Exploración

Aunque la examinación física es una parte muy importante de la atención al paciente, sin embargo, raramente es diagnóstico de la EPOC. Los signos físicos de la limitación del flujo de aire normalmente no están presentes hasta que se ha generado un daño significativo en la función pulmonar, y una detección basada en la examinación física tiene una baja sensibilidad y especificidad. Un gran número de signos físicos pueden estar presente en la EPOC, pero la ausencia de ellos no excluye el diagnóstico ^{4,41}.

1.3.3.2 Espirometría

La espirometría es la prueba de función pulmonar más reproducible y objetiva. Es una prueba fácil y no invasiva que permite realizar una medida de la limitación en el flujo aéreo y de su grado de reversibilidad. A pesar de que esta prueba es algo criticada por solo poder determinar una de las consecuencias de una enfermedad tan compleja como la EPOC, la limitación del flujo aéreo actualmente es la técnica estándar para el diagnóstico de la EPOC. La definición de la EPOC por GOLD se basa en criterios espirométricos, así como también lo hace su diagnóstico y posterior clasificación por estadio de severidad ^{4,42-44}.

En la espirometría se mide el volumen máximo de aire exhalado en una maniobra espiratoria de esfuerzo máximo, iniciada tras una maniobra de inspiración máxima, expresado en litros (capacidad vital forzada, CVF) y el volumen máximo de aire exhalado en el primer segundo de la maniobra de CVF, también expresado en litros (volumen espiratorio forzado en el primer segundo, VEF₁). El cociente VEF₁/CVF muestra la relación entre ambos parámetros. En algunas

ocasiones se mide, en cambio, el cociente entre el VEF₁ y la capacidad vital (CV) lenta, lo que se denomina como índice de Tiffeneau. Estas medidas obtenidas mediante la espirometría se evalúan mediante la comparación con valores de referencia basados en la edad, peso, sexo y etnia ^{4,45,46}.

Los resultados de la espirometría se definen normales cuando sus valores son superiores al límite del intervalo de confianza (LIN). El LIN es aproximadamente un 80% del valor teórico del VEF₁, CVF y CV y de 0.7 para la relación VEF₁/CVF ^{4,46}. Se considera que existe una obstrucción del flujo aéreo cuando el valor de la relación VEF₁/CVF postbroncodilatador es inferior a 0.70 (menor del LIN). Además de este ratio también deben tenerse en cuenta para el diagnóstico tanto los valores de VEF₁ inferiores al 80% del valor teórico como la presencia de factores de riesgo ^{4,46,47} (**Figura 5**).

La prueba espirométrica se realiza tras la administración de broncodilatador inhalado, esto minimiza la variabilidad y supone un método eficaz para la identificación de individuos con EPOC, ya que en estos casos los valores de VEF₁/CVF y VEF₁ están disminuidos incluso tras la administración de broncodilatadores ^{4,48}.

Tabla 1. Clasificación de la gravedad de las alteraciones ventilatorias obstructivas. Tabla adaptada de Pellegrino et al. 2005 ⁴⁵.

Nivel de gravedad	VEF ₁ (% valor de referencia)
Leve	> 70%
Moderada	60 – 69%
Moderadamente grave	50 – 59%
Grave	35 – 49%
Muy grave	< 35%

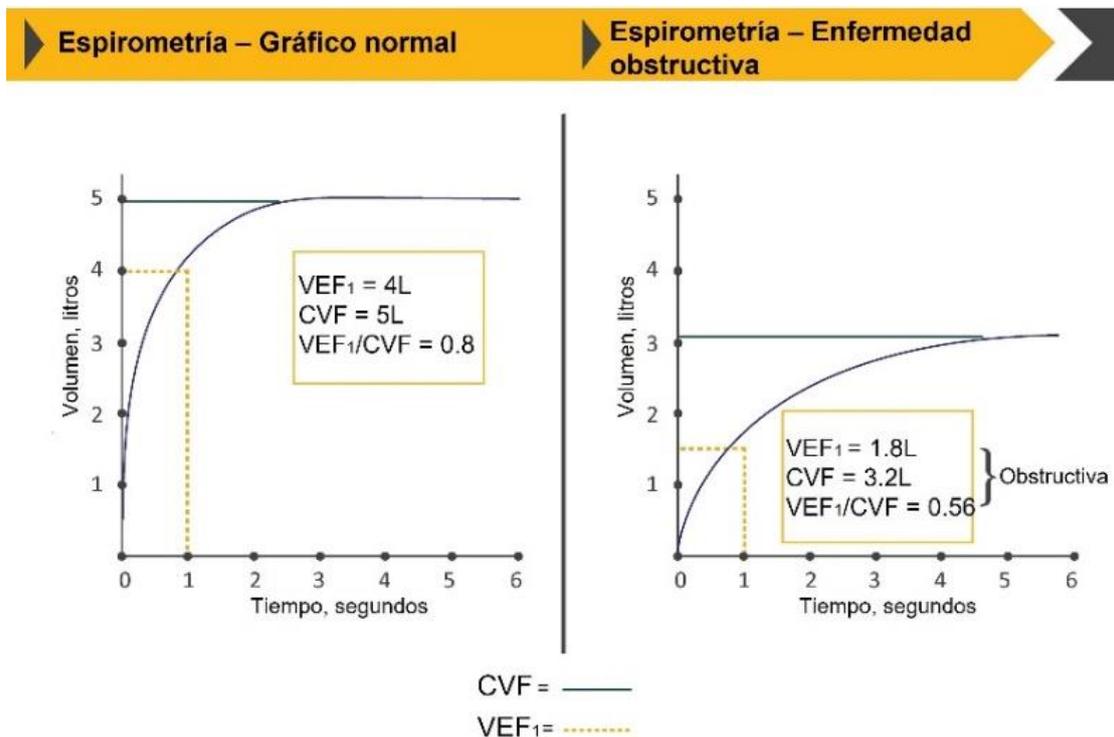


Figura 5. Gráficos de espirometrías normal (izquierda) y de un paciente con enfermedad obstructiva (derecha). (Figura adaptada de Revisión GOLD, 2022 ⁴⁾. Los pacientes con EPOC suelen mostrar una disminución tanto en el VEF₁ y el CVF. Definición de abreviaturas: VEF₁: Volumen espiratorio forzado en el primer segundo; CVF: Capacidad vital forzada.

1.3.3.3 Cribado de la Deficiencia de Alfa-1 antitripsina

La OMS recomienda que todos los pacientes diagnosticados con EPOC deben ser examinados para esta deficiencia, especialmente en áreas con alta prevalencia de la Deficiencia de Alfa-1 antitripsina (DAAT). Aunque el paciente clásico de EPOC es joven (menor de 45 años) con enfisema basal panlobular, se ha visto que un retraso del diagnóstico ha llevado a la identificación de algunos pacientes con DAAT cuando son mayores y tiene una distribución más típica del enfisema (apical y centrilobular). Una baja concentración de alfa-1 tripsina (< 20% normal) sugiere una deficiencia homocigota ^{4,49-51}.

1.3.3.4 Pruebas diagnósticas adicionales

Se debe considerar realizar una serie de investigaciones adicionales en el diagnóstico y evaluación de la EPOC. Como la radiografía de tórax, que a pesar de no ser útil para establecer el diagnóstico en la EPOC, sí que permite excluir diagnósticos alternativos y establecer

comorbilidades. Otras de las pruebas adicionales que se pueden realizar es una medición del volumen pulmonar y la capacidad de difusión, que ayudan a la caracterización de la severidad de la enfermedad. Por otro lado, la oximetría de pulso puede ser utilizada para evaluar la saturación arterial y la necesidad de terapia de suplementación de oxígeno. Por último, el deterioro del ejercicio objetivamente medido, evaluado por una reducción en la distancia recorrida a un ritmo propio o durante una prueba de ejercicio en el laboratorio, es un potente indicador del deterioro del estado de salud y del pronóstico ⁴.

1.3.4 Estadios

La iniciativa GOLD propuso el sistema GOLD para la clasificación de la EPOC en diferentes estadios de severidad basados en los resultados de la espirometría. Una clasificación adecuada es esencial para determinar la terapia más apropiada para cada paciente de forma individual. Esta clasificación distingue cuatro estadios en base a la obstrucción del flujo aéreo: leve, moderada, severa y muy severa. En la siguiente tabla se muestran los cuatro estadios de severidad de la EPOC, sus valores de clasificación, así como la sintomatología asociada. Debe tenerse en cuenta que en los pacientes con EPOC su condición no solo viene determinada por el grado de limitación del flujo de aire sino también por la severidad de los síntomas asociados ^{4,47}.

Tabla 2. Clasificación GOLD de los estadios de la EPOC basada en la severidad de la limitación en el flujo aéreo. (Tabla extraída de Revisión GOLD, 2022 ⁴)

Estadio	Grado de severidad	VEF1/CVF	VEF1
I	Leve	<0,70	VEF1 ≥ 80% previsto
II	Moderada	<0,70	50% ≤ VEF1 < 80% previsto
III	Severa	<0,70	30% ≤ VEF1 < 50% previsto
IV	Muy severa	<0,70	VEF1 < 30% previsto

Definición de abreviaturas: VEF1: Volumen espiratorio forzado en el primer segundo; CVF: Capacidad vital forzada

1.4 Factores de riesgo

La mayoría de las enfermedades crónicas resultan de la interacción entre factores genéticos intrínsecos de cada individuo con los factores ambientales que le rodean. En general, se considera que el tabaco es el factor de riesgo principal y más habitual de la EPOC. Sin embargo,

no todos los fumadores desarrollan una EPOC clínicamente significativa y diferentes estudios describen casos de EPOC en personas no fumadoras, por lo que otros factores de riesgo pueden contribuir al desarrollo de la enfermedad. Estos otros factores de riesgo de la EPOC incluyen exposición ocupacional a agentes nocivos, exposición pasiva al humo del tabaco u otras partículas nocivas durante la infancia, el estatus socioeconómico, la presencia de otras enfermedades respiratorias como el asma, sobre todo durante la infancia, así como el crecimiento y el desarrollo pulmonar. Estudios recientes le han dado especial atención al papel de la microbiota en el desarrollo de la enfermedad, ya que su composición es diferentes en fumadores y pacientes EPOC con respecto a la población general, sin embargo los resultados no son suficientes para considerarla un factor de riesgo. En la siguiente figura se destacan los principales factores de riesgo de la EPOC (**Figura 6**). Estos y otros factores se detallan a continuación^{2,52-57}.



Figura 6. Factores de riesgo que pueden contribuir a la EPOC. Creada con Biorender.

1.4.1 Sustancias inhaladas

El sistema respiratorio está constantemente expuesto a factores ambientales mediante el acto de la respiración, esto hace que los factores de riesgo más importantes de la EPOC sean la

inhalación de partículas de humo de tabaco y de agentes químicos. La combinación de ambos tipos de exposición multiplica el riesgo de desarrollar EPOC ^{2,56,58,59}.

1.4.1.1 Tabaco

El principal factor de riesgo responsable del desarrollo de la EPOC es la exposición al humo del tabaco, tanto activa como pasiva. El 80% de los individuos con limitación crónica del flujo aéreo presentan antecedentes de tabaquismo, este porcentaje sube hasta un 95% en países desarrollados. No todos los fumadores, sin embargo, desarrollan EPOC. La relación entre la exposición al tabaco y el desarrollo de la EPOC está altamente condicionada por factores genéticos y el sistema inmunitario. La proporción de fumadores que desarrolla EPOC era históricamente de un 15%, pero estudios recientes sugieren que este porcentaje es de un 50% cuando se considera los fumadores de mayor edad ^{16,60-62}.

La OMS estima que en países desarrollados el 73% de la mortalidad en la EPOC está relacionada con el consumo de tabaco y el 40% en países en desarrollo. El consumo de tabaco durante el embarazo puede afectar negativamente al desarrollo fetal de los pulmones y generar, como consecuencia, enfermedades pulmonares posteriormente ^{16,60,61,63,64}.

La cesación tabáquica es el tratamiento para la EPOC más efectivo tanto para el pronóstico de la enfermedad como para el coste económico que supone. Este cese está asociado también con una reducción en el riesgo de padecer accidentes cerebrovasculares, enfermedades coronarias y distintos tipos de cáncer; además, está asociado a un incremento en la esperanza de vida ^{61,65}. Los efectos exactos derivados de la cesación tabáquica en la inflamación de las vías aéreas no se conocen con profundidad. Algunos estudios sugieren que incluso tras dejar de fumar, todavía, existe una clara inflamación continua. Otros estudios han demostrado que los individuos que continúan fumando tiene una disminución más abrupta en la función pulmonar ^{61,66-68}. Aunque el consumo de tabaco es el factor más importante en la EPOC, los casos de individuos no fumadores que padecen EPOC pueden representar de un cuarto a un tercio de los casos y están presentes tanto en países en desarrollo como desarrollados ^{53,56,61}.

1.4.1.2 Otras

Otros factores de riesgo de la EPOC son la exposición a la contaminación del aire, tanto de interiores como de exteriores, así como, a sustancias nocivas en el lugar de trabajo. Igual que en el caso del humo del tabaco, la exposición a otras sustancias nocivas de aires contaminados en interiores puede afectar al feto y ocasionar enfermedades pulmonares en etapas posteriores de la vida y suponer un factor de riesgo de la EPOC ¹.

1.4.1.1.1 Exposición laboral a polvo, vapores y sustancias químicas

La exposición en el lugar de trabajo a sustancias nocivas influencia el curso de la EPOC en diferentes maneras: generando EPOC; modificando el efecto del humo del tabaco como causa de la EPOC; creando una mayor discapacidad mediante la adición de una deficiencia asociada a la exposición laboral a la ya generada por el tabaquismo; y acelerando el ritmo de deterioro de la función respiratoria en aquellas personas que ya padecen EPOC. Diversos estudios han demostrado que la exposición laboral puede suponer del 15 al 20% de los casos de EPOC ^{59,61,69,70}. Este porcentaje es incluso mayor en países de ingresos bajos y medios, donde la exposición laboral al polvo y a los humos puede ser mayor que en países de ingresos altos ⁵⁹⁻⁶¹. La exposición laboral continuada a los humos está asociada a una mayor tasa de deterioro de la función pulmonar en personas con EPOC ^{61,71}. La exposición combinada de tabaco y factores ocupacionales incrementa de forma considerable el riesgo de padecer EPOC ^{59,72-74}.

1.4.2 Genéticos

El factor genético más conocido relacionado con la EPOC es la deficiencia de la proteasa de serina α 1-antitripsina (AAT), presente entre el 1 y el 3% de los pacientes con EPOC. Bajas concentraciones de esta enzima, especialmente en combinación con el tabaco u otras exposiciones, aumentan el riesgo de enfisema panlobular ^{60,75}. Otros factores genéticos pueden ser importantes en hasta un 60% de los casos de EPOC ⁷⁶. De hecho, varios genes se han visto relacionados con la EPOC, entre ellos se encuentran los genes que codifican para el factor de crecimiento transformante β 1 (TGF- β 1, por sus siglas en inglés) ⁷⁷, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α , por sus siglas en inglés) ⁷⁸ y la epóxido hidrolasa microsomal 1 ⁷⁹.

1.4.3 Género

Históricamente, la EPOC ha sido mucho más frecuente en los hombres que en las mujeres, ya que estaba relacionado con los patrones de tabaquismo y las exposiciones laborales ⁸⁰⁻⁸². Sin embargo, en los últimos años, la prevalencia de la EPOC se ha equiparado en hombres y mujeres de países de renta alta en los que el hábito de fumar es similar entre ambos sexos ⁶⁰. Por otro lado, diversas investigaciones apoyan la hipótesis que las mujeres son más susceptibles de desarrollar EPOC en igualdad de exposición ^{57,81,83-85}. De hecho, se ha visto que las mujeres menores de 55 años son más susceptibles de padecer una EPOC severa que los hombres ⁸⁶. Además, en todo el mundo, las mujeres están más expuestas a los combustibles de biomasa al cocinar en fuegos abiertos que los hombres ⁸⁷⁻⁸⁹. El género como factor de riesgo de la EPOC sigue siendo un área que requiere una mayor investigación para comprender mejor las tendencias de la prevalencia y los factores de riesgo de la EPOC.

1.4.4 Edad

La prevalencia, la morbilidad y la mortalidad en la EPOC aumentan con la edad. La función pulmonar, que alcanza su máximo nivel en la juventud, comienza a disminuir en la tercera y la cuarta década de la vida ⁹⁰. Una de las razones del aumento de la prevalencia de la EPOC en los últimos años es el cambio demográfico de la población mundial, atribuible a la buena nutrición y a la eliminación o reducción de algunas enfermedades infecciosas de la infancia, así como al descenso de las tasas de mortalidad por enfermedades que afectan a los jóvenes, como las enfermedades cardíacas y las infecciones agudas. El resultado es que una mayor proporción de la población mundial vive más tiempo y corre el riesgo de padecer trastornos médicos crónicos, como la EPOC ^{60,91}.

1.4.5 Asma

A pesar de que las características clínicas fisiológicas son distintas en el momento del diagnóstico inicial, los estudios sobre el asma y la EPOC han demostrado que ambas enfermedades pueden desarrollar características fisiológicas similares con el tiempo y que también solaparse ⁹². Resultados de diferentes estudios transversales han demostrado un gran solapamiento de hasta el 30% entre las personas que tienen un diagnóstico clínico de EPOC y asma ^{60,61}. Otros trabajos han evidenciado que las personas con asma, especialmente si son fumadores, pueden perder la

función pulmonar más rápidamente que los individuos sin asma y tienen mayor riesgo de cumplir los criterios para el diagnóstico de EPOC ^{93,94}.

1.4.6 Infecciones

Las infecciones tienen un papel importante tanto en el desarrollo como en la progresión de la EPOC. La exposición a una infección en los primeros años de vida podría predisponer a un individuo a una bronquiectasia o a cambios en la capacidad de respuesta de las vías aéreas. Además, la mayoría de las exacerbaciones de la EPOC están relacionadas con infecciones bacterianas o víricas ³⁴.

Las infecciones crónicas también tienen un papel importante para entender la EPOC. Por ejemplo, es el caso de la tuberculosis, que sigue siendo endémica en muchas partes del mundo. En el estudio BOLD (Burden of Obstructive Lung Disease), las personas que declararon tener antecedentes de tuberculosis tenían casi el doble de probabilidades de presentar pruebas de obstrucción que las personas sin tuberculosis ^{61,95}.

1.4.7 Otros

Otros factores a destacar son las características socioeconómicas. Las poblaciones pobres tienden a tener un mayor riesgo de desarrollar EPOC y sus complicaciones que sus homólogas más ricas ⁹⁶⁻⁹⁸. La pobreza conlleva muchos de los factores que posteriormente aumentan el riesgo de EPOC, como el mal estado nutricional, el hacinamiento, la exposición a contaminantes, incluidas las altas exposiciones laborales y las altas tasas de tabaquismo (en los países de ingresos bajos y medios), el escaso acceso a la atención sanitaria y las infecciones respiratorias tempranas ^{97,98}.

Existen por otro lado factores que no estaban presentes en el pasado o bien no eran reconocidos. Un ejemplo de estos factores es la supervivencia de los nacidos prematuramente. Muchos de estos pacientes desarrollan displasia broncopulmonar ⁹⁹. Cuando estos pacientes se convierten en adultos, su función pulmonar es significativamente inferior a la de una población control, lo que puede suponer un incremento en el riesgo de padecer EPOC ¹⁰⁰.

Otro factor de riesgo emergente es el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Con el desarrollo de terapias retrovirales mucho más efectivas, el VIH se ha convertido en una

enfermedad crónica. La EPOC se manifiesta cada vez más en los pacientes con VIH, lo que probablemente esté relacionado tanto con los factores de riesgo tradicionales, como el tabaquismo, como con una mayor propensión a desarrollar infecciones ^{101,102}.

Un último factor importante es el creciente reconocimiento de la importancia del microbioma en el desarrollo y la progresión de muchas enfermedades humanas ¹⁰³. Algunos estudios han demostrado que la alteración del microbioma es un factor en la EPOC y puede ayudar en la comprensión de la progresión de la enfermedad ¹⁰⁴.

1.5 Patología

Los cambios patológicos característicos de la EPOC ocurren en las vías aéreas, el parénquima pulmonar y la vasculatura pulmonar ¹⁰⁵. Los cambios patológicos que se observan en la EPOC incluyen la inflamación crónica, con un aumento del número de tipos de células inflamatorias específicas en diferentes partes del pulmón, y los cambios estructurales resultantes de las repetidas lesiones y reparaciones. Esta respuesta inflamatoria representa la respuesta inmunitaria innata y adaptativa a la exposición prolongada a partículas y gases nocivos, en particular el humo de tabaco. Todos los fumadores tienen algo de inflamación en sus pulmones, pero los que desarrollan EPOC tienen una respuesta amplificada o anormal a la inhalación de agentes tóxicos. Esta respuesta amplificada puede dar lugar a una hipersecreción mucosa (bronquitis crónica), a la destrucción de los tejidos (enfisema) y a la alteración de los mecanismos normales de reparación y defensa, lo que provoca la inflamación y fibrosis de las vías respiratorias pequeñas (bronquiolitis). Estos cambios patológicos provocan un aumento de la resistencia al flujo de aire en las pequeñas vías aéreas conductoras, un aumento de la distensibilidad de los pulmones, el atrapamiento del aire y la obstrucción progresiva del flujo de aire, todos ellos rasgos característicos de la EPOC ¹⁰⁶ (**Figura 7**).

En general, los cambios inflamatorios y estructurales en las vías aéreas incrementan con la severidad de la enfermedad y persisten tras dejar de fumar. Además, la inflamación sistémica puede estar presente y jugar un importante papel en las múltiples comorbilidades presentes en muchos de los pacientes con EPOC ¹⁰⁷.

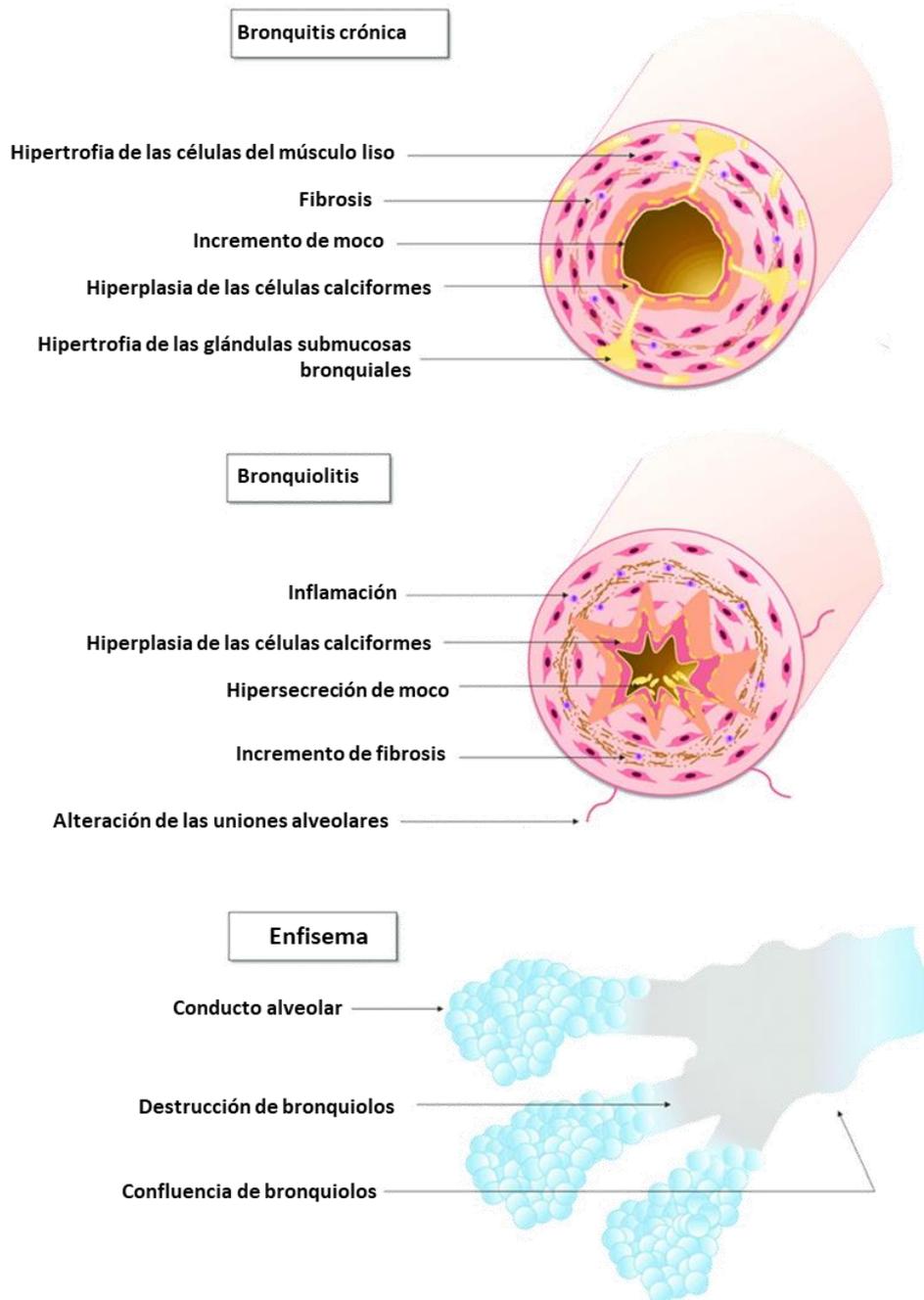


Figura 7. Cambios patológicos observados en la EPOC. (Figura adaptada de Scarlata et al. 2020¹⁰⁸)

1.6 Patogenia

La EPOC se caracteriza por una respuesta inflamatoria desmedida en el tracto respiratorio a irritantes crónicos como el humo de tabaco. Todavía no se han definido con exactitud los mecanismos subyacentes a esta respuesta amplificada, pero es posible que, al menos en parte, estén determinados genéticamente. La EPOC también se caracteriza por un elevado nivel de

estrés oxidativo que, muy probablemente, es responsable de, entre otros efectos, aumentar la inflamación pulmonar. Estos mecanismos, juntos, son los que, principalmente, dan lugar a los cambios patológicos característicos de la EPOC (**Figura 8**). Aunque otros factores como el remodelado pulmonar, la respuesta autoinmune, el exceso de proteinasas, la fibrosis intersticial o el microbioma pulmonar pueden desempeñar un papel importante en la enfermedad, en esta tesis nos centraremos principalmente en los dos mecanismos clave, la inflamación y el estrés oxidativo ¹⁰⁹⁻¹¹¹.

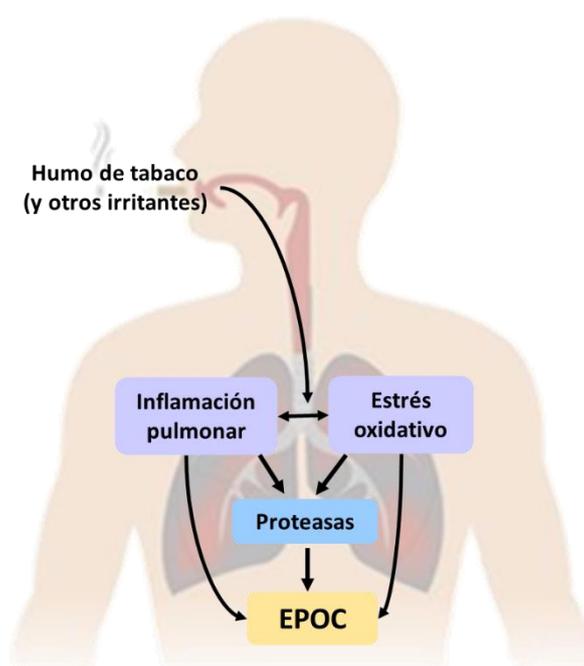


Figura 8. Patogenia en la EPOC. El humo de tabaco y otro estímulos desencadenan una respuesta inflamatoria que, junto al estrés oxidativo y al daño proteolítico, contribuyen a los cambios patológicos que caracterizan a la EPOC.

1.6.1 Inflamación

La iniciativa GOLD define a la EPOC como una enfermedad crónica inflamatoria ⁴. La inflamación en la EPOC está predominantemente localizada en las vías aéreas periféricas y el parénquima pulmonar, pero está también asociada con una inflamación sistémica ^{107,112}.

La inflamación crónica en la EPOC implica la infiltración de las principales células inflamatorias, como neutrófilos, monocitos/macrófagos y linfocitos en las vías aéreas y el tejido pulmonar ^{105,113}. En algunos pacientes, también puede haber un aumento de eosinófilo y linfocitos. Todas

estas células inflamatorias, junto con las células epiteliales y otras células estructurales, liberan múltiples mediadores inflamatorios ¹⁰⁷.

Un patrón similar de inflamación y liberación de mediadores se encuentra en fumadores sin limitación del flujo de aire, pero en los pacientes con EPOC esta inflamación se amplifica e incluso aumenta durante las exacerbaciones agudas o precipitadas por una infección bacteriana o vírica ¹⁰⁷. La base molecular de la amplificación de la inflamación aún no se conoce del todo, pero podría estar determinada, al menos en parte, por factores genéticos y epigenéticos.

El humo de tabaco y otros agentes irritantes inhalados podrían activar a los macrófagos de superficie y a las células epiteliales de las vías aéreas para que liberen múltiples mediadores quimiotácticos, en particular quimiocinas, que atraen a los neutrófilos, monocitos y linfocitos circulantes hacia los pulmones. Esta inflamación persiste incluso cuando se deja de fumar, lo que sugiere que existen mecanismos de autoperpetuación, aunque éstos aún no se han dilucidado ¹¹⁴.

1.6.1.1 Células inflamatorias

La inflamación observada en los pulmones de los pacientes con EPOC implica tanto a la inmunidad innata (neutrófilos, macrófagos, eosinófilos, mastocitos entre otros) como a la inmunidad adaptativa (linfocitos T y B), pero también hay una activación de las células estructurales, incluidas las células epiteliales de las vías aéreas y alveolares, las células endoteliales y los fibroblastos ¹⁰⁷. Las diferentes células involucradas en la inflamación producida por las partículas procedentes del humo de tabaco y las interacciones producidas entre ellas se muestran en las **Figuras 9 y 10**.

Células epiteliales

Las células epiteliales son activadas por el humo de los cigarrillos y otros irritantes inhalado para producir mediadores inflamatorios, como el TNF- α , la interleucina 1 β (IL-1 β), la interleucina 6 (IL-6), el factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF, por sus siglas en inglés) y la interleucina 8 (CXCL8 o IL-8) ^{107,115}. Las células epiteliales de las vías aéreas pequeñas expresan TGF- β , que luego induce la fibrosis local. El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) parece ser necesario para mantener la integridad de las células alveolares, y el bloqueo

de los receptores del VEGF en ratas induce la apoptosis de las células alveolares y una patología similar a la del enfisema ^{107,116}.

Las células epiteliales de las vías aéreas también son importantes en la defensa de las mismas, con la producción de moco por parte de las células caliciformes y la secreción de antioxidantes, antiproteasas y defensas/catelicidinas. El humo del cigarrillo y otros agentes nocivos podrían perjudicar estas respuestas del epitelio de las vías aéreas, aumentando la susceptibilidad a la infección ¹⁰⁷.

Macrófagos

Los macrófagos desempeñan un papel clave en la orquestación de la inflamación crónica en los pacientes con EPOC ¹¹⁷. El número de macrófagos está notablemente aumentado (de 5 a 10 veces) en los pacientes con EPOC. Los macrófagos pueden ser activados por el extracto de humo de tabaco para liberar mediadores inflamatorios, como TNF- α , la quimiocina con motivo CXC (CXCL) 1, IL-8, la proteína quimioatrayente de monocitos 1 (CCL2), leucotrieno (LT) B4 y especies reactivas de oxígeno (ERO). Los macrófagos alveolares también segregan enzimas elastolíticas, entre las que se encuentran las metaloproteinasas de la matriz (MMP) 2, 9 y 12; las catepsinas K, L y S; y la elastasa de neutrófilos tomada de los neutrófilos ^{107,118}. Los macrófagos alveolares de los pacientes con EPOC segregan más proteínas inflamatorias y tienen una mayor actividad elastolítica al inicio que los de los fumadores normales, y esto aumenta aún más con la exposición al humo de tabaco.

Neutrófilos

El número de neutrófilos activados es mayor en los pacientes con EPOC y se correlaciona con la gravedad de la enfermedad. El tabaquismo tiene un efecto estimulante directo sobre la producción y liberación de granulocitos de la médula ósea y la supervivencia en el tracto respiratorio, posiblemente mediado por los factores de crecimiento hematopoyético y el factor GM-CSF ¹⁰⁷. Los neutrófilos son reclutados al tracto respiratorio bajo la dirección de varios factores quimiotácticos de neutrófilos, como LTB4, CXCL1, CXCL5 e IL-8, cuyos niveles están aumentados en las vías aéreas de los pacientes con EPOC ^{119,120}. Estos mediadores quimiotácticos pueden proceder de macrófagos alveolares, células T y células epiteliales, pero el propio neutrófilo podría ser una fuente importante de IL-8 ^{119,121}. Los neutrófilos secretan

proteasas de serina, como la elastasa de neutrófilos, la catepsina G y la proteinasa 3, así como MMP-8 y MMP-9, que podrían contribuir a la destrucción alveolar. La neutrofilia de las vías aéreas está relacionada con la hipersecreción de moco porque la elastasa de neutrófilos, la catepsina G y la proteinasa-3 son potentes estimulantes de la secreción de moco de las glándulas submucosas y las células caliciformes^{107,122}. Hay un marcado aumento del número de neutrófilos en las vías aéreas de los pacientes con exacerbaciones agudas de EPOC. Esto podría reflejar un aumento de la producción de factores quimiotácticos de los neutrófilos, incluidos LTB4 e IL-8^{107,123}.

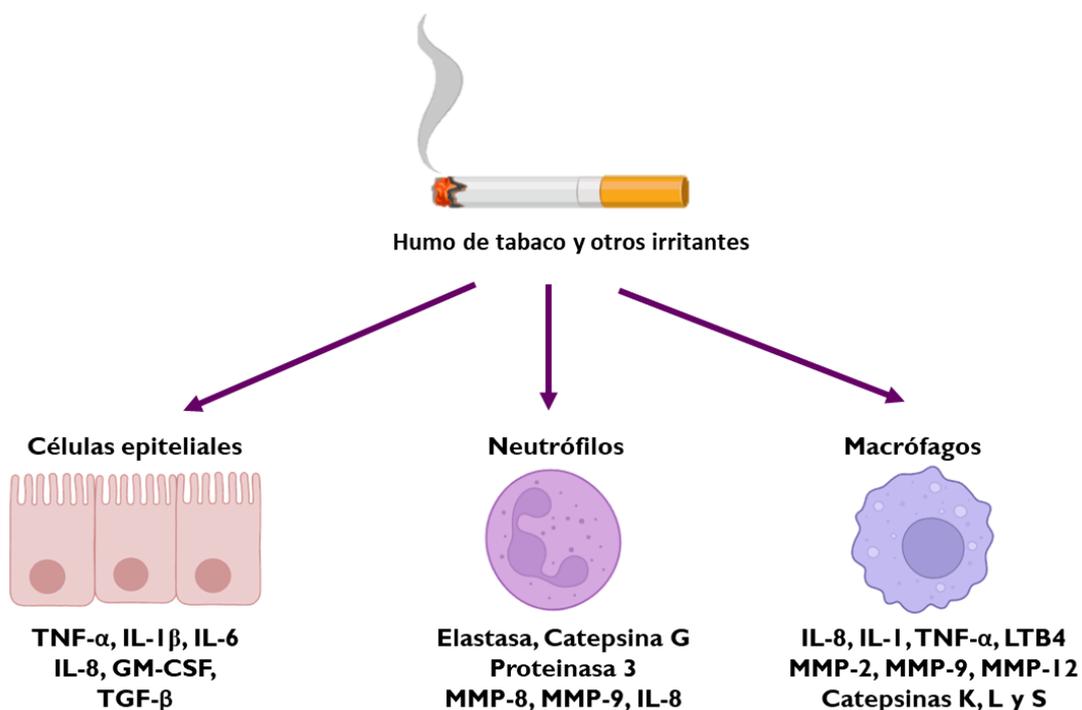


Figura 9. Principales células implicadas en la respuesta inflamatoria de la EPOC y los mediadores inflamatorios liberados por éstas. Los oxidantes endógenos causan la infiltración de las células inflamatorias, incluyendo neutrófilos y macrófagos, en el tejido pulmonar, lo que conlleva un aumento de la expresión de proteasas y inflamatorios. El epitelio pulmonar también se encarga de la liberación de diferentes mediadores inflamatorios y factores profibróticos. Creada con BioRender.

Abreviaturas: GM-CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos; IL-1 β : interleucina 1 β ; IL-6: interleucina 6; IL-8: interleucina 8; LTB4: leucotrieno B4; MMP-(2,8,9,12): metaloproteinasas; TGF- β : factor de crecimiento transformante β ; TNF- α : factor de necrosis tumoral α .

1.6.1.2 Mediadores inflamatorios

Muchos mediadores inflamatorios han sido implicados en la EPOC, incluyendo lípidos, radicales libres, citoquinas, quimioquinas y factores de crecimiento ¹¹⁹. Estos mediadores proceden de células inflamatorias y estructurales del pulmón e interactúan entre sí de manera compleja. Debido a la gran cantidad de mediadores que intervienen, es poco probable que el bloqueo de un solo mediador tenga un efecto clínico significativo. Mediadores similares a los que se encuentran en los pulmones de pacientes con EPOC pueden también encontrarse también aumentados en la circulación, y esta inflamación sistémica podría subyacer y potenciar comorbilidades ¹⁰⁷. Más de 50 mediadores de inflamación se liberan en los pulmones de pacientes con EPOC ¹²⁴. Aquí nos centraremos en los más estudiados y aquellos implicados en esta tesis (**Figura 9 y 10 y Tabla 3**).

Quimiocinas

Las quimiocinas desempeñan un papel fundamental en la orquestación de las respuestas inflamatorias e inmunitarias al regular el tráfico de células inflamatorias e inmunitarias hacia los órganos diana ¹²⁵. Varias quimiocinas están implicadas en el reclutamiento de células inflamatorias en la EPOC ^{119,126}.

Interleucina 8. La IL-8 es un potente quimioatrayente de neutrófilos. Los niveles de esta quimiocina están aumentados en el esputo y el BAL de los pacientes con EPOC y se correlacionan con la mayor proporción de neutrófilos ¹²⁷⁻¹³⁰. Las concentraciones de IL-8 son aún más elevadas en pacientes con enfisema debido a la DAAT ¹³¹ y aún más durante las exacerbaciones agudas, lo que presumiblemente contribuye al aumento del número de neutrófilos ¹³²⁻¹³⁴.

Las células epiteliales de las vías aéreas secretan IL-8 en respuesta a varios estímulos, como TNF- α , IL-1 β , productos bacterianos, lipopolisacáridos (LPS), ciertos virus, estrés oxidativo y extracto de humo de tabaco ¹³⁵⁻¹³⁹. Curiosamente, las células epiteliales de las vías aéreas cultivadas y los macrófagos alveolares de pacientes con EPOC producen más IL-8 que las células de fumadores normales, lo que indica una respuesta amplificada. La proteína y el ARN mensajero (ARNm) de la IL-8 están aumentados en las células epiteliales bronquiolares de los pacientes con EPOC ¹⁴⁰, y hay una mayor liberación basal de IL-8 de las células epiteliales de las vías aéreas de los pacientes con EPOC ^{139,141}.

Los propios neutrófilos también liberan IL-8 y atraen más neutrófilos; se establece así un estado inflamatorio que se autoperpetúa ¹²¹. La secreción de IL-8 está regulada transcripcionalmente por varios factores de transcripción, entre los que predomina el del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- κ B, por sus siglas en inglés). Asimismo, la MMP-9 parece aumentar la actividad de la IL-8 hasta 10 veces al truncar el amino terminal ¹⁴².

Citoquinas

Las citoquinas son mediadores de la inflamación crónica, y varias de ellas han sido implicadas en pacientes con EPOC ¹⁴³.

Factor de necrosis tumoral alfa. El TNF- α está presente en altas concentraciones en el esputo de los pacientes con EPOC ^{119,127}, especialmente durante las exacerbaciones ^{119,133}. El TNF- α se sintetiza normalmente como un precursor (pro- TNF- α) que se almacena en una forma unida a la membrana. Al ser estimulado con un estímulo adecuado (como LPS), el precursor se convierte en la forma biológicamente activa del pro- TNF- α , lista para ser liberada. El pro-TNF- α se convierte finalmente en TNF- α activo ¹⁴⁴. Esta citoquina activa el NF- κ B, que activa, a su vez, la transcripción de genes inflamatorios, incluidas las citocinas, quimiocinas y proteasas, en las células epiteliales y los macrófagos. Del mismo modo, activa la cinasa MAP p38, que a su vez puede activar una serie de genes similares y puede interactuar con la vía del NF- κ B. Esto sugiere un papel del TNF- α en la amplificación de la inflamación de la EPOC. El TNF tiene un amplio espectro de efectos inflamatorios relevantes para la EPOC, que dan lugar a la activación de neutrófilos, monocitos, macrófagos, epitelio, secreción de moco y destrucción del parénquima pulmonar mediante la liberación de proteinasas ¹¹⁹.

Interleucina 1beta. La IL-1 β tiene acciones similares a las del TNF- α y es un potente activador de los macrófagos alveolares de los pacientes con EPOC ¹¹⁸. Las células epiteliales bronquiales en cultivo liberan más IL-1 β que las células de sujetos normales tras la estimulación con humo de tabaco ¹⁴⁵. Sin embargo, aún no se han notificado niveles elevados de IL-1 β en la EPOC. Además, la IL-1 β estimula la expresión de MMP elastolíticas, incluida la MMP-9, de varios tipos de células ^{119,146}.

Interleucina 6. Las concentraciones de IL-6 están aumentadas en los pacientes EPOC, especialmente durante las exacerbaciones ¹⁴⁷⁻¹⁵². Los monocitos de pacientes con EPOC liberan más IL-6 en respuesta a la estimulación con LPS que las células de sujetos normales ¹⁵³. La IL-6 es un marcador de inflamación, ya que es activada por el NF- κ B, pero su papel en la

inflamación es incierto, ya que tiene acciones tanto antiinflamatorias como proinflamatorias y sus efectos pueden estar determinados por la presencia de otras citocinas ¹¹⁹.

Proteasas

Diferentes proteasas descomponen los componentes del tejido conectivo, especialmente la elastina, en el parénquima pulmonar para producir el enfisema. Existe un desequilibrio entre las proteasas y las antiproteasas endógenas que normalmente deberían proteger contra los efectos mediados por las proteasas ¹¹⁹. La elastina puede ser el objetivo más importante de estas enzimas, porque hay una pérdida de elasticidad en el parénquima pulmonar en los pacientes con enfisema, y la elastina no puede regenerarse en forma activa. Algunas de las proteasas más importantes son la elastasa neutrofílica, las catepsina y las metaloproteinasas (MMP)x ¹¹⁹.

Elastasa neutrofílica. Se ha hecho especial hincapié en el papel de la elastasa neutrofílica desde que se demostró que los pacientes con deficiencia hereditaria de AAT desarrollaban enfisema de inicio temprano. Esto fue corroborado por modelos animales en los que la instilación intraqueal de elastasa neutrofílica induce enfisema, infiltración de neutrófilos ^{119,154}, y la localización inmunocitoquímica de elastasa neutrofílica en las fibras de elastina en el parénquima pulmonar de pacientes con enfisema ^{119,155}. La elastasa neutrofílica es una serina proteasa que es inhibida por la AAT en el parénquima pulmonar. Se almacena en gránulos azurófilos en los neutrófilos, y puede expresarse en la superficie celular en células estimuladas por citoquinas ^{119,156}.

El aumento de la actividad de la elastasa en pacientes con EPOC podría contribuir al desarrollo del enfisema y la inflamación neutrofílica mediante la generación de péptidos quimiotácticos, como la Pro-Gly-Pro acetilada (matriquinas), que son potentes quimioatrayentes de neutrófilos que actúan sobre el CXCR2 ¹⁵⁷. La elastasa de neutrófilos humanos no sólo tiene actividad elastolítica, sino que también es un potente estimulante de la secreción de moco en las vías aéreas, mediado por los EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico) ¹⁵⁸.

Metaloproteinasas de matriz. Las MMP son una gran familia de proteinasas dependientes del zinc que regulan la destrucción de los componentes de la matriz extracelular ¹⁵⁹. Se sabe que las MMP son un factor esencial en la regulación de las citoquinas, quimiocinas y factores de crecimiento. Y tienen un papel clave en la EPOC ¹⁶⁰. En los pacientes con enfisema y EPOC, hay un aumento de las concentraciones y la expresión de MMP-1 (colagenasa) y MMP-9 (gelatinasa

B) en el lavado broncoalveolar, en el esputo, en el condensado exhalado y en los macrófagos, que se incrementa durante las exacerbaciones ¹⁶¹⁻¹⁶⁴. También se ha visto que hay un aumento de la actividad de la MMP-9 en el parénquima pulmonar de los pacientes con enfisema ¹⁶⁵, y esto se correlaciona con el VEF₁ ¹⁶⁶. La expresión de MMP-1 también está aumentada en los pulmones de pacientes con enfisema ¹⁶⁷. Los macrófagos alveolares de fumadores normales expresan más MMP-9 que los de sujetos normales ¹⁶⁸, y hay un aumento aún mayor en las células de pacientes con EPOC ¹⁶⁹, que tiene una actividad elastolítica muy aumentada ¹¹⁸. La MMP-9 es la enzima elastolítica predominante en los pacientes con EPOC y es secretada por macrófagos, neutrófilos y células epiteliales ¹⁷⁰. Las MMP-8 y MMP-9 no sólo actúan como enzimas secretadas, sino que también se unen a las células, donde ejercen una actividad elastolítica. Así, aproximadamente el 80% de las MMP-8 y MMP-9 sintetizadas por los neutrófilos permanecen asociadas a la superficie y no son neutralizadas por sus inhibidores, por lo que pueden desempeñar un papel crítico en la elastólisis ^{171,172}.

Tabla 3. Patrón inflamatorio en los diferentes estadios de la EPOC.

Tipo celular	EPOC LEVE	EPOC SEVERA	EXACERBACIÓN EPOC
Neutrófilo	++	+++	++++
Eosinófilo	0	0	+
Mastocito	0	0	?
Macrófago	+++	++++	++++
Linfocito T	Tc1+	TH1+++ , Tc1+++ , TH17?	?
Linfocito B	+	+++	?
Célula dendrítica	+?	+?	+
Quimiocinas	IL-8+, CXCL1+, MCP1	IL-8++	IL-8+++
Citocinas	TNF- α	TNF- α	TNF- α
Mediadores lipídicos	LTB4+	LTB4++	LTB4+++
Estrés oxidativo	++	+++	++++

Abreviaturas: CXCL1: Quimiocina CXC ligando 1; EPOC: Enfermedad pulmonar obstructiva crónica; IL-8: interleucina 8; LTB4: Leucotrieno B4; MCP1: proteína quimioatrayente de monocitos 1; Tc1+: linfocito Tc1; TH1: linfocito T helper tipo 1; TH17: linfocito T helper 17 TNF- α : Factor de necrosis tumoral α .

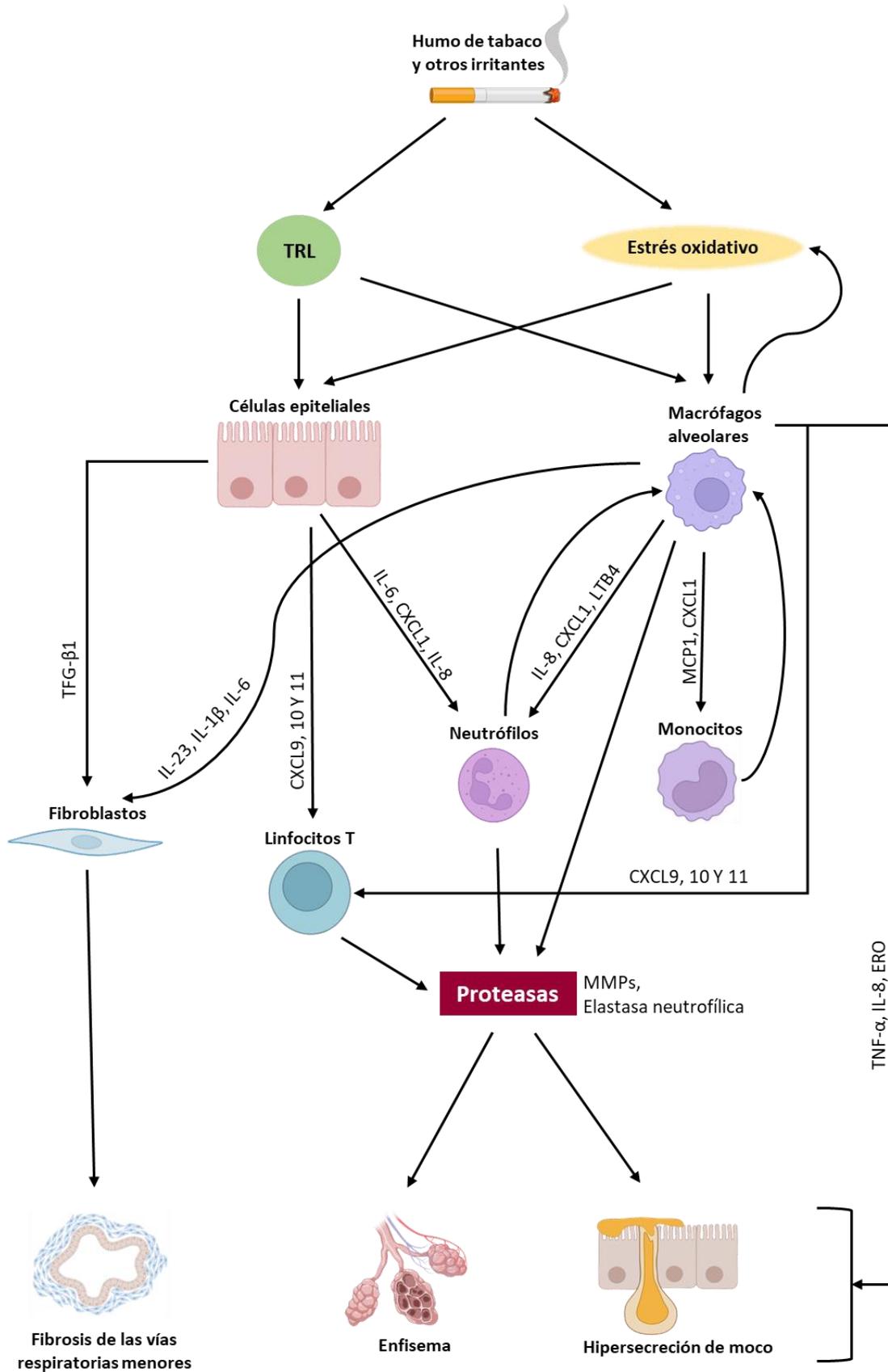


Figura 10. Posibles vías y mecanismos del humo del tabaco en el desarrollo de la EPOC. El humo del tabaco activa los macrófagos y las células epiteliales de las vías respiratorias mediante la activación de los receptores tipo Toll (TLR) y el estrés oxidativo para provocar la liberación de múltiples factores

quimiotácticos. Los neutrófilos y monocitos reclutados y los linfocitos T, así como las células estructurales, liberan múltiples mediadores inflamatorios. Algunas células inflamatorias y estructurales también liberan proteasas que conducen a la destrucción del parénquima y a la hipersecreción de moco en las vías respiratorias, y algunas liberan mediadores fibrogénicos que conducen a la fibrosis de las vías respiratorias pequeñas. Creada con BioRender.

Abreviaturas: CXCL (1, 9, 10 y 11: quimiocinas con motivo CXC; ERO: especies reactivas de oxígeno; IL-1β: interleucina 1β; IL-6: interleucina 6; IL-8: interleucina 8; IL-23: interleucina 23; LTB4: leucotrieno B4; MCP1: proteína quimioatrayente de monocitos 1; MMPs: metaloproteinasas; TGF-β1: factor de crecimiento transformante β; TLR: receptores tipo Toll; TNF-α: factor de necrosis tumoral α.

1.6.2 Estrés oxidativo

El estrés oxidativo surge como resultado de un desequilibrio entre la producción de, principalmente, ERO y las defensas antioxidantes del organismo. Las ERO son metabolitos de oxígeno altamente reactivos; algunos ejemplos son el anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), el radical hidroxilo ($HO\cdot$) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Los pulmones, debido a su anatomía, ubicación y función, son particularmente susceptibles al estrés oxidativo¹⁷³⁻¹⁷⁵.

La producción de ERO se ha relacionado directamente con la oxidación de las proteínas, el daño oxidativo al ADN y la peroxidación lipídica, lo que puede causar una lesión pulmonar directa o inducir una serie de respuestas celulares a través de la generación de especies reactivas secundarias. Las ERO pueden alterar el remodelado de la matriz extracelular y los vasos sanguíneos, estimular la secreción de moco, inactivar las antiproteasas, causar apoptosis y regular la proliferación celular^{174,176}. El aumento de los niveles de ERO está también relacionado con el inicio de las respuestas inflamatorias en los pulmones a través de la activación de factores de transcripción, la transducción de señales y la expresión de genes de mediadores proinflamatorios^{177,178}.

El estrés oxidativo está muy implicado en la EPOC. Los pacientes con esta enfermedad presentan un aumento de los niveles de estrés oxidativo, especialmente durante las exacerbaciones agudas. Los niveles de diferentes biomarcadores del estrés oxidativo (como peróxido de hidrógeno o 8-isoprostano) están aumentados en el condensado del aliento exhalado, el esputo y la circulación sistémica de los pacientes con EPOC⁴. Este estrés oxidativo es resultado directo de una mayor cantidad de oxidantes inhalados. El humo de tabaco, la contaminación aérea y el humo de biomasa son las mayores fuentes de oxidantes en los pulmones, sin embargo, el estrés oxidativo persiste incluso en exfumadores. Esto indica que el estrés oxidativo es también es

resultado indirectamente de una mayor liberación de ERO por las diversas células inflamatorias, inmunitarias y epiteliales de las vías aéreas ^{170,173,175,179}.

1.6.1.1.1 Especies Reactivas de Oxígeno derivadas del humo de tabaco

El consumo de cigarrillos y la inhalación de contaminantes aéreos, incluidos los gases oxidantes como el ozono, el dióxido de nitrógeno, el dióxido de azufre o la contaminación atmosférica por partículas, provocan daños directos en los pulmones, así como la activación de respuestas inflamatorias en el pulmón.

El humo de tabaco es, como ya hemos comentado, el principal factor causal de la enfermedad. Más del 90% de los pacientes con EPOC son fumadores, sin embargo no todos los fumadores desarrollan EPOC ¹⁸⁰.

El humo de tabaco es una mezcla compleja de más de 4.700 compuestos químicos, que incluye altas concentraciones de oxidantes ¹⁸¹. Los oxidantes de vida corta, como el $O_2^{\cdot-}$ y el óxido nítrico (NO), se encuentran predominantemente en la fase gaseosa. El NO y el $O_2^{\cdot-}$ reaccionan inmediatamente para formar moléculas de peroxinitrito ($ONOO^{\cdot}$) altamente reactivas ¹⁸². Los radicales procedentes de la fase de alquitrán son de naturaleza orgánica, como las semiquinonas de larga duración, que pueden reaccionar con el $O_2^{\cdot-}$ para formar $^{\cdot}OH$ y H_2O_2 ¹⁸². El humo de tabaco supone, por lo tanto, la principal fuente de oxidantes de origen exógeno.

1.6.1.1.2 Especies Reactivas de Oxígeno de origen celular

El epitelio bronquial actúa como una barrera defensiva para mantener la función normal de los pulmones. Las células epiteliales bronquiales forman una interfaz entre el medio interno y el ambiente externo, evitando el paso de partículas inhaladas. El humo de tabaco daña directamente el epitelio bronquial causando la liberación a su vez de ERO, lo que contribuye al daño del tejido pulmonar, y de factores endógenos, que desencadenan una respuesta inflamatoria caracterizada por la activación de y el reclutamiento de células inflamatorias como los macrófagos residentes, neutrófilos, eosinófilos, monocitos y linfocitos ^{115,173,183}. Una vez reclutadas y/o activadas, las células inflamatorias pueden generar ERO en respuesta a diversos estímulos, incluidas las citocinas ¹⁷⁵. La activación de macrófagos, neutrófilos y eosinófilos

genera $O_2^{\bullet -}$ que se convierte rápidamente en H_2O_2 bajo la influencia de la superóxido dismutasa (SOD), y se forma $^{\bullet}OH$ de forma no enzimática en presencia de Fe^{2+} como reacción secundaria¹⁸⁴.

Las ERO y otras especies reactivas también pueden generarse intracelularmente a partir de varias fuentes, como la cadena de transporte de electrones mitocondrial, xantina oxidasa o la óxido nítrico sintasa (NOS). Sin embargo, la principal enzima generadora de ERO es la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa (NADPH oxidasa), un complejo sistema enzimático que está presente en los fagocitos y las células epiteliales. Además de la NADPH oxidasa, los fagocitos emplean otras enzimas para producir ERO y otros potentes oxidantes, mediante la participación de la actividad de la mieloperoxidasa (MPO) o peroxidasa de los eosinófilos^{173,175}.

1.6.1.1.3 Defensas antioxidantes

El pulmón contrarresta el daño inducido por las ERO con una amplia variedad de defensas antioxidantes. Este sistema antioxidante endógeno incluye antioxidantes de pequeño peso molecular (vitamina E, melatonina, glutatión (GSH), ácido úrico, etc.), enzimas antioxidantes clásicas (SOD, catalasa y glutatión peroxidasa (GPx)), otras enzimas antioxidantes (peroxiredoxinas (PRX), tioredoxinas (TRX)), enzimas detoxificadoras de fase II (isozimas de la glutatión-S-transferasa (GST), NADP(H) quinona oxidoreductasa (NQO1), etc.), proteínas de respuesta al estrés (hemo oxigenasa 1 (HO-1 o HMOX-1), ferritina, etc.), mucinas (MUC) y proteínas de unión a metales (lactoferrina, transferrina, metalotioneína, etc.)¹⁸⁵. El factor nuclear eritroide 2 (del inglés, Nuclear Factor Erythroid 2-related factor, Nrf2) induce la expresión de la mayoría de las enzimas antioxidantes y desintoxicantes, lo que hace que este factor sea esencial para activar el sistema de defensa antioxidante¹⁸⁶. Este factor es la diana a estudiar en esta tesis y nos centraremos en él más adelante.

1.6.3 Efectos del incremento del estrés oxidativo

El aumento del estrés oxidativo es uno de los principales mecanismos responsable de la fisiopatología de la EPOC y tiene varios efectos en los pulmones (**Figura 11**).

1.6.3.1 Reducción de las defensas antioxidantes

Diferentes estudios han mostrado que el tabaquismo y las exacerbaciones de la EPOC provocan una disminución de la capacidad antioxidante en el plasma ^{187,188}. La disminución de la capacidad antioxidante puede ser, en parte, explicada debido al incremento de las ERO liberadas por los neutrófilos de la sangre periférica ¹⁸⁷. Hay evidencias claras que los oxidantes del humo de tabaco disminuyen de forma significativa los niveles plasmáticos de antioxidantes ¹⁸⁹. Diferentes estudios han mostrado que fumadores crónicos presentan una disminución en los antioxidantes, ácido ascórbico, tocoferol, B-caroteno y selenio ¹⁹⁰⁻¹⁹².

El GSH es uno de los antioxidantes de bajo peso molecular por excelencia que juega un importante papel protector, junto con sus enzimas redox, en los espacios aéreos y en las células epiteliales frente a los oxidantes. Se ha visto que la exposición de células epiteliales al condensado de humo de tabaco in vitro produce una disminución inicial de los niveles de GSH intracelular con un incremento rebote después de 12 horas. Este efecto in vitro en los niveles de GSH se produce de forma similar in vivo, en los pulmones de rata tras la instilación intratraqueal de condensado de humo de tabaco ^{193,194}.

Diferentes estudios han mostrado que las actividades de las enzimas antioxidantes SOD, glutatión-S-transferasa y GPx se encuentran disminuidas en los macrófagos alveolares de los fumadores de edad avanzadas, mientras que estos niveles están aumentados en fumadores jóvenes ^{195,196}.

También puede haber una reducción de los antioxidantes endógenos en los pacientes con EPOC como resultado de la reducción de los niveles de NRF2 que regula muchos genes antioxidantes⁴.

1.6.3.2 Amplificación de la respuesta inflamatoria y expresión génica

Muchas de las vías de señalización intracelular que se desencadenan y/o impulsan la liberación de los diferentes mediadores inflamatorios implicados en la EPOC son sensibles al estrés oxidativo, ya que incorporan dianas moleculares sensibles al redox, como el factor NF- κ B ¹⁷⁰. El estrés oxidativo activa al factor NF- κ B, que active múltiple genes inflamatorios contribuyendo a la inflamación neutrofílica, al enfisema y a la fibrosis de las vías aéreas menores ¹⁹⁷. IL-8, TNF- α y NO son algunos de los mediadores inflamatorios regulados por el factor NF- κ B.

La expresión y la activación del NF- κ B están aumentadas en la EPOC, especialmente en las células epiteliales de las vías aéreas y los macrófagos ¹⁹⁸. En consecuencia, el número de linfocitos T y B y de macrófagos están aumentados en la EPOC, con una mayor expresión de citocinas, quimiocinas y otras proteínas inflamatorias por parte de los macrófagos ¹¹⁷. Por lo tanto, la activación del NF- κ B en los monocitos/macrófagos puede desencadenar la liberación de mediadores proinflamatorios en el líquido epitelial pulmonar, lo que amplificaría la cascada inflamatoria mediante la activación de las células epiteliales y el reclutamiento de neutrófilos en las vías aéreas ¹⁸⁶.

Por otro lado se ha visto que el estrés oxidativo debido al humo de tabaco puede aumentar la expresión de enzimas antioxidantes como la HO-1 o enzimas involucradas en la síntesis de GSH como la γ -glutamylcisteina sintetasa ¹⁹⁹⁻²⁰¹.

Así pues, el estrés oxidativo, incluido el producido por el humo del cigarrillo, provoca un aumento de la expresión génica tanto de los genes proinflamatorios, por la activación de NF- κ B mediada por los oxidantes, como de la activación de genes protectores, como γ -glutamylcisteina sintetasa o HO-1. Por lo tanto, puede existir un equilibrio entre la expresión de genes pro y antiinflamatorios en respuesta al humo del cigarrillo.

1.6.3.3 Remodelado de la matriz extracelular

Se ha demostrado que el estrés oxidativo está implicado en la remodelación de la matriz extracelular en las lesiones pulmonares ²⁰². La disminución de los niveles de GSH intracelular se ha asociado con la activación de las MMP, lo que conlleva un aumento de la degradación de la matriz extracelular alveolar en los pulmones ya que se encargan de la degradación de la elastina, componente de la matriz extracelular ^{175,203}. El estrés oxidativo aumenta la expresión de la MMP-9, una enzima elastolítica clave implicada en el enfisema. El estrés oxidativo, además, potencia aún más la elastólisis ya que inactiva la AAT y el inhibidor de la leucoproteasa secretora, principales inhibidores de la elastasa neutrofílica, lo que da lugar a una mayor actividad elastolítica ^{170,204}. Los macrófagos alveolares obtenidos de pacientes fumadores con EPOC liberan mayores cantidades de la enzima elastolítica MMP-9 en comparación con los macrófagos alveolares de los no fumadores, además se ha visto que el medio de cultivo condicionado por el humo del cigarrillo aumenta la liberación de MMP-9 en macrófagos ¹⁶⁹.

1.6.3.4 Apoptosis

La apoptosis o muerte celular programada de los leucocitos es un mecanismo importante en la resolución de la inflamación y las ERO están implicadas en la mediación de los procesos apoptóticos²⁰⁵. Estudios recientes han demostrado que macrófagos y células epiteliales aéreas expuestas a humo de tabaco sufren un proceso de apoptosis²⁰⁶⁻²⁰⁸. Asimismo, también se ha visto que la exposición a humo de tabaco genera apoptosis de las células endoteliales y ésta está presente en los pulmones enfisematosos. Esto puede deberse a la formación de carbonilos reactivos por la oxidación de proteínas mediada por el humo del cigarrillo²⁰⁹⁻²¹¹. La disminución de los niveles de GSH intracelular que se produce tras la exposición de las células al humo de tabaco puede desempeñar un papel en la regulación de la apoptosis²¹².

1.6.3.5 Otros

La capacidad de los corticosteroides para reprimir la expresión de genes proinflamatorios también se ve afectada en la EPOC como resultado del estrés oxidativo y está mediada por la reducción de la actividad y la expresión de la histona deacetilasa-2 (HDAC2), que es necesaria para la supresión de los genes inflamatorios²¹³.

Los pacientes con EPOC parecen presentar una aceleración del proceso normal de envejecimiento pulmonar y la acumulación de células senescentes²¹⁴. Esto parece deberse a la activación de las vías de senescencia celular y a la pérdida de moléculas antienvjecimiento endógenas, como la sirtuina-1. El estrés oxidativo puede acelerar el acortamiento de los telómeros, lo que lleva a la activación de la respuesta al daño del ADN que conduce a la detención del ciclo celular, pero también puede activar la vía de senescencia inducida por el estrés²¹⁵. Un estudio prospectivo mostró una asociación entre el acortamiento acelerado de los telómeros (un marcador de envejecimiento acelerado) y el empeoramiento progresivo del intercambio gaseoso pulmonar, la hiperinflación pulmonar y la afección extrapulmonar²¹⁶. El estrés oxidativo reduce la actividad y la expresión de la enzima sirtuina-1, lo que se asocia a un aumento de la acetilación de NF- κ B y de la expresión de MMP-9²¹⁷.

Existen cada vez más pruebas de una respuesta autoinmune en los pulmones de pacientes con EPOC, especialmente en los estadios más graves, con la presencia de autoanticuerpos contra células epiteliales y endoteliales²¹⁸. El estrés oxidativo puede provocar la carbonilación de las proteínas ("estrés carbonílico"), lo que crea neoantígenos contra los que pueden desarrollarse

autoanticuerpos. En los pacientes con EPOC hay pruebas de la existencia de autoanticuerpos contra las proteínas carboniladas, lo que puede contribuir al daño del parénquima pulmonar ²¹⁹.

Además de todo esto, el estrés oxidativo provoca daños directos en el ADN. Hay un aumento en la expresión de 8-hidroxi-2-deoxiguanosina, un biomarcador de daño oxidativo del ADN, en los pulmones de fumadores y de pacientes con EPOC, lo refleja el estrés oxidativo del tabaquismo ²²⁰. La expresión nuclear de la proteína de reparación del ADN Ku86 se reduce significativamente en la EPOC en comparación con los pulmones de fumadores normales ²²⁰. La reducción de Ku86 también se observa en ratones expuestos al estrés oxidativo del humo de tabaco y en células epiteliales bronquiales expuestas a H₂O₂ ²²¹.

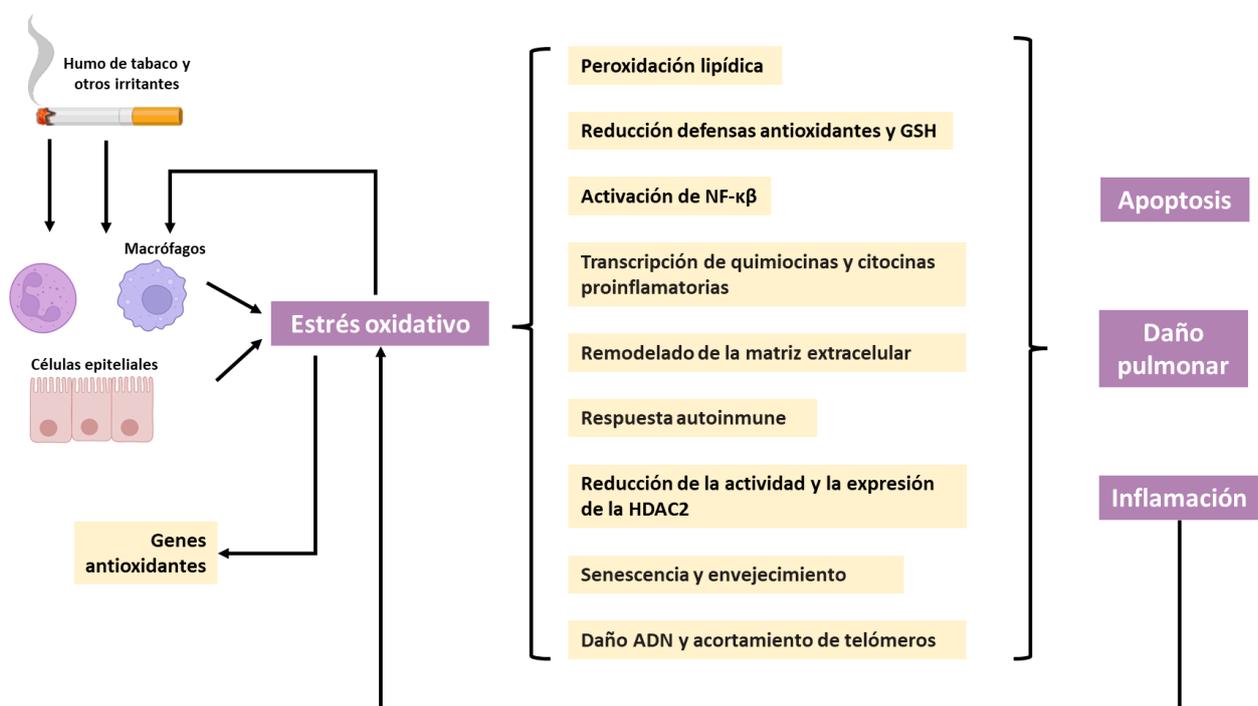


Figura 11. Diagrama de los efectos del estrés oxidativo generado por el humo de tabaco.

1.7 Fisiopatología

Los mecanismos patogénicos mencionados anteriormente tienen como resultado los cambios patológicos característicos de la EPOC (bronquitis crónica, bronquiolitis y enfisema). Estos cambios patológicos dan lugar, a su vez, a anomalías fisiológicas: hipersecreción de moco, obstrucción del flujo aéreo e hiperinflación, anomalías en el intercambio de gases, hipertensión pulmonar y efectos sistémicos ¹⁰⁶.

Limitación crónica del flujo aéreo y atrapamiento aéreo. El lugar principal de la obstrucción del flujo de aire se produce en las pequeñas vías respiratorias conductoras de < 2 mm de diámetro. Esto se debe a la inflamación y estrechamiento (remodelación de las vías respiratorias) y a los exudados inflamatorios en las vías respiratorias menores. Otros factores que contribuyen a la obstrucción del flujo aéreo son la pérdida del retroceso elástico del pulmón (debido a la destrucción de las paredes alveolares) y la destrucción del soporte alveolar (de las uniones alveolares). La obstrucción de las vías respiratorias atrapa progresivamente el aire durante la espiración, lo que provoca una hiperinflación en reposo y una hiperinflación dinámica durante el ejercicio. La hiperinflación reduce la capacidad inspiratoria y, por tanto, la capacidad residual funcional durante el ejercicio. Estas características dan lugar a la disnea y a la capacidad de ejercicio limitada típicas de la EPOC. La mejor forma de medir la obstrucción del flujo aéreo en la EPOC es mediante la espirometría y es un requisito para su diagnóstico ^{106,222,223} (**Figura 12**).

Anomalías en el intercambio gaseoso. Las anomalías en el intercambio de gases provocan hipoxemia (disminución en el nivel de oxígeno en sangre arterial) e hipercapnia (aumento del nivel de dióxido de carbono en sangre arterial), y se generan principalmente por una distribución anormal de las relaciones ventilación:perfusión, debido a los cambios anatómicos que se encuentran en la EPOC. El grado de deterioro de la capacidad de difusión del monóxido de carbono por litro de volumen alveolar se correlaciona bien con la gravedad del enfisema ^{106,223}.

Hipersecreción de moco. La hipersecreción de moco, que da lugar a una tos productiva crónica, es una característica de la bronquitis crónica y no está necesariamente asociada a la limitación del flujo aéreo. Por otro lado, no todos los pacientes con EPOC tienen hipersecreción de moco sintomática. Cuando está presente, la hipersecreción de moco se debe a un aumento del número de células caliciformes y al agrandamiento de las glándulas submucosas, debido a la irritación crónica de las vías aéreas por el humo del tabaco y otros agentes nocivos ^{106,224}.

Hipertensión pulmonar. La hipertensión pulmonar puede desarrollarse de forma tardía en el curso de la EPOC. Los factores que contribuyen a ello son la constricción arterial pulmonar (como resultado de la hipoxia), la disfunción endotelial, la remodelación de las arterias pulmonares (hipertrofia e hiperplasia del músculo liso) y la destrucción del lecho capilar pulmonar ^{106,225}. Incluso en la EPOC leve, o en los fumadores susceptibles de padecer enfisema, existen anomalías en el flujo sanguíneo microvascular pulmonar, que empeoran con la progresión de la enfermedad ^{106,226}

Exacerbaciones. En los pacientes con EPOC es común que se produzcan exacerbaciones de los síntomas respiratorios que suelen estar desencadenadas por infecciones respiratorias con bacterias o virus (que pueden coexistir), contaminantes ambientales o factores desconocidos; durante los episodios de infección bacteriana o vírica se produce una respuesta característica con un aumento de la inflamación. Durante estas exacerbaciones se produce un aumento de la hiperinsuflación y del atrapamiento aéreo, con una reducción del flujo espiratorio, lo que explica el aumento de la disnea ²²⁷. También se observan un aumento de la inflamación de las vías aéreas. Otras afecciones (neumonía, tromboembolismo e insuficiencia cardíaca aguda) pueden imitar o agravar una exacerbación de la EPOC ^{4,106}.

Algunos pacientes son especialmente propensos a las exacerbaciones, mientras que otros no. Dos o más exacerbaciones durante el año anterior es el indicador más importante de una exacerbación futura. Las exacerbaciones aceleran el deterioro de la función pulmonar que caracteriza a la EPOC, lo que provoca una reducción de la actividad física, una peor calidad de vida y un mayor riesgo de muerte; también son responsables de una gran proporción de los costes sanitarios atribuibles a la EPOC ⁷.

Alteraciones sistémicas. La mayoría de los pacientes con EPOC tienen enfermedades crónicas concomitantes relacionadas con los mismos factores de riesgo, es decir, el tabaquismo, el envejecimiento y la inactividad, que pueden tener un impacto importante en el estado de salud y la supervivencia ²²⁸. La limitación del flujo aéreo y, en particular, la hiperinsuflación, afectan a la función cardíaca y al intercambio de gases ²²⁷. Los mediadores inflamatorios en la circulación pueden contribuir al desgaste del músculo esquelético y a la caquexia, y pueden iniciar o empeorar comorbilidades como la cardiopatía isquémica, la insuficiencia cardíaca, la osteoporosis, la anemia normocítica, la diabetes y el síndrome metabólico ⁴.

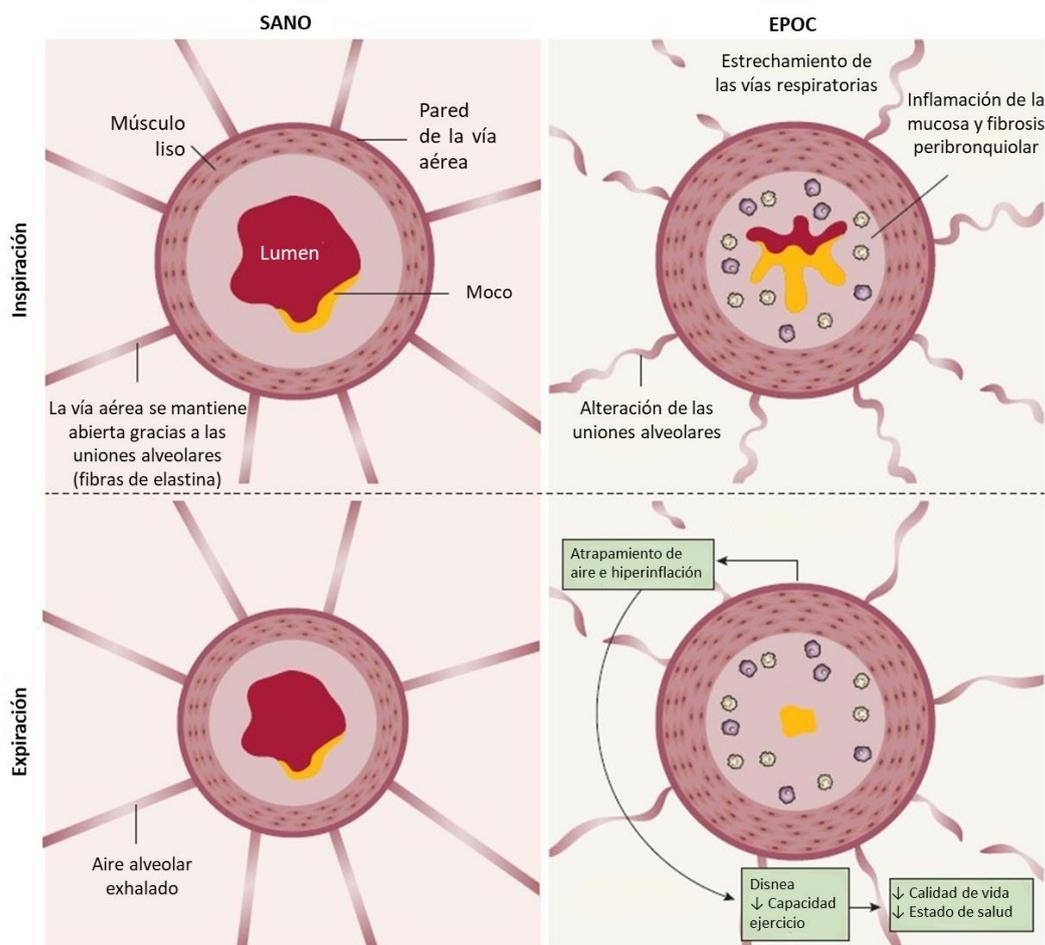


Figura 12. Atrapamiento aéreo. En individuos sanos, las vías respiratorias se estrechan pero no se cierran porque las fibras de elastina en las uniones alveolares las mantienen abiertas, permitiendo la espiración del aire alveolar. En aquellos pacientes con EPOC, las vías respiratorias se estrechan y las uniones alveolares se alteran debido al enfisema, lo que conduce al cierre de las vías respiratorias al expirar. Este cierre da lugar a un atrapamiento del aire alveolar, que empeora con el ejercicio (hiperinflación dinámica), dando lugar a una disnea de esfuerzo y a una reducción de la tolerancia al ejercicio, y conduce a un marcado deterioro de calidad de vida y estado de salud. (Figura adaptada de Barnes PJ et al. 2015 ²).

1.8 Tratamiento clínico

El tratamiento de la EPOC tiene como objetivo reducir la sintomatología, reducir la frecuencia y la severidad de las exacerbaciones y mejorar la tolerancia a la actividad física y el estado de salud, con el fin de conseguir una mejora en la calidad de vida del paciente ⁴. Por ello, el tratamiento para la EPOC no solo incluye terapias farmacológicas, sino que las combina además con actividad física y el cese del tabaquismo. Como en cualquier enfermedad, el control y la reducción de los factores de riesgo constituyen un elemento fundamental en la prevención; en el caso de la EPOC es de vital importancia el cese del tabaquismo, ya que además de reducir el

riesgo de desarrollo de la enfermedad, también influye en su progresión ²²⁹. Por otro lado, a pesar del gran impacto social y económico de la EPOC, no existen terapias farmacológicas que prevengan significativamente su desarrollo, frenen su avance o reduzcan la mortalidad asociada ²³⁰. Por lo tanto, el descubrimiento y desarrollo de terapias capaces de ralentizar o revertir el progreso de la enfermedad supondría un gran avance en la terapéutica de la EPOC ²³¹.

1.8.1 Tratamiento farmacológico

Los tratamientos más usados en la EPOC se muestran en la **Tabla 4**. La elección de cada tratamiento depende tanto de la obtención de una respuesta clínica favorable equilibrada con los efectos secundarios como de la disponibilidad y el coste de la medicación. Cada tratamiento debe ser individualizado, ya que la relación entre la gravedad de los síntomas, la limitación del flujo de aire y la gravedad de las exacerbaciones puede variar entre los pacientes ⁴.

Broncodilatadores

Los broncodilatadores son fármacos que incrementan el VEF₁ y/o cambian otra variable espirométrica, principalmente mejoran la limitación del flujo aéreo que caracteriza a la EPOC. Actúan 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 ⁴.

Agonistas β₂. La acción principal de los agonistas β₂ es relajar el músculo liso de las vías aéreas mediante la estimulación de los receptores β₂-adrenérgicos, lo que aumenta el monofosfato de adenosina cíclico (AMPC) y produce un antagonismo funcional sobre la broncoconstricción ²²⁹. Existen dos subtipos de agonistas β₂, los de acción corta (SABA de sus siglas en inglés) (Fenoterol, Levalbuterol, Salbutamol, Terbutalina) y los de acción larga (LABA, de sus siglas en inglés) (Formoterol, Arformoterol, Indacaterol, Salmeterol, Tulobuterol) ⁴. El efecto de los SABA suele desaparecer en 4 a 6 horas, mientras que los LABA muestran una duración de 12 horas o más, sin excluirse la posibilidad de tratamiento adicional con SABA ²³²⁻²³⁴. Los β-agonistas de acción corta se recomiendan como tratamiento inicial de la EPOC, utilizándose los de acción larga para el tratamiento de los pacientes en estadios más avanzados que no responden adecuadamente al tratamiento con los anteriores ⁴.

Anti-colinérgicos/anti-muscarínicos. Estos fármacos inhiben el efecto broncoconstrictor de la acetilcolina sobre los receptores muscarínicos M₃ que se expresan en el músculo liso de las vías

aéreas, antagonizando, así, el tono colinérgico endógeno ^{235,236}. Existen dos subtipos, los de acción corta (SAMA, del inglés short-acting muscarinic antagonist) (bromuro de ipratropio y bromuro de oxitropio) y los de acción larga (LAMA, del inglés long-acting muscarinic antagonist) (tiotropio, aclidinio, bromuro de gliocopirronio y umeclidinio) ⁴.

Tratamiento broncodilatador combinado. La combinación de broncodilatadores con diferentes mecanismos de acción y duraciones puede mejorar la eficacia con un menor riesgo de efectos secundarios en comparación con el aumento de la dosis de un solo broncodilatador ^{234,237,238}. Cada uno de los dos broncodilatadores que se usan en combinación están dirigidos a receptores completamente diferentes que actúan juntos para lograr un efecto en un lugar diferente de los músculos de las vías aéreas responsables de la obstrucción, se aumenta así, el efecto broncodilatador ²³⁸. Se ha visto que los efectos de las combinaciones de SABAs y SAMAs son superiores en comparación con cualquiera de los dos medicamentos por sí solos en la mejora del VEF₁ y los síntomas ²³⁹. Asimismo, existen numerosas combinaciones de un LABA y un LAMA en un solo inhalador. Estas combinaciones mejoran la función pulmonar en comparación con el placebo; esta mejora es sistemáticamente mayor que los efectos de monoterapia broncodilatadora de larga duración ^{234,240}. De hecho, diferentes ensayos clínicos han demostrado que el tratamiento combinado de LABA/LAMA, por ejemplo indacaterol/glicopirronio o salbutamol/ipatropio, presenta una mayor mejora de la calidad de vida y de los síntomas, como la función pulmonar y la disnea, y previene las agudizaciones en comparación con el placebo o con sus componentes broncodilatadores individuales ²⁴¹⁻²⁴⁴.

Metilxantinas

Existe controversia sobre los efectos exactos de los derivados de la xantina. Una de sus posibles acciones es la inhibición no selectiva de la fosfodiesterasa, pero también se ha visto que tienen cierta acción broncodilatadora ²⁴⁵⁻²⁴⁷.

La teofilina es la metilxantina más utilizada y constituye un tratamiento clásico de la EPOC. La teofilina tiene un efecto positivo sobre la fuerza del diafragma, un aumento del rendimiento de los músculos respiratorios, una reducción del atrapamiento aéreo, una mejoría del aclaramiento mucociliar y una reducción de las agudizaciones ²⁴⁸. Sin embargo, la teofilina, utilizada inicialmente como broncodilatador, ha sido relegada por sus modestos efectos comparados con otros broncodilatadores actuales.

Antiinflamatorios

La EPOC es una enfermedad que cursa con una reacción inflamatoria de las vías aéreas frente a factores desencadenantes como el humo de tabaco e infecciones desencadenantes de las exacerbaciones. De hecho, en el estudio anatomopatológico del lavado broncoalveolar de pacientes con EPOC se observa un incremento de macrófagos, neutrófilos y eosinófilos ²⁴⁹. Por lo tanto, el tratamiento farmacológico antiinflamatorio debe tenerse en consideración, sobre todo durante los episodios de exacerbación.

Corticosteroides. Los corticosteroides, son hormonas que operan fisiológicamente en dosis pequeñas aunque también existe una amplia oferta de corticosteroides sintéticos de uso clínico. Se unen al receptor de glucocorticoides, el cual actúa como un factor de transcripción inducible por ligando. En muchas ocasiones los pacientes EPOC son resistentes incluso altas dosis de corticosteroides inhalados u orales y estos fármacos, además, aportan pocos beneficios clínicos ¹¹⁹. Son múltiples los estudios que ponen en evidencia la pérdida de respuesta con el tiempo a los corticosteroides en varias enfermedades inflamatorias, entre ellas la EPOC ³.

Corticosteroides inhalados. Los corticosteroides inhalados (ICS) constituyen el principal tratamiento anti-inflamatorio de pacientes con asma. Sin embargo, 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 ²⁵⁰. Diversos estudios han demostrado el tratamiento con ICS en monoterapia no mejora a largo plazo la disminución de la VEF₁ ni la mortalidad en pacientes EPOC ^{251,252}. En la mayoría de los pacientes EPOC los ICS se utilizan en combinación con broncodilatadores de larga duración. Se ha visto que en pacientes con EPOC de moderada a muy severa y episodios de exacerbación, el tratamiento con ICS en combinación con un LABA es más efectivo que cualquiera de los fármacos por separado en la mejora de la función pulmonar, el estado de salud y la disminución de las exacerbaciones ^{253,254}. Algunos de los corticosteroides inhalados son beclometasona, budesonida y fluticasona.

Corticosteroides orales. Los corticosteroides orales tienen numerosos efectos secundarios, entre ellos la miopatía por esteroides ²⁵⁵. El uso de corticosteroides sistémicos para el tratamiento de los episodios de exacerbaciones agudas en pacientes hospitalizados o de urgencias, reduce la tasa de fracaso de los tratamientos, la tasa de recaídas y mejora la función pulmonar y la disnea ²⁵⁶. Por el contrario, el uso de estos corticosteroides a largo plazo en pacientes EPOC estables no ha demostrado ningún beneficio frente a la alta tasa de

complicaciones sistémicas, por lo que su uso no es recomendable en estos casos ^{257,258}. Algunos de los corticosteroides orales sistémicos son prednisona y metilprednisolona.

Inhibidores de fosfodiesterasa 4. La acción principal de los inhibidores de la fosfodiesterasa 4 (PDE4) es reducir la inflamación mediante la inhibición de la descomposición del AMPc ²⁵⁹. El primer y único inhibidor de la PDE4 aprobado para el tratamiento de la EPOC severa es el roflumilast. Este medicamento reduce las exacerbaciones combinado con corticoides orales en pacientes EPOC en estadio GOLD 3 y 4 con antecedentes de exacerbaciones y bronquitis crónica ²⁶⁰. Dichos efectos sobre la función pulmonar también se observan cuando se añade roflumilast a broncodilatadores inhalados de acción prolongada; no se han publicado estudios comparativos con corticosteroides inhalados ^{4,37}.

Antibióticos

La mayoría de las exacerbaciones en la EPOC están causadas por infecciones de las vías aéreas, muchas de ellas infecciones bacterianas. Por lo tanto, debe considerarse la administración de antibióticos al inicio del tratamiento de las exacerbaciones de la EPOC ²⁶¹. Aunque estudios antiguos reportaban que el uso continuado de antibióticos no tenía efectos en la frecuencia de las exacerbaciones ^{262,263}. Sin embargo estudios más recientes han demostrado que el uso de antibióticos de forma regular puede reducir la tasa de exacerbaciones y que el tratamiento con antibióticos tiene un efecto pequeño pero importante en la recuperación clínica y el resultado en pacientes con exacerbaciones agudas de bronquitis crónica y enfisema en pacientes ^{264–266}. Algunos de los antibióticos utilizados incluyen doxiciclina, trimetoprima-sulfametoxazol, amoxicilina-ácido clavulánico, eritromicina o azitromicina.

Antioxidantes

La terapia antioxidante puede afectar a importantes aspectos de la EPOC, como la superación de la resistencia a los esteroides, la hipersecreción de moco, la inflamación y la remodelación de la matriz extracelular ¹⁷⁵. Se han investigado varios compuestos antioxidantes de moléculas pequeñas en ensayos preclínicos y clínicos. Se ha visto que en pacientes EPOC que no reciben ICS, el tratamiento con mucolíticos como carbocisteína y n-acetilcisteína puede reducir las exacerbaciones y mejorar el estado de salud, aunque modestamente ^{267–269}. Aunque los tratamientos con antioxidantes han mostrado efectos prometedores en la lucha contra las ERO

y las respuestas celulares adversas asociadas, es necesario investigar o desarrollar nuevas moléculas antioxidantes con buena biodisponibilidad y potencia para los ensayos clínicos de la EPOC ¹⁷⁵.

Vacunación

La mayoría de los episodios de exacerbaciones se desarrollan tras una infección de las vías respiratorias. Estas infecciones pueden ser bacterianas, pero en muchos de los casos son de origen vírico. Por ese motivo la vacunación es esencial para la prevención de las exacerbaciones en pacientes EPOC.

La vacunación contra la gripe puede reducir las manifestaciones más graves (como las infecciones de las vías aéreas que requieren hospitalización) y la muerte en los pacientes con EPOC ^{270,271}. Sólo unos pocos estudios han evaluado las exacerbaciones y han mostrado una reducción significativa del número total de exacerbaciones por sujeto vacunado en comparación con los que recibieron placebo. Se recomiendan las vacunas que contienen virus muertos o inactivados, ya que son más eficaces en los pacientes de edad avanzada con EPOC.

Se recomienda la vacunación antineumocócica, PCV13 y PPSV23, para todos los pacientes mayores de 65 años. La PPSV23 también se recomienda para los pacientes con EPOC más jóvenes con condiciones comórbidas significativas, incluyendo enfermedades cardíacas o pulmonares crónicas ²⁷². Se ha demostrado que las vacunas antineumocócicas reducen la incidencia de neumonía adquirida en la comunidad en pacientes con EPOC menores de 65 años o comorbilidades ²⁷³.

A los pacientes adultos con EPOC se les recomienda también vacunarse con la vacuna Tdap para prevenir el tétanos, la difteria y la tos ferina, en aquellos que no fueron vacunados en la adolescencia y con la vacuna contra el virus Zoster ^{274,275}. Además, se recomienda que todos los pacientes EPOC reciban la vacuna del COVID-19 ²⁷⁶.

Otros tratamientos farmacológicos.

En los últimos años ha mejorado considerablemente el conocimiento de los mecanismos celulares y moleculares implicados en la fisiopatología de la EPOC. Esto ha contribuido a la identificación de nuevas dianas terapéuticas y el desarrollo de nuevas terapias.

Algunos ejemplos son terapias basadas en anticuerpos monoclonales, como el anticuerpo monoclonal anti-IL-5 mepolizumab y el anticuerpo anti IL-5-receptor- α benralizumab ^{277,278}, utilizadas en pacientes EPOC severa y que reducen la frecuencia de exacerbaciones. Otro ejemplo es el tratamiento con anticuerpos anti-TNF- α , infliximab, sin embargo no hay estudios que evidencien ningún beneficio en pacientes EPOC de moderada a severa ²⁷⁹. Otro tratamiento utilizado es la terapia de incremento de alfa-1 antitripsina en pacientes EPOC con esta deficiencia genética ⁴.

Existen otros ejemplos de nuevas terapias en desarrollo como los inhibidores de cinasas (losmapimod, GSK2269557, LAS194046 o LAS189386), inhibidores de distintas proteasas, antagonistas de mediadores o quimiocinas. Estas nuevas terapias están recogidas en la revisión de ²⁸⁰.

Tabla 4. Terapia farmacológica empleada actualmente en el tratamiento de pacientes con EPOC estable. (Extraída de Revisión GOLD, 2022 ⁴).

GRUPO FARMACOLÓGICO	TIPO	SUBTIPO
Broncodilatadores	β_2 -agonistas	LABA
		SABA
	Antimuscarínicos	LAMA
		SAMA
Corticosteroides inhalados (ICS)	Metilxantinas	
Glucocorticoides orales		
Inhibidores de fosfodiesterasa 4	Roflumilast	
Combinaciones	LABA/LAMA	
	ICS/LABA	
	ICS/LABA/LAMA	
Otros tratamientos	Vacunación	
	Antibióticos	
	Antioxidantes	
	Mucolíticos	
	Antitusivos	
	Otros fármacos con potencial antiinflamatorio	

Abreviaturas: ICS: Corticosteroides inhalados. LABA: β_2 -agonistas de larga duración. LAMA: Antagonistas del receptor muscarínico de larga duración. SABA: β_2 -agonistas de corta duración. SAMA: Antagonistas del receptor muscarínico de corta duración.

1.9 Modelos animales

El establecimiento de modelos animales que puedan reproducir una enfermedad, total o parcialmente, es una herramienta fundamental para profundizar en los diferentes mecanismos que subyacen en la enfermedad pero también para el descubrimiento de nuevas dianas terapéuticas y el desarrollo de nuevas terapias. En el caso de la EPOC existen multitud de modelos para simular los aspectos más característicos de la enfermedad, como son el daño tisular, el desarrollo de enfisema, inflamación crónica o aguda con afluencia de neutrófilos, macrófagos y linfocitos y la liberación de mediadores de inflamación. Sin embargo, hasta la fecha no se han conseguido desarrollar verdaderos modelos de EPOC que pueden reproducir la heterogeneidad de esta enfermedad y en la mayoría de los casos solo llegan a representar los estadios más leves de ésta ²⁸¹.

La exposición al humo de tabaco es el principal factor de riesgo de la EPOC, por lo que es lógico que el modelo de exposición al humo de tabaco sea el más ampliamente utilizado. Sobre este modelo existen diferentes variantes relacionadas con el tiempo de exposición, la asociación de otros inductores o inhibidores, las exacerbaciones o el uso de animales transgénicos. Existen por otro lado modelos que no conllevan la exposición a humo de tabaco ²⁸¹.

Modelos EPOC por exposición al humo de tabaco

Los modelos por exposición al humo de tabaco son los que reflejan de una forma más precisa los mecanismos inflamatorios y patogénicos de la enfermedad ²⁸¹. Este modelo se ha desarrollado en numerosas especies animales, de ellas las cobayas y los ratones han demostrado ser las más susceptibles ²⁸². Existen dos procedimientos generales para la administración del humo de tabaco (**Figura 13**):

- “Nose only”: la combustión del cigarrillo es conducida directamente al hocico del animal
- “Whole body”: el animal es expuesto íntegramente en una cámara a una concentración controlada de humo ^{283,284}.

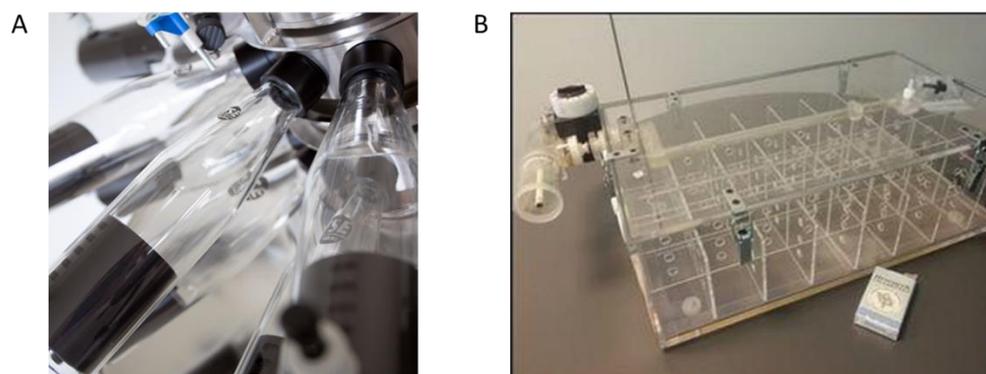


Figura 13. Imagen de sistema nose only (A) e imagen del sistema whole body (B). (Imágenes obtenidas de www.tse-systems.com/inhalation/ y Pérez-Rial et al, 2015 ²⁸¹).

En el modelo de exposición crónica se suele requerir un periodo de exposición de 3 a 6 meses ²⁸⁵, aunque a partir del segundo mes ya se detectan importantes cambios inflamatorios y morfométricos ²⁸⁶. A pesar de no alcanzarse las características propias de los estadios más graves de la EPOC, sí que se consiguen desarrollar las características principales de la enfermedad como la afluencia de neutrófilos y macrófagos, la presencia de linfocitos T CD4 y CD8, la hipersecreción de moco, los cambios en la función pulmonar, la liberación de mediadores inflamatorios (IL-8, TNF- α , IL-1 β ,...), la generación de enfisema y el remodelado vascular y de las vías aéreas ^{287,288}. En los modelos de exposición a corto plazo (de 1 día a 4 semanas), no se consiguen desarrollar algunas de las características de la EPOC, como el enfisema, pero sí se logra obtener una respuesta inflamatoria aguda con afluencia de neutrófilos y macrófagos y la liberación de mediadores de inflamación ^{284,289}. En los modelos de exposición al humo de tabaco, tanto crónico como agudo, también se ha observado la generación de estrés oxidativo en el pulmón ²⁹⁰. Las exposiciones a humo de tabaco se pueden combinar con modelos de infecciones respiratorias para estudiar el impacto de las infecciones en la patogénesis de la enfermedad y sus papeles en las exacerbaciones ^{288,291–293}.

Modelos de exacerbaciones de la EPOC

Las exacerbaciones son episodios característicos de la EPOC que incrementan la progresión de enfermedad en términos de deterioro de la función pulmonar y una mayor agudización de la inflamación crónica de las vías aéreas. El desarrollo de modelos de exacerbación permite la determinación de los diferentes mecanismos implicados, la identificación de dianas terapéuticas y el desarrollo de nuevos tratamientos.

Modelos de exacerbación por instilación con LPS o infecciones bacterianas

Se estima que las infecciones bacterianas son responsables de más de la mitad de las exacerbaciones agudas de la EPOC. La administración de endotoxinas bacterianas por vía endotraqueal, intratraqueal o nasal genera un modelo inflamatorio que actúa a través de los mediadores que liberan los neutrófilos y los macrófagos reclutados, y que puede llegar a desencadenar enfisema ²⁹⁴. La endotoxina más utilizada es el lipopolisacárido (LPS), componente glicolípido de las bacterias gran-negativas con un gran efecto proinflamatorio. La administración intratraqueal se ha visto que produce una respuesta inflamatoria que se acompaña de fiebre, hipersecreción mucosa y broncoconstricción, síntomas de una exacerbación ²⁹⁵. Se sabe, además, que la administración de LPS produce la activación de mediadores como IL-8, IL-1, interferón gamma y potencia la lesión tóxica del oxígeno ²⁹⁶. La administración LPS puede ser única, crónica o en combinación con periodos cortos de exposición al humo de tabaco ^{297,298}. La administración crónica y con exposición a humo de tabaco puede generar enfisema ²⁹⁷.

Las bacterias aisladas de pacientes EPOC en las exacerbaciones suelen incluir especies con una enfermedad más grave incluyen especies más invasivas como *Pseudomonas aeruginosa* o *Chlamydia pneumoniae*. Sólo unos pocos estudios han investigado las exacerbaciones bacterianas en la EPOC utilizando modelos animales de infecciones bacterianas, pero éstos han mostrado un aumento de la susceptibilidad y de las respuestas inflamatorias a las infecciones o a las moléculas asociadas a la infección ^{291,299}. Se ha descrito que ratones expuestos a humo de tabaco, hay un aumento de los niveles de TNF- α , IL-1 β e IL-6 en los pulmones tras una infección aguda por *P. aeruginosa* ²⁹⁹. Un estudio ha demostrado que ratones infectados con *Haemophilus influenzae* después de 8 semanas de exposición al humo de tabaco tuvieron un aumento de la respuesta inflamatorias y un empeoramiento del daño pulmonar ²⁹³.

El factor NRF2 desempeña un papel crucial en la atenuación del estrés oxidativo ³⁰⁰. En los pacientes con EPOC, las respuestas antioxidantes dirigidas por el NRF2 están deterioradas y pueden contribuir a la amplificación de las respuestas inflamatorias durante las exacerbaciones. ³⁰¹. La activación de NRF2 puede mitigar las respuestas inflamatorias y mejorar las defensas innatas contra la infección bacteriana en pacientes con EPOC ³⁰².

Modelos de exacerbación infecciones virales

Los pacientes con EPOC tienen una mayor susceptibilidad a la infección por el virus de la gripe A y experimentan una respuesta inflamatoria excesiva a la infección ^{293,303,304}. En los modelos de

exposición aguda y crónica al humo de tabaco, tras la infección por el virus de la gripe A, se observa un aumento de la inflamación pulmonar y sistémica ^{292,304}. Se ha visto que la liberación de MMP-2 y MMP-9 están aumentadas tras la infección por el virus de la gripe en modelos de exposición aguda a humo de tabaco ³⁰⁵. Los modelos de infecciones virales permiten elucidar los mecanismos clave en las exacerbaciones y las posibles dianas terapéuticas.

Modelos enfisema por administración de proteasas

Diferentes estudios han demostrado que la instilación de diversas enzimas elastolíticas, incluyendo elastasa pancreática, elastasa neutrofílica y proteinasa 3, dan lugar a un agrandamiento de los espacios aéreos por proteólisis que reproduce un enfisema muy parecido al que presentan los pacientes con DAAT ³⁰⁶. Estos modelos sin embargo no permiten identificar qué proteasas están implicadas en la patogenia del enfisema producido por la exposición al humo de tabaco, ni tampoco permiten entender que procesos ocurren antes de la liberación de las proteasas ²⁸². El modelo más utilizado de este tipo es el de enfisema por elastasa, tanto pancreática porcina como neutrofílica humana. Hay fundamentalmente dos métodos para generar este modelo en ratones. El primero consiste en la administración de una única dosis de elastasa vía orofaríngea y se estudia la estructura y/o función de los pulmones entre 2 días y 4 semanas después del tratamiento. El segundo método consiste en exponer a los ratones repetidamente elastasa por vía intratraqueal y observar los efectos del tratamiento entre 1 y 4 semanas después de la última administración de la enzima ³⁰⁷. El modelo de enfisema por elastasa se usa principalmente por su simplicidad y ya que permite el estudio de los mecanismos implicados en la generación de los enfisemas, especialmente los mecanismos de reparación tisular ²⁸².

Otros modelos

Aunque los modelos animales de la EPOC más comunes son los explicados anteriormente existe una gran variedad de diferentes modelos. Por ejemplo, existen modelos de EPOC por exposición a contaminantes aéreos como partículas urbanas, gases, como el ozono, o una combinación de ambos, como el diésel ^{158,308}. Estos modelos se utilizan para dilucidar los efectos toxicológico de la contaminación y la respuesta inmune asociada en el pulmón ³⁰⁹. Estos modelos animales de exposición a contaminantes aéreos solos o en combinación con humo de tabaco permiten

estudiar como este factor de riesgo ambiental influye en el desarrollo y las exacerbaciones de la EPOC ³¹⁰.

Otro ejemplo de modelos animales de EPOC son los modelos por administración de agentes profibróticos como el cloruro de cadmio, constituyente del humo de tabaco, y que da lugar en un principio a una fibrosis intersticial peribronquiolar, que secundariamente origina un agrandamiento de los espacios aéreos distales, que se asemejan al enfisema de la EPOC ³⁰⁶. El polvo del carbón y del silicio también pueden dar lugar al desarrollo de enfisema de tipo focal, con un aumento de roturas del tejido conectivo y a un aumento también células polimorfonucleares y macrófagos ³¹¹.

En los estadios más graves de la EPOC se produce un deterioro de los mecanismo de reparación del pulmón que puede llevar a la generación de enfisema. Existen modelos de patología grave de EPOC basados en la combinación de la exposición al humo de tabaco y a la inhibición del factor VEGF y/o su receptor, lo que compromete la supervivencia de las células endoteliales y, por lo tanto, el programa de mantenimiento del pulmón ^{281,312}. Asimismo, diferentes estudios sugieren que hay una respuesta inmune adaptativa en la EPOC que persiste incluso después de fumar y que esta podría ser debida a una respuesta a autoantígenos ³¹³⁻³¹⁶. Se han desarrollado a partir de esta hipótesis modelos animales de enfisema autoinmunitario ^{317,318}, mediante la generación de autoanticuerpos antielastina ¹⁰⁹ y de otros autoantígenos ^{218,319}.

Por último, existen modelos transgénicos de la EPOC. Pueden ser debido a mutaciones naturales que generan el desarrollo espontáneo de enfisema. Algunos ejemplos de cepas mutantes de ratones C57BL/6 son la “Blotchy”, que tienen una traducción anormal del gen de Menkes en el cromosoma X ³²⁰ presentando deficiencias en las proteínas del tejido conectivo pulmonar, lo que afecta a la estructura y función del pulmón con el consiguiente desarrollo de enfisema ³²¹; los “Tight Skin”, que presentan una mutación en la fibrilina-1, uno de los principales componentes de las microfibrillas de la matriz extracelular del pulmón, lo que promueve el estrés oxidativo y la muerte celular, cascadas de lesiones fundamentales para el desarrollo de enfisema ^{322,323} o más recientemente los ratones “Osteopetrotic”, que presentan una deficiencia del factor estimulante de la colonia de macrófagos y acaban desarrollando enfisema ³²⁴. Todos estos ejemplos son cepas naturales, sin embargo el desarrollo en técnicas de ingeniería genética ha permitido el desarrollo de modelos transgénicos o *knock-out* para la EPOC. Uno de los primeros modelos transgénicos se basó en la sobreexpresión constitutiva de la colagenasa-1 humana en ratones, que provoca enfisema ³²⁵ por destrucción del colágeno tipo III de la pared alveolar ³²⁶.

2. Factor Nuclear Eritroide 2

La acumulación de ERO conduce a un estrés oxidativo responsable de daño en la membrana, al ADN, envejecimiento, degeneración tisular y apoptosis, entre otros. El organismo tiene una gran variedad de mecanismos y factores asociados a la respuesta celular al estrés oxidativo. Sin embargo, es la vía NRF2 se considera la más importante en la protección contra el estrés oxidativo ³²⁷⁻³³¹.

2.1 Estructura y función biológica

NRF2 es un factor de transcripción Cap'n'collar-basic con una característica cremallera de leucinas (CNC-bZIP) ³³². NRF2 se expresa de manera constitutiva en la mayoría de las células, aunque su expresión es más abundante en tejidos como el intestino, el pulmón y el riñón, donde se producen habitualmente reacciones de desintoxicación ³³³. NRF2 se expresa principalmente en los macrófagos alveolares y en las células epiteliales de los pulmones ³³⁴. Este factor contrarresta el estrés oxidativo y la inflamación mediante la inducción coordinada de la transcripción de genes citoprotectores ^{329,332,335}.

NRF2 no se encuentra libre y activo todo el tiempo, sino únicamente cuando se generan condiciones de estrés oxidativo. Aunque es relativamente sencillo encontrar niveles constitutivos del ARNm para NRF2, resulta muy difícil detectar a la proteína madura, sugiriendo su rápida degradación dentro de la célula. ³³⁶.

Este factor forma heterodímeros con la proteína pequeña del fibrosarcoma musculoesquelético (MAF, por sus siglas en inglés) K, G y F en el núcleo. El heterodímero reconoce una secuencia potenciadora denominada elemento de respuesta antioxidante (ARE, por sus siglas en inglés) que está presente en las regiones reguladoras de más de 250 genes (genes ARE) ³³⁷⁻³³⁹. Estos genes ARE codifican una red de enzimas cooperantes que participan en las reacciones de biotransformación de fase I, II y III y en los mecanismos antioxidantes que generan reacciones de NADPH, GSH y TRX; catabolismo de lípidos y hierro; e interacción con otros factores de transcripción, etc. ³³⁸. La inducción de estas enzimas permite el estudio de la actividad de NRF2 de forma indirecta. En esta tesis destacaremos algunas de estas enzimas como la NQO1, la HO-1 y la GPx. La NQO1 se encarga de catalizar la reducción de quinonas a hidroquinonas mediada por dos electrones ^{340,341}, que se propone comúnmente como un mecanismo de desintoxicación ³⁴¹. La HO-1 juega un papel clave en el catabolismo del grupo hemo, protegiendo así contra la citotoxicidad oxidativa de este. Además de citoprotección mediante la degradación del grupo hemo, diversos estudios han demostrado que los productos

derivados de la actividad de la HO-1 son los mediadores de muchas de las propiedades antiinflamatorias, antiapoptóticas, antioxidantes e inmunomodulatorias asociadas a la inducción de HO-1³⁴². GPx-1, por otro lado regula el estado oxidativo de la célula directamente mediante la eliminación de hidroperóxidos y a través de la oxidación del GSH³⁴³. Recientemente, se ha descubierto que NRF2 también regula la expresión de varias subunidades del proteasoma y genes de autofagia, lo que aporta un interés adicional a su control de la proteostasis^{344–346}. También se ha visto que la inducción de la expresión de los genes ARE mediada por NRF2 podría inhibir la producción o la expresión de mediadores proinflamatorios, incluyendo citocinas, quimiocinas, moléculas de adhesión celular, metaloproteinasas, ciclooxigenasa-2 y óxido nítrico sintasa inducible (iNOS). De hecho, la función citoprotectora de los genes dirigidos a NRF2 podría regular de forma cooperativa la respuesta inmunitaria innata y reprimir la inducción de genes proinflamatorios, regulando factores como NF- κ B y la proteína activadora 1 (**Figura 14**)^{334,347}.

El principal mecanismo que regula la actividad transcripcional de NRF2 es el control de la estabilización de la proteína 1 asociada a ECH tipo Kelch por el adaptador E3 ligasa KEAP1 (del inglés Kelch-like ECH-associated protein 1). KEAP1 es una proteína homodimérica que sirve de puente entre Nrf2 y el complejo E3 ligasa formado por Cullin 3 y la proteína RING-box 1 (CUL3/RBX1). En condiciones normales de homeostasis, el dominio N-terminal del homodímero KEAP1 se une a una molécula de NRF2 en dos secuencias de aminoácidos con baja (aspartato, leucina y glicina; DLG) y alta (glutamato, treonina, glicina y glutamato; ETGE) afinidad, regula así negativamente Nrf2 al mediar su unión a la ubiquitina ligasa CUL3/RBX1^{348,349} para su ubiquitinación y posterior degradación por el proteasoma^{350–353}. KEAP1 es un sensor redox y electrófilo, por lo que en presencia de oxidantes o electrófilos, las cisteínas críticas de KEAP1 se modifican, lo que lleva a la disociación de la unión entre NRF2 y KEAP1. NRF2 escapa entonces a la ubiquitinación por CUL3/RBX1^{330,354–356}. Estas modificaciones en Keap1 relacionadas con el estrés oxidativo llevan a la estabilización de NRF2, su traslocación y acumulación en el núcleo y la transcripción de genes ARE (**Figura 14**).

Nrf2 posee además señales de localización (NLS) y de exclusión (NES) nuclear, que, en condiciones normales, se encuentran en equilibrio^{357–359}. Cuando se produce estrés oxidativo en la célula, los oxidantes modifican una cisteína reactiva de una de estas NES, lo que facilita la acumulación en el núcleo de NRF2³⁵⁸. Por tanto, la función de sensor de estrés oxidativo de Keap1 permite la activación de NRF2, mientras que los efectos directos del estrés oxidativo en NRF2 podrían modular la velocidad, magnitud y duración de la respuesta antioxidante³⁶⁰.

A pesar de que la modificación del complejo NRF2/KEAP1 por oxidantes o electrófilos es considerado el principal mecanismo de activación de NRF2 y por el que se induce la expresión de genes ARE. Otros estudios han demostrado que existen mecanismos alternativos de regulación de la estabilidad de NRF2. Uno de los mecanismos alternativos es la regulación de Nrf2 por fosforilación mediada por la glucógeno sintasa cinasa 3 (GSK-3). Esta quinasa fosforila un dominio de la NRF2 (aspartato, serina, glicina, isoleucina, serina; DSGIS) y crea así un motivo de reconocimiento para el adaptador de ligasas E3 que contiene la proteína ubiquitina ligasa b-transducina (b-TrCP) que presenta a NRF2 a un complejo CUL1/RBX1, lo que conduce a una vía alternativa para la degradación proteasomal dependiente de ubiquitina de NRF2 ^{339,361}.

Por lo tanto, KEAP1 y GSK-3/b-TrCP controlan estrechamente los niveles proteicos de NRF2 en el contexto de la homeostasis redox y la señalización celular, respectivamente ³⁶¹. Se han descrito otros mecanismos de regulación de NRF2 a nivel de proteínas, ARNm o genes ³³⁸, pero los dos descritos son los más susceptibles de regulación farmacológica ³³⁹.

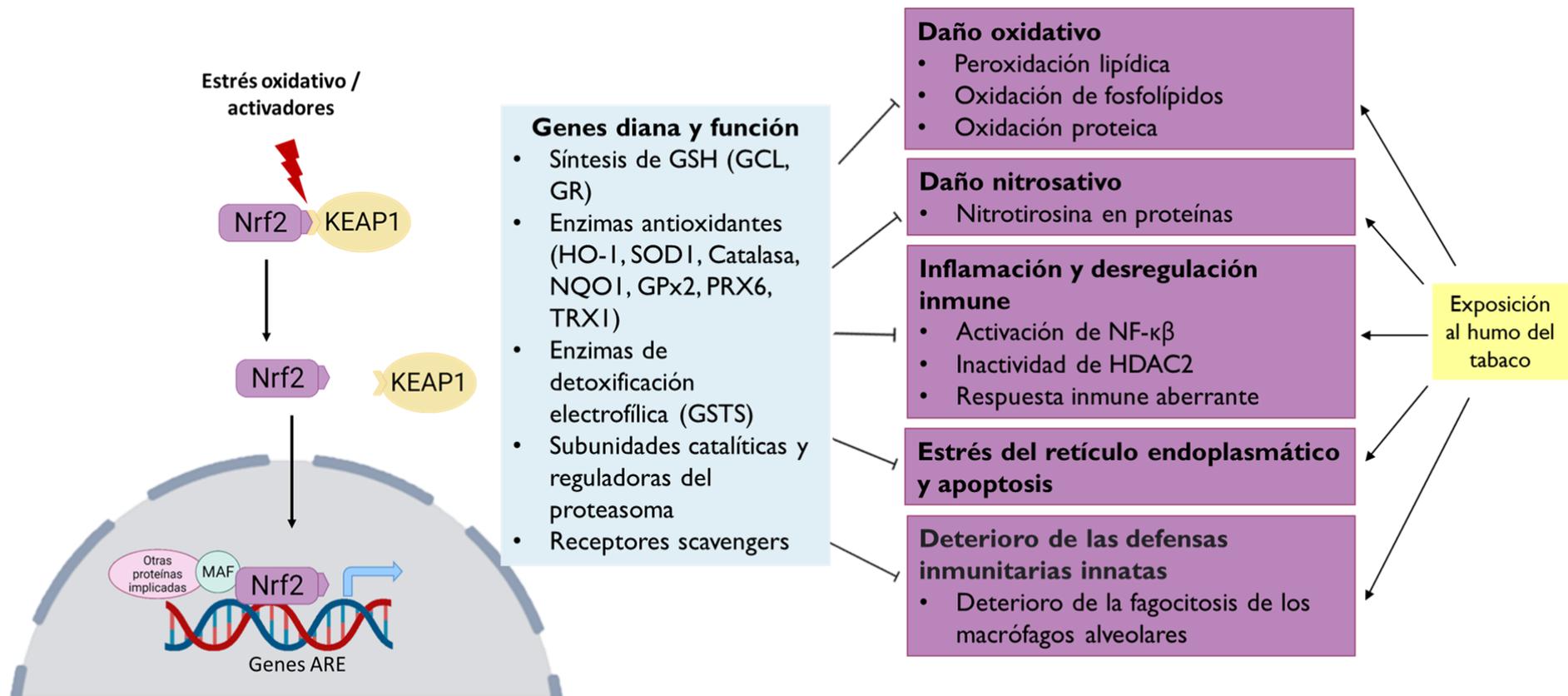


Figura 14. Ruta de activación de Nrf2 y sus genes diana. La activación de NRF2 puede inhibir los cambios patológicos de la EPOC inducidos por el humo del tabaco mediante la inducción de genes que codifican para enzimas para la síntesis de GSH, enzimas antioxidantes, enzimas detoxificantes, proteínas del sistema del proteosoma o receptores scavengers. Creada con BioRender.

Abreviaturas: ARE: elementos de respuesta antioxidante; GCL: Glutamate cysteine ligase; GPx2: glutatión peroxidasa 2; GR: glutatión reductasa; GSH: glutatión; GSTs: glutatión S-transferasa; HDAC2: histona deacetilasa-2; HO-1: hemoxigenasa 1; KEAP1: Proteína 1 Asociada A ECH Tipo Kelch; MAF: proteína pequeña del fibrosarcoma musculoaponeurótico; NF- κ B: factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas; NQO1: NAD(P)H quinona oxidorreductasa 1; NRF2: factor nuclear eritroide 2; PRX6: peroxidasa 6; SOD1: superóxido dismutasa 1; TRX1: tiorredoxina 1.

2.2 Relación de la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica con NRF2

Tal y como se ha descrito en la presente tesis, el humo de tabaco es uno de los factores de riesgo más importantes en el desarrollo de la EPOC. La exposición a este humo de tabaco, como se ha comentado, puede generar estrés oxidativo. En los fumadores sanos, para hacer frente a una carga de oxidantes tan elevada, se produce un aumento significativo de numerosas defensas antioxidantes, entre las que se encuentra NRF2. Se ha demostrado un aumento transitorio de la expresión de NRF2 inducido por el humo de tabaco en células de las vías aéreas humanas. Sin embargo, se ha observado una disminución de los niveles de NRF2 en los tejidos pulmonares y en los macrófagos pulmonares y alveolares de los pacientes con EPOC y de fumadores de edad avanzada ^{335,362-365}. De la misma forma se ha identificado una disminución paralela de la expresión de las proteínas antioxidantes HO-1, GPx2 y NQO1 en los macrófagos alveolares de pacientes con enfisema pulmonar relacionado con el tabaquismo ³⁰¹. Entre ellas, la HO1 está ampliamente implicada en la protección pulmonar, especialmente en la EPOC. De hecho, la proteína HO-1 desempeña un papel citoprotector contra la inflamación y la apoptosis, especialmente en las células endoteliales y los monocitos humanos ³⁰⁰.

Un estudio reciente demostró que la exposición durante 6 horas al humo de tabaco produce un aumento del ARNm, la proteína y la actividad de la HO-1 y de la expresión nuclear del NRF2, mientras que la exposición durante 72 horas produce una disminución de la expresión de la HO-1, concomitantemente con una disminución del NRF2 nuclear ³⁶⁶. Así pues, la regulación a la baja de la HO-1 dependiente del NRF2, y posiblemente de otras enzimas antioxidantes, podría disminuir los mecanismos naturales de defensa en los pulmones, contribuyendo así a la progresión de la EPOC ³⁶⁷.

En consonancia con estos hallazgos, los ratones deficientes en NRF2 son más susceptibles a la exposición al humo de tabaco y desarrollan un enfisema pulmonar más grave y apoptosis, y la actividad de las enzimas antioxidantes está reprimida ³⁶⁸. Además, la relación entre NRF2 y la EPOC también se ha abordado in vitro: La supresión de NRF2 aumenta la apoptosis inducida por la exposición al humo de tabaco en un 10%, mientras que la sobreexpresión de NRF2 protege a las células de la apoptosis inducida por el humo de tabaco. En particular, la supresión de Keap1 y la consiguiente activación de la señalización de NRF2 en las células Clara no sólo protege a las células contra el estrés oxidativo ex vivo y en las células epiteliales humanas, sino que también suprime el estrés oxidativo y la inflamación inducida por el humo de tabaco in vivo ³⁶⁹.

Se ha visto que varios activadores de NRF2 tienen el potencial de proteger frente a la exposición al humo de tabaco. Recientemente, compuestos como los triterpenoides, el sulforafano y compuestos dietéticos como los fenoles, los flavonoides, los isotiocianatos, los organosulfuros, los indoles y los diterpenos se han utilizado para inducir la transcripción de genes ARE, ya sea a través de la interrupción de los complejos NRF2-KEAP1 y/o a través de la activación del complejo transcripcional de NRF2 con otros factores de transcripción y proteínas (por ejemplo, las pequeñas proteínas Maf)³⁷⁰.

Por lo tanto, las terapias basadas en activadores de NRF2 pueden ser prometedoras para el tratamiento de los pacientes con EPOC.

HIPÓTESIS

La hipótesis propuesta en este trabajo se basa en los siguientes hallazgos:

- La EPOC se caracteriza por un elevado nivel de estrés oxidativo sistémico y pulmonar responsable de aumentar la inflamación pulmonar ¹⁷³⁻¹⁷⁵.
- El incremento del estrés oxidativo en pacientes con EPOC es causa y consecuencia de la reducción de las defensas antioxidantes ¹⁸⁷⁻¹⁹².
- El factor NRF2 se expresa principalmente en los macrófagos alveolares y en las células epiteliales de los pulmones ³³⁴ y el sistema NRF2/KEAP1 se encuentra mermado en pacientes EPOC ^{335,362-365}.
- El sistema NRF2/KEAP1 es el encargado de contrarrestar el estrés oxidativo y la inflamación mediante la inducción coordinada de la transcripción de genes citoprotectores y antioxidantes ^{329,332,335}.

Por lo tanto se establece la siguiente hipótesis:

Dado que el estrés oxidativo es un mecanismo clave en la patogénesis de la EPOC y las evidencias sobre la implicación del sistema NRF2, terapias farmacológicas basadas en activadores de NRF2 pueden atenuar y/o prevenir los mecanismos patológicos característicos de la EPOC.

OBJETIVOS

El objetivo general o primario de esta tesis es evaluar la eficacia antioxidante y antiinflamatoria *in vitro* e *in vivo* de una serie de fármacos activadores del factor NRF2 como posibles nuevas terapias farmacológicas en el tratamiento de la EPOC.

Con el objetivo de lograr dicho objetivo, se plantean los siguientes objetivos específicos o secundarios:

- Analizar la expresión de los componentes principales del sistema NRF2/KEAP1, así como de los principales genes antioxidantes activados por esta ruta en tejido pulmonar y neutrófilos procedentes de pacientes EPOC y sujetos sanos
- Detectar y seleccionar activadores de NRF2 con la potencia para prevenir efectos en la liberación de GSH generada por la exposición a extracto de humo de tabaco
- Determinar la eficacia antioxidante, antiinflamatoria y antiapoptótica de los fármacos seleccionados en monocitos de línea, en neutrófilos de sujetos sanos y pacientes EPOC, en células epiteliales bronquiales de línea y en células epiteliales bronquiales primarias de sujetos sanos y pacientes EPOC tras la estimulación extracto de humo de tabaco. Para ello se evaluará:
 - Los niveles de GSH liberados
 - La generación intracelular de EROS
 - La expresión génica y proteica de marcadores moleculares relacionados con la actividad de NRF2
 - La liberación de marcadores inflamatorios
 - Los niveles de apoptosis
- Determinar la eficacia antioxidante y antiinflamatoria de los activadores de NRF2 en modelos murinos *in vivo* de inflamación pulmonar aguda y exacerbación de la EPOC.

MATERIAL Y MÉTODOS

I. Material

I.1. Reactivos utilizados

Tabla 5. Reactivos utilizados en la presente tesis

Reactivo	Casa comercial	Referencia
β -Mercaptoetanol	Sigma-Aldrich	M6250
4–15% Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Protein Gels, 15-well, 15 μ l	BIO-RAD	4561086
4–20% Mini-PROTEAN® TGX™ Gel, 10 well, 50 μ l	BIO-RAD	4561094
Aceite de sésamo	Sigma-Aldrich	8008-74-0
Ácido acético glacial	Panreac Applichem	131008.1611
Ácido cítrico anhidro	Panreac Applichem	141808
Ácido clorhídrico 37% (HCl)	Panreac Applichem	131020
Ácido sulfúrico (H ₂ SO ₄)	Sigma-Aldrich	339741
Ácido tricloroacético (cloroformo)	Panreac Applichem	151067
Agua tratada con dietilpircarbonato (DEPC)	Applied Biosystems	AM9906
Airway Epithelial Growth Medium	PromoCell	C-21060
Albúmina sérica bovina (BSA)	Sigma-Aldrich	A7906
Amersham™ ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent	Cytiva, Thermo Fischer Scientific	RPN2232
Amersham™ Hyperfilm™ MP	Cytiva, Thermo Fischer Scientific	GE28906837
Anfotericina B	HyClone, Cytiva	SV30078.01
Annexin VFITC Apoptosis Detection kit	Abcam	ab14085
Aspalatina	Sigma-Aldrich	0352-05-85
Astemizol	Selleck Chemicals	S0398
Azul de tripano	Lonza	17-942E
Bambanker	Nippon Genetics (Cultek)	B4BB01
Bardoxolona metil (CDDO-Me)	Selleck Chemicals	S8078
BEAS-2B	ATCC	CRL-9609

BH₄ ((6R)-5,6,7,8-Tetrahydrobiopterin dihydrochloride)	Sigma-Aldrich	T4425
Bicarbonato de sodio (NaHCO₃)	Panreac Applichem	141638.1211bu
Carbonato de litio	Sigma-Aldrich	100979413
Cigarrillos de investigación	Kentucky Tobacco Reasearch & Development Center	1R6F
Citrato	Panreac Applichem	141808.1210
Cloruro de amonio (NH₄Cl)	Panreac Applichem	131121.1210
Cloruro de magnesio (MgCl₂)	Panreac Applichem	141396
Cloruro de sodio (NaCl)	Panreac Applichem	141659
CM-H2DCFDA	Thermo Fisher Scientific	C6827
Colágeno tipo I	Sigma-Aldrich	C3867
DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole)	Invitrogen	D1306
Dextrano 500	Sigma-Aldrich	31392
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	Biowest	L0102
DMSO (dimetilsulfóxido)	Sigma-Aldrich	34869
DPBS (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline)	Biowest	L0615
DPX	Panreac Applichem	255254.1610
EDTA (ácido etilendiaminotetraacético)	Sigma-Aldrich	ED2SC
EGTA (ácido etilenglicol tetraacético)	Sigma-Aldrich	E3889
Eosina	Sigma - Aldrich	HT110216
ELISA Human IL-8/CXCL8 DuoSet	RD systems	DY208
ELISA Human MMP9 DuoSet	RD systems	DY911
ELISA Mouse TNF-alpha DuoSet	RD systems	DY410
ELISA Mousel IL-6 DuoSet	RD systems	DY406
ELISA Mouse IL-1β/IL1F2 DuoSet	RD systems	DY401-05
ELISA Mouse IL-8/CXCL15	Fine Test	EM1592

Enzima TrypLE™ Select (1X), sin rojo fenol	Thermo Fisher Scientific	12563029
Etanol absoluto	Panreac Applichem	361086
Ficoll-Paque	GE Healthcare	17-1440-03
Formaldehido 3.7-4%	Panreac Applichem	252931.1315
Gel de poliacrilamida	Bio-Rad	456-1094
Glaucina	Sigma-Aldrich	475-81-0
Glicerol	Sigma-Aldrich	G5516
GSH-Glo™ Glutathione Assay	Promega	V6912
Hematoxilina de Gill	Sigma-Aldrich	GHS322
HEPES (Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazino etanosulfónico)	Sigma - Aldrich	H4034
Hidróxido sódico (NaOH)	Panreac Applichem	131687
Inhibidores de proteasa Pierce™	Thermo Fisher Scientific	36978
Isoflurano	Baxter SL	ARREANE
Isopropanol	Sigma-Aldrich	I9516
Kit para Tinción Rápida en Hematología (Panóptico Rápido)	Panreac	254807.0922
Laemmli Sample Buffer	BIO-RAD	1610737
LPS (<i>E. coli</i>; O55:B5)	Sigma-Aldrich	L2880
MagMAX™-96 Total RNA Isolation Kit	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific	AM1830
Master Polymer Plus Detection System (Peroxidase)	Master diagnóstica	MAD-000237QK
Medio de montaje rápido para microscopía óptica	FLUOPREP Biomerieux	Cat. 75521
Membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF)	Bio-Rad	1704157
Metanol	PanReac AppliChem	131091.1212
Monocitos U937	ATCC	CRL-1593.2
MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol)	Sigma-Aldrich	M5655
Nonidet P40	Sigma-Aldrich	74385
Obacunona	Selleck Chemicals	S3784

Omaveloxolona	Selleck Chemicals	S7672
Parafina	Sigma-Aldrich	P3683
PBS tabletas	Sigma-Aldrich	P4417
Penicilina/streptomicina	Lonza Group	DE17-602E
Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)	Sigma-Aldrich	P7626 36978
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific	23227
Ponceau de silidina	Merk	1159270025
PrimeScript™ RT Reagent Kit (Perfect Real Time)	Takara	RR037B
ProSense® 680 FLOURESCENT IMAGING AGENT	Perkin Elmer	NEV10003
RNAlater™ Stabilization Solution	Thermo Fisher Scientific	AM7021
Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI)	Biowest	L0500
Roflumilast	Adooq Bioscience	A10804
Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific	26623
Suero Fetal Bovino (SFB)	Thermo Fisher Scientific	SH3007103
Suero fisiológico	B. Braun	190/12606059/1013
Tampón salino fosfato (PBS)	Sigma-Aldrich	P4417
TaqMan® Gene Expression Master Mix	Applied Biosystems	4369016
TAT-14	Tocris Bioscience	4811
Taurina	Sigma-Aldrich	T9931
Tert-Butyl hydroperoxide	Sigma-Aldrich	B2633
TMB (3,3',5,5'-tetrametilbencidina)	Thermo Fisher Scientific	10647894
Total RNA Purification Kit	Norgen Biotek Corp	17250
Trans-Blot® Turbo™ Midi PVDF Transfer Packs	BIO-RAD	1704157
Trans-Blot® Turbo™ Mini PVDF Transfer Packs	BIO-RAD	1704156
TriPure® Isolation Reagent	Roche Diagnostics	1667157001
Triton® X 100 pure	Panreac Applichem	142314

Tris	Panreac Applichem	131940.1211
Tris/Glycine/SDS running buffer 10x	Bio-Rad	161-0772
Tween® 20	Sigma - Aldrich	P1379
SDS (sodio dodecyl sulfato)	Sigma-Aldrich	L3771
Xileno	Panreac Applichem	211769.1714

1.2 Estímulos

1.2.1 Humo de tabaco / Extracto humo tabaco

Tanto el humo del tabaco como el extracto de humo de tabaco (EHT) se obtuvieron a partir de cigarrillos de investigación (1R6F; Kentucky Tobacco Research & Development Center; Universidad de Kentucky, Lexington, KY, EEUU). Estos cigarrillos han sido desarrollados para su uso en investigación, de forma que permiten una mejor comparación de los resultados obtenidos en distintos estudios. La composición de estos cigarrillos es la siguiente: Flue cured 34%, Burley 24%, Oriental 12%, Reconstituted 20%, expanded Flue cured 7%, expanded Burley 3%, glicerol 1,7%, glicol de propileno 1%, Isosweet (jarabe de maíz alto en fructosa) 6,3%. Tiene unos valores de TPM (materia total particulada) de 10mg/cig, alquitrán (tar) de 8,6mg/cig, nicotina 0.7mg/cig y monóxido de carbono 10,1mg/cig ³⁷¹. El humo de estos cigarrillos se utilizó para la exposición al humo de tabaco de uno de los modelos murinos de esta tesis, mientras que el EHT obtenido a partir de estos cigarrillos de investigación fue utilizado como estímulo en los experimentos *in vitro*, tal y como se describirá posteriormente.



Figura 15. Cigarrillos de investigación 1R6F de la Universidad de Kentucky. Imagen obtenida de <https://ktrdc.ca.uky.edu/Reference-Products>

1.2.2 Lipopolisacárido

Tal como se ha comentado previamente, el LPS es el componente principal de la membrana externa de las bacterias Gram negativas que activa la inmunidad innata. Está compuesto por una parte lipídica y cadenas características de oligosacáridos y polisacáridos. Es reconocido por el toll-like receptor 4 (TLR4), cuya unión desencadena la activación de NF- κ B y la producción de citoquinas proinflamatorias. Es ampliamente empleado en modelos animales de EPOC, especialmente en aquellos centrados en las exacerbaciones, en combinación o no con humo de tabaco ^{297,298}.

En esta tesis se empleó la forma ultrapura de *Echericcia coli* mutante O55:B5 (Sigma-Aldrich; MI, San Luís, EEUU) para los distintos modelos animales a una concentración de 2,5mg/ml en PBS.

1.3 Fármacos ensayados

En este trabajo se emplearon diferentes fármacos como posibles tratamientos para la EPOC. Principalmente se emplearon fármacos activadores de Nrf2, de diferentes clases, pero también se utilizaron otras moléculas con potencial antioxidante, no considerados principalmente activadores de NRF2, con posibilidad de serlo. De estos fármacos se seleccionaron aquellos con mejores resultados.

1.3.1 Electrofílicos

1.3.1.1 Bardoxolona Metil

Bardoxolona Metilo (CDDO-ME, RTA 402, ácido 2-ciano-3,12-dioxooleana-1,9(11)-dien-28-oico metil éster) (**Figura 17**) es un triterpenoide semisintético metil éster derivado de la bardoxolona (CDDO). Estudios iniciales determinaron que tanto CDDO como sus derivados se unen al receptor y activado del peroxisoma ^{372,373}. Sin embargo, se ha visto que la gran mayoría de las acciones de estos triterpenoides sintéticos ocurren independientemente de este receptor ³⁷⁴. Otras dianas moleculares de estas la CDDO-Me incluyen Keap1 y la cinasa I κ B (IKK β , por sus siglas en inglés). La estructura de la CDDO-Me es similar a la 15-deoxi- Δ 12,14-prostaglandina J₂ y las prostaglandinas relacionadas, las cuales son los activadores endógenos de NRF2 ³⁷⁵⁻³⁷⁷. Unión de la CDDO-Me a Keap1 modifica los residuos de cisteína claves, lo que produce la liberación de NRF2 y su translocación al núcleo ³⁷⁸. La CDDO-Me también se une al residuo de cisteína Cys-179

de IKK β e inhibe de esta forma la activación del factor NF- κ β y por lo tanto las rutas proinflamatorias posteriores ³⁷⁹ (**Figura 16**).

A bajas concentraciones nanomolares, la CDDO-Me protege a las células contra el estrés oxidativo mediante la inhibición de la generación de especies reactivas de oxígeno, mientras que, a bajas concentraciones micromolares induce la apoptosis mediante el aumento de las especies reactivas de oxígeno y la disminución de los niveles de glutatión intracelular. A través de las vías KEAP1/NRF2 y del factor NF- κ β , este agente puede modular las actividades de una serie de proteínas importantes que regulan la inflamación, el equilibrio redox, la proliferación celular y la muerte celular programada ³⁸⁰.

La CDDO-Me se ha utilizado como tratamiento para la enfermedad renal crónica asociada a la diabetes de tipo 2 en un ensayo clínico de fase 3 ³⁸¹, así como para la hipertensión pulmonar en un ensayo clínico de fase 2 ³⁸². Lamentablemente, debido al aumento de la mortalidad por eventos cardiovasculares en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 y enfermedad renal crónica en fase 4, estos ensayos clínicos se dieron por terminados ^{383,384}. Por otro lado, CDDO-Me también ha demostrado potencial para prevenir la fisiopatología cardíaca y renal inducida por la dieta alta en grasas en ratones ³⁸⁵ y ha mostrado un prometedor efecto anticancerígeno en un ensayo clínico de fase 1 ³⁸⁶.

Sin embargo, no existen estudios que hayan probado el potencial terapéutico de la CDDO-Me para el tratamiento de la EPOC.

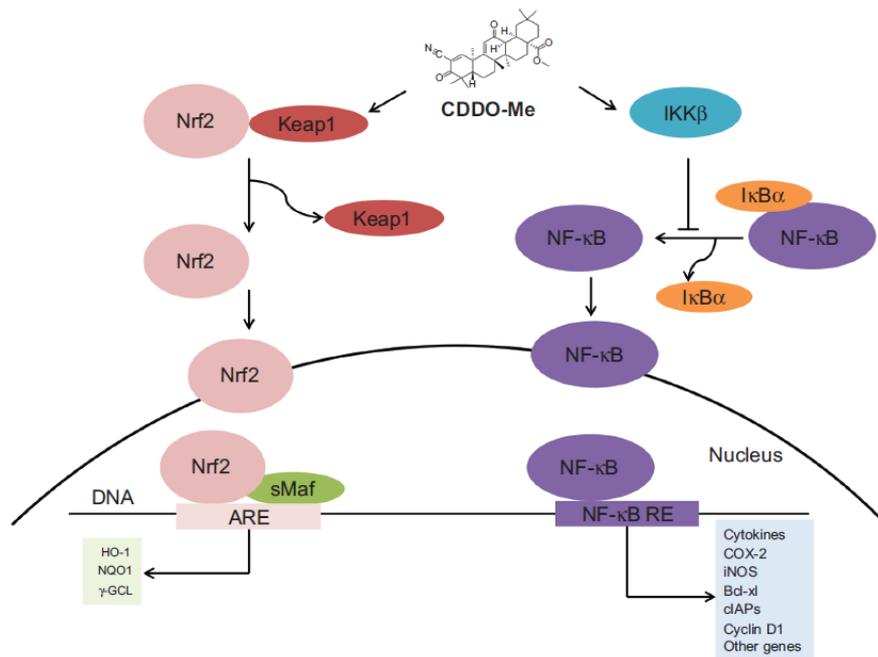


Figura 16. CDDO-Me activa Nrf2 y induce la respuesta antioxidante a la vez que inhibe NFκβ y disminuye la señal proinflamatoria. (Figura extraída de Wang et al. 2014 ³⁸⁰)

Abreviaturas: ARE: elementos de respuesta antioxidante; Bcl-xl: linfoma extra grande de células B; CDDO-Me: bardoxolona metil; cIAPs: inhibidores celulares de apoptosis; COX-2: ciclooxygenasa 2; HO-1: hemoxigenasa 1; IKKβ: cinasa Iκβ, inhibidor de NF-κβ; IκBα: inhibidor alfa del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas; iNOS: óxido nítrico sintasa inducible; KEAP1: Proteína 1 Asociada A ECH Tipo Kelch; NF-κβ: factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas; NQO1: NAD(P)H quinona oxidorreductasa 1; Nrf2: factor nuclear eritroide 2; sMAF: proteína pequeña del fibrosarcoma musculoaponeurótico; γ-gamma-glutamil cisteína

La CDDO-Me (Selleck Chemicals; Houston, TX, EEUU) se ha utilizado en cultivos celulares a distintas concentraciones crecientes (1nM – 100nM) preparadas en cada uno de los medios celulares correspondientes a partir de un stock en DMSO (Sigma Aldrich; Saint Louis, MI, EEUU) a 10mM. En los modelos murinos la CDDO-Me se ha utilizado a las dosis 5mg/kg y 10mg/kg, similares a las utilizadas en otros modelos animales donde se ha estudiado estrés oxidativo e inflamación ^{387–389}. Para utilizar las concentraciones, se preparó una concentración stock de 20mg/ml en DMSO y se realizaron diluciones posteriores vehiculizadas en aceite de sésamo (Sigma-Aldrich; Saint Louis, MO, EEUU) para administración oral forzada.

1.3.1.2 Omaveloxolona

Omaveloxolona (RTA-408, N-(2-ciano-3,12-dioxo-28-noroleana-1,9(11)-dien-17-il)- 2,2-difluoropropanamida) (**Figura 17**) es un triterpenoide oleanano semisintético activador de Nrf2,

con un gran poder antioxidante, y regulador del factor NF- κ B^{390,391}. Además de efectos antioxidantes, este compuesto también presenta efectos antiinflamatorios, anticancerígenos y reguladores de la bioenergética mitocondrial^{391–393}. Se ha visto también que la omaveloxolona reduce los niveles de IL-1 β , estimula la fosforilación de NF- κ B e induce la expresión de genes activados por NRF2 para atenuar la expresión de MMP-9 en astrocitos de cerebro de rata, lo que sugiere que es beneficioso para el tratamiento de trastornos neurodegenerativos³⁹⁴. Este compuesto también se ha demostrado que protege las células epiteliales pigmentadas de retinal de la destrucción por estrés oxidativo vía la activación de NRF2³⁹⁵. Además de esto, la aplicación tópica de omaveloxolona provoca una inducción proporcional a la dosis de los genes activados por NRF2 en la piel de ratas y en biopsias en sacabocados de voluntarios humanos y protege a los ratones de la dermatitis inducida por la radiación^{396–398}. Omaveloxolona se ha ensayado en pacientes con tumores sólidos en un ensayo clínico de fase 1³⁹⁹ y actualmente se está llevando a cabo un ensayo de fase II para el tratamiento de la ataxia de Friedreich^{399–401}. Por último, se ha visto que este compuesto protege contra las exacerbaciones agudas en modelos de asma inducida por ozono⁴⁰². Sin embargo, tal como en el caso de la CDDO-Me, no existen ensayos ni preclínicos, tanto *in vitro* como *in vivo*, ni clínicos que prueben el potencial terapéutico de la omaveloxolona en la EPOC.

La omaveloxolona (Selleck Chemicals; Houston, TX, EEUU) se ha utilizado en cultivos celulares a distintas concentraciones crecientes (1nM – 100nM) preparadas en cada uno de los medios celulares correspondientes a partir de un stock en DMSO a 5mM. En los modelos murinos la omaveloxolona se ha utilizado a las dosis 5mg/kg y 10mg/kg, concentraciones similares a las estudiadas en otros modelos animales^{403,404}. Para utilizar las concentraciones, se preparó una concentración stock de 100mg/ml en DMSO y se realizaron diluciones posteriores vehiculizadas en aceite de sésamo para administración oral forzada.

1.3.2 No electrofílicos

1.3.2.1 Astemizol

Astemizol está descrito como un antagonista del receptor de histamina H1⁴⁰⁵. Sin embargo, en un estudio reciente para la identificación de activadores de NRF2 no electrofílicos a partir de fármacos ya aprobados, se observó que astemizol era capaz de activar NRF2 e inducir la expresión de los genes de enzimas antioxidantes como NQO1 y HO-1⁴⁰⁶. Además, otros autores han demostrado que ratas tratadas con astemizol presentan un aumento de la expresión de los

genes relacionados con la respuesta al estrés oxidativo en tejido cardíaco y en células mononucleares de la sangre ⁴⁰⁷. Se necesitan, sin embargo, más ensayos farmacológicos para testar y verificar su viabilidad como activador de NRF2, y por último como posible terapia en la EPOC.

El astemizol (Selleck Chemicals, Houston, EEUU) se ha utilizado en cultivos celulares a distintas concentraciones crecientes (10nM – 10µM) preparadas en cada uno de los medios celulares correspondientes a partir de un stock en DMSO a 10mM.

1.3.3 Antioxidantes naturales

1.3.3.1 Tetrahidrobiopterina

La tetrahidrobiopterina (BH₄, (6R)-5,6,7,8-Tetrahydrobiopterin dihydrochloride) es un coenzima no proteico, con estructura de imina heterocíclica. La BH₄ es inestable, a temperatura ambiente y en solución es fácilmente oxidable, termolábil, fotosensible y posee baja permeabilidad en membranas celulares. Puede reaccionar con oxígeno molecular, anión superóxido, peróxido de hidrógeno y peroxinitrito ^{408,409}, por tal motivo, se ha sugerido que la BH₄ protege las células contra el daño oxidativo ⁴⁰⁹. La suplementación con BH₄ mejora la disfunción endotelial en varias condiciones como hipercolesterolemia, diabetes, hipertensión, enfermedad arterial coronaria y fallo cardíaco. También mejora la función endotelial en fumadores y en sujetos de edad avanzada ⁴¹⁰. La administración de BH₄ reduce significativamente los niveles plasmáticos de 8-F2 isoprostano, marcador de estrés oxidativo ⁴¹¹. En nuestro grupo también se ha estudiado el papel de este compuesto en el remodelado vascular pulmonar asociado con la fibrosis pulmonar ⁴¹². En 2007 fue aprobado y declarado por la Food and Drug Administration (FDA) y la Agencia Europea del Medicamento (EMA) como medicamento huérfano, con la indicación terapéutica única de hiperfenilalaninemias.

Debido a su poder antioxidante, la BH₄ (Sigma Aldrich; Saint Louis, MO, EEUU) se consideró como un posible activador de la vía de señalización NRF2 y se utilizó en cultivos celulares a distintas concentraciones crecientes (1µM – 100µM) preparadas en el medio celular correspondiente a partir de un stock en 10mM en agua.

1.3.3.2 Aspalatina

La aspalatina es una a dihidrocalcona C-glucosil componente del rooibos. Este compuesto puede mejorar el metabolismo de la glucosa y los lípidos mediante la modulación de la expresión de la proteína cinasa activada por el monofosfato de 5' adenosina (AMPK) ⁴¹³. Tiene grandes propiedades antioxidantes ⁴¹⁴⁻⁴¹⁶, se ha visto que este compuesto puede proteger del estrés oxidativo mediante la regulación de la AMPK, pero recientemente también se ha demostrado que la aspalatina es capaz de inducir la expresión de genes antioxidantes vía la activación de NRF2 ⁴¹⁷.

Estos resultados nos llevaron a contemplar a la aspalatina como un activador natural de NRF2 con potencial terapéutico para la EPOC. Por ellos la aspalatina (Sigma-Aldrich; Saint Louis, MI, EEUU) se utilizó en cultivo celular a concentraciones crecientes (1µM – 10mM) preparadas en el medio correspondiente a partir de un stock preparado con DMSO a una concentración de 10mM.

1.3.3.3 Taurina

La taurina (ácido 2-aminoetanosulfónico) es un β-aminoácido no proteínogénico que contiene azufre y tiene una amplia gama de funciones fisiológicas, como la homeostasis del calcio, la regulación osmótica, el metabolismo energético, la neuroprotección, la antiinflamación y el antioxidante ⁴¹⁸. Los seres humanos y los animales, incluidos los de granja y las aves de corral, obtienen la taurina de su dieta y de la síntesis endógena. Los ingredientes alimentarios de origen animal, como el pescado, los productos lácteos y la leche humana, son las principales fuentes dietéticas naturales de taurina ⁴¹⁹. Diversos estudios han demostrado que la taurina contribuye a las defensas antioxidantes de diferentes maneras, incluyendo la eliminación directa de radicales libres; el mantenimiento de la integridad de la cadena de transporte de electrones; la estabilización de las membranas biológicas; la inhibición de las enzimas específicas generadoras de ROS; la inducción de la expresión de genes como SOD, tioredoxina y sirtuinas y la regulación de los factores de transcripción responsables de la regulación y aumento de la síntesis de las enzimas antioxidantes, como NRF2 ^{420,421}.

Todas estas características hicieron que la taurina fuera uno de los candidatos antioxidantes más prometedores con potencial terapéutico para la EPOC. La taurina (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MI, EEUU) se usó en cultivos celulares en concentraciones crecientes (100nM – 10mM) preparadas

en el correspondiente medio a partir de una solución stock preparada con agua a una concentración de 100mM.

1.3.3.4 Obacunona

La obacunona es un compuesto limonoide triterpenoide que se encuentra principalmente en los cítricos y en otras plantas de la familia *Rutaceae*⁴²² (**Figura 17**). En los últimos años se ha demostrado que la obacunona tiene diversas actividades farmacológicas, entre las que se incluyen actividades antioxidantes, antiinflamatorias, antiobesidad y antiproliferación⁴²³⁻⁴²⁶. Se ha demostrado que este compuesto es responsable de la activación de NRF2 y de la subsecuente inducción de los genes ARE⁴²³. El mecanismo por el cual se produce está activación no está del todo claro, pero estudios reciente han demostrado que la obacunona activa la vía NRF2 mediante la estabilización de NRF2 inhibiendo su ubiquitinación⁴²³ bien mediante la fosforilación de la GSK-3, inhibidor de la ruta NRF2⁴²⁷ y/o causando la disociación de KEAP1-NRF2⁴²⁸. Además, al tratarse de un compuesto natural, este fármaco presenta una alta tolerabilidad y pocos efectos citotóxicos⁴²⁹. Aunque estudios han demostrado que obacunona es capaz de inhibir la proliferación y los procesos fibróticos, así como, mostrar efectos terapéuticos en enfermedades cardiovasculares^{423,429,430}, no existen estudios que estudie el potencial terapéutico de este compuesto antioxidante en la EPOC.

Su reciente identificación, su potencial de activación de NRF2 así como su baja toxicidad, convirtieron a este compuesto uno de los fármacos estrella de esta tesis. La obacunona (Selleck Chemicals; Houston, TX, EEUU) se ha utilizado en cultivos celulares a distintas concentraciones crecientes (12,5µM – 100µM) preparadas en cada uno de los medios celulares correspondientes a partir de una solución stock en DMSO a 20mg/ml. En los modelos murinos la obacunona se ha utilizado a las dosis 10mg/kg, concentración utilizada previamente en el modelo murino de fibrosis pulmonar⁴²³. Para esto, se preparó una solución stock de 100mg/kg en DMSO y se realizó la dilución posterior vehiculizada en aceite de sésamo para administración oral forzada.

1.3.4 Péptidos

En 2006 un estudio demostró que péptidos cortos con secuencias basadas en la región de unión de Nrf2 al dominio Kelch de Keap1 pueden unirse con alta afinidad en las zonas centrales DEETGE. En este trabajo se diseñaron tres péptidos de 10, 14 y 16 aminoácidos de longitud, y el 16mer y el 14mer mostraron alta afinidad de unión, mientras que el 10mer también se unió pero con menor afinidad⁴³¹. Aunque los péptidos no son candidatos ideales a fármacos, son muy

útiles como herramientas químicas, sobre todo cuando se conjugan con un péptido de penetración celular como el péptido activador transcripcional (TAT) derivado del VIH⁴³².

En un estudio posterior se generaron tres péptidos con la secuencia TAT localizada en el amino terminal de los péptidos 10-, 14- y 16-mer (TAT-10, TAT-14 y TAT-16). Este estudio mostro que de estos tres péptidos el TAT-14 era capaz de activar la expresión de HO-1, un producto de la activación de NRF2, aunque a concentraciones muy elevadas⁴³³.

La capacidad de TAT-14 de activar NRF2, además de su disponibilidad de adquisición, hicieron que fuera uno de los compuestos peptídico candidatos en esta tesis. TAT-14 (Tocris Bioscience; Bristol, Reino Unido) se utilizó en cultivos celulares a concentraciones crecientes (100nM – 100µM) preparadas en el medio correspondiente a partir de una solución stock en agua a una concentración de 1mM.

Puesto que la disponibilidad de péptidos para adquirir no era muy alta, desde nuestro laboratorio se diseñó un péptido que contenía también la secuencia TAT, al que se le denominó LK1-14. Este péptido se utilizó en cultivos celulares a diferentes concentraciones (10nM – 10µM) preparadas en medio correspondiente a partir de una solución stock preparada en agua a 10mM.

Junto a estos dos péptidos se utilizó un compuesto peptídico activador de NRF2 cedido por la empresa Almirall, LAS200813:8. Este compuesto se utilizó en cultivos celulares a distintas concentraciones crecientes (1nM – 1µM) preparadas en los medios celulares correspondientes a partir de una solución stock preparada con DMSO a una concentración de 10mM.

1.3.5 Inhibidores PDE4

1.3.5.1 Glaucina

La glaucina [(S)-(+)-1,2,9,10-tetrametoxiaporfina] es un alcaloide aislado del tubérculo de *Corydalis turtschaninovii* (Papaveraceae) que se ha utilizado durante años como remedio popular tradicional para la tos y por sus actividades espasmolíticas, neurofarmacológicas, hipotérmicas y de reducción de la presión arterial^{434,435}. De hecho nuestro grupo ha estudiado los efectos broncodilatadores y antiinflamatorios de la glaucina en las células del músculo liso pulmonar y leucocitos polimorfonucleares⁴³⁶. También se sabe que la glaucina inhibe la

proliferación de diversas células tumorales ⁴³⁷⁻⁴³⁹. Sin embargo, el mecanismo molecular que subyace a los efectos beneficiosos de la glaucina aún no se conoce del todo. Se ha encontrado en diferentes estudios que la glaucina es un potente y selectivo inhibido de la PDE4 soluble aislada del músculo aórtico vacuno ⁴⁴⁰. La PDE4 es una importante enzima metabolizadora del AMP cíclico (AMPC) presente en las células estructurales e inflamatorias del pulmón, que son importantes para la patogénesis de la EPOC, la PDE4 disminuye los niveles de AMPC y favorece la actividad inflamatoria y la liberación de mediadores inflamatorios ⁴⁴¹. Por otro lado, en un estudio reciente se ha demostrado que el tratamiento con glucina inhibe significativamente la expresión del gen MMP-9 mediante la supresión de la activación de NF-kB ⁴⁴².

Estas características similares a las vistas en otros fármacos activadores de NRF2 y los trabajos previos realizados por nuestro grupo hicieron que fuera considerado un posible fármaco antioxidante y/o activador de NRF2^{436,443}. Para esta tesis se utilizaron concentraciones crecientes de glaucina (Sigma-Aldrich; Saint Louis, MO, EEUU) (1µM – 1mM) en cultivos celulares que se prepararon en el medio correspondiente a partir de un stock en DMSO a una concentración de 100mM.

1.3.5.2 Roflumilast

El roflumilast es un inhibidor de la PDE4, éste se metaboliza rápidamente a N-oxido roflumilast, considerado el principal responsable de su eficacia clínica ⁴⁴⁴. Este efecto inhibitorio resulta en un incremento del AMPC en las células estructurales e inflamatorias del pulmón ²⁵⁹. Los niveles aumentados de AMPC reducen la activación de estas células y por consiguiente la atenuación de la respuesta inflamatoria ⁴⁴⁵.

En particular, el roflumilast es el primer inhibidor de la PDE4 aprobado para el tratamiento de la EPOC severa por su gran capacidad de atenuar la inflamación sistémica y pulmonar ⁴⁴⁵. Estas características y el hecho de ser un fármaco ya utilizado previamente por nuestro grupo hicieron de roflumilast el candidato perfecto para su uso como control de eficacia en los modelos murinos de estas tesis ⁴⁴⁶⁻⁴⁵². El roflumilast (Adooq Bioscience; Irvine, CA, EEUU) se utilizó en los modelos murinos a una dosis de 5mg/kg, tal como se había utilizado previamente por nuestro grupo en modelos murinos ⁴⁴⁶. Para ellos se preparó una solución stock previa a 50mg/ml en DMSO y se realizó la dilución posterior vehiculizada en aceite de sésamo para administración oral forzada.

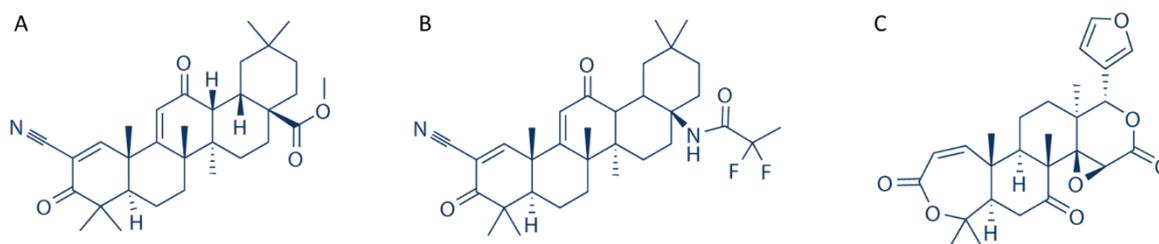


Figura 17. Estructura de los fármacos ensayados. (A) CDDO-Me, (B) Omaveloxolona, (C) Obacunona. Figuras extraídas de www.selleckchem.com

1.4 Muestras biológicas

En este trabajo se emplearon dos tipos de muestras humanas: sangre periférica y tejido procedente de parénquima humano o bronquio pulmonar humano tanto de pacientes con EPOC como de individuos sanos no fumadores. Las muestras se obtuvieron a partir de pacientes procedentes del Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia y el Consorcio Hospital General Universitario de Valencia.

1.4.1 Sangre periférica

Para la extracción de sangre periférica se reclutaron 76 pacientes con EPOC de la unidad de Neumología del Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia y el Hospital General Universitario de Valencia durante los años 2018 a 2021. Además, se reclutaron 60 voluntarios sanos de edades análogas a los pacientes EPOC durante los mismos años. El estudio fue aprobado por el comité ético de investigación clínica (CEIC) del Consorcio Hospital General Universitario de Valencia (**Anexo I**) y por el comité de la investigación con medicamentos (CEIm) del Hospital Universitario y Politécnico de La Fe de Valencia (**Anexo II**) y todos los sujetos proporcionaron su consentimiento informado. Los sujetos incluidos en este estudio fueron clasificados en dos grupos: controles no fumadores y pacientes EPOC. Los pacientes EPOC fueron diagnosticados de acuerdo a las directrices GOLD ⁶ y todas las pruebas de función pulmonar fueron realizadas durante los tres meses previos a la extracción de sangre. Los pacientes fueron clasificados en los distintos grupos de acuerdo a los valores de su función pulmonar. Además, los datos clínicos de todos los pacientes fueron examinados para evaluar posibles comorbilidades y el uso de medicación. En la **Tabla 6** se muestran las características de los sujetos.

Tabla 6. Características clínicas de los sujetos control y los pacientes EPOC, clasificados de acuerdo las directrices GOLD.

	Sujetos sanos (n=60)	Pacientes EPOC (n=84)		
		GOLD 2 (n=15)	GOLD 3 (n=44)	GOLD 4 (n=25)
Edad, media (DE)	67.4 (9.7)	69.6 (8.2)	68.6 (8.7)	66.1 (10.1)
Sexo (Masculino/Femenino)	36/24	9/6	37/7	22/3
Fumadores	0	7	16	6
Ex fumadores	0	8	28	19
Paquetes-año (rango)	0	60 (25 – 144)	70 (30 – 180)	77 (30 – 220)
VEF ₁ %, media (DE)	ND	60.5 (8.3)	37.5 (5.0)	24.3 (3.2)
CVF % media (DE)	ND	87.8 (8.2)	64.5 (11.2)	48.2 (11.1)

Abreviaturas: CVF: capacidad vital forzada; DE: desviación estándar; VEF₁: volumen espiratorio forzado en el primer segundo.

El número de pacientes empleados para cada técnica se muestran en la **Tabla 7**.

Tabla 7. Clasificación de muestras según técnica donde se emplearon.

Sujetos sanos	PACIENTES EPOC			
	GOLD 2	GOLD 3	GOLD 4	
73	12	22	20	Expresión génica basal
12		16		Detección proteica (ELISA)

1.4.2 Tejido pulmonar

El tejido pulmonar humano se obtuvo de los Servicios de Cirugía Torácica y Patología del Consorcio Hospital General Universitario de Valencia y Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia, con los respectivos dictámenes favorables de los comités de ética antes mencionados. Dicho tejido procede de dos tipos de pacientes: A) pacientes con EPOC (n=15) B) donantes de órganos con función pulmonar normal, empleados como controles (n=25).

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

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

Tabla 8. Número de pacientes en tejido pulmonar

Sujetos Control	Pacientes EPOC
25	15

Se obtuvo la aprobación por el comité ético de investigación clínica (CEIC) del Consorcio Hospital General Universitario de Valencia (CHGUV) y por el comité de la investigación con medicamentos (CEIm) del Hospital Universitario y Politécnico de La Fe de Valencia, además del consentimiento informado de cada uno de los participantes o representantes legales.

1.5 Animales

Todos los procedimientos realizados con animales de experimentación fueron previamente evaluados por el Comité de Ética y Bienestar Animal de la Universidad de Valencia, que aprobó la realización del procedimiento animal con título “Activation of Nuclear Factor Erythroid 2-related (Nrf2) system as an antioxidant therapy in COPD and ARDS patients: insights in human and animal models” y código 2020/VSC/PEA/0213 (**Anexo III**), de un segundo procedimiento animal con título “Activación del Factor Nuclear Eritroide 2 (Nrf2) como terapia antioxidante en pacientes EPOC” y código 2020/VSC/PEA/0212 (**Anexo IV**).

En ambos procedimientos se emplearon 70 ratones C57BL6/J macho (Charles River Laboratory) de 12 semanas de edad y de un peso aproximado de entre 25-30g.

Fueron estabulados a lo largo de todo el estudio con comida (dieta Harlan® Ref. 2014) y agua ad libitum. Se repartieron de forma aleatoria en jaulas y éstas a su vez en grupos experimentales distintos. Para realizar un seguimiento individualizado de cada ratón y de cada rata, se identificó

al animal mediante crotales insertados en la oreja y numerados consecutivamente. Las condiciones estándar del animalario fueron:

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

2. Métodos

2.1 Cultivos celulares

2.1.1 Líneas celulares inmortalizadas

Para el presente trabajo se emplearon diferentes líneas celulares inmortalizadas de origen comercial (**Figura 18**):

2.1.1.1 **BEAS2B**

Para la experimentación con células epiteliales pulmonares se empleó la línea celular inmortalizada de epitelio bronquial humano BEAS-2B (ATCC® CRL-9609™; Manassas, VI, EEUU). Fueron cultivadas en placa colagenizada (10 µg/cm² de colágeno tipo I de rata; Sigma-Aldrich; Saint Louis, MO, EEUU) con medio Airway Epithelial Growth Medium (PromoCell, Heidelberg, Alemania) suplementado con 1% de Penicilina/Estreptomina (Lonza Group, Basilea, Suiza) y 1% de Anfotericina B (Cytiva; Washington DC, EEUU) a 37°C con 5% CO₂. El medio fue reemplazado cada 48 horas.

El medio Airway Epithelial Cell Growth Medium contiene medio basal para células epiteliales suplementado con: extracto de pituitaria bovina (0,004 ml/ml), hidrocortisona (0,5 µg/ml), factor de crecimiento epidérmico humano recombinante (10 ng/ml), epinefrina (0,5 µg/ml), transferrina (10 µg/ml), insulina (5 µg/ml), triyodo-L-trionina (6,7 ng/ml) y ácido retinoico (0,1 ng/ml).

2.1.1.2 **Monocitos U937**

Para la experimentación con células inflamatorias en la que no fue posible el uso de neutrófilos se utilizó la línea celular monocítica U937 (ATCC® CRL-1593.2™; Manassas, VI, EEUU). Fueron cultivadas en suspensión sobre placa con medio Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI, Biowest; Riverside, MO, EEUU) suplementado con 10% SFB (Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, EEUU), 1% de Penicilina/Estreptomina y 1% de Anfotericina B a 37°C con 5% CO₂. El medio fue reemplazado mediante centrifugación cada 48 horas.

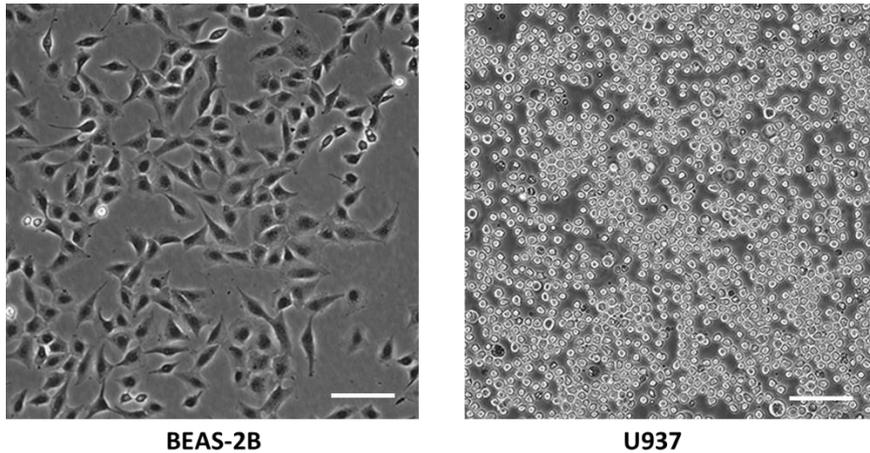


Figura 18. Morfología de las líneas celulares inmortalizadas utilizadas. Las fotografías muestran cultivos en monocapa con alta confluencia. La barra de escala corresponde a 100 μm . Imágenes obtenidas de www.atcc.org

2.1.2 Células primarias

2.1.2.1 Epiteliales bronquio SANO y EPOC

El aislamiento y cultivo primario de células epiteliales bronquiales humanas (CEBH) a partir de fragmentos de bronquiolo se realizó tal y como se ha descrito previamente ⁴⁴⁸. Se obtuvieron a partir de sujetos sanos y pacientes EPOC (**Figura 19**).

En primer lugar se asilaron los bronquiolos del parénquima pulmonar y se escindió un fragmento con un diámetro interno de aproximadamente 0,5-1 mm. Este fragmento fue diseccionado y limpiado cuidadosamente para eliminar restos de parénquima pulmonar y se lavó con suero fisiológico estéril. Tras la limpieza del fragmento, este se cortó longitudinalmente y se obtuvieron explantes de aproximadamente 2 mm que se depositaron en placas de 6 pocillos cubiertas con colágeno previamente ($10\mu\text{g}/\text{cm}^2$), a razón de 4-5 explantes por pocillo. Los explantes se orientaron de forma que la capa epitelial interior estuviese en contacto con la superficie del pocillo. Se dejaron secar los fragmentos para facilitar la adherencia del explante a la superficie y se añadieron un par de gotas por fragmento de medio para células epiteliales aéreas (Airway Epithelial Cell Growth Medium). Las placas se incubaron a 37°C con 5% de CO_2 . Pasados dos días se añadió 1mL de este medio.

Las CEBH crecieron alrededor de los explantes, alcanzando una confluencia adecuada tras un periodo de aproximadamente 7 a 12 días. A partir de ese momento se retiraron los explantes y los cultivos celulares fueron utilizados para medir la expresión, tanto de ARNm como de

proteína. También se utilizaron los cultivos celulares para realizar análisis por inmunofluorescencia.

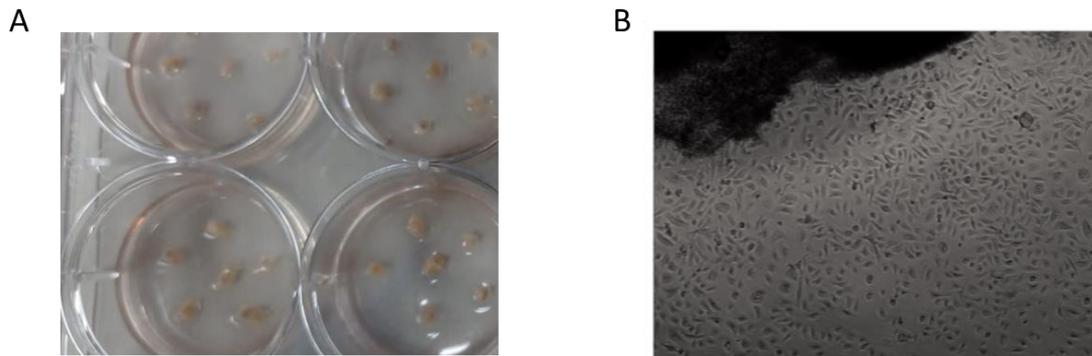


Figura 19. Morfología de las células epiteliales bronquiales humanas. A) Explantes de bronquiolo humano colocados en pocillos de placas de cultivo. **B)** Células epiteliales creciendo alrededor del explante.

2.1.2.2 **Neutrófilos: aislamiento**

Para el aislamiento de neutrófilos a partir de sangre periférica, la sangre del paciente o voluntario se mezcló con Dextrano 500 (Sigma-Aldrich; Saint Louis, MO, EEUU) al 3% en la proporción 2:1 a temperatura ambiente dejándolo reposar durante aproximadamente 1 hora con el fin de sedimentar la mayoría de los eritrocitos (**Figura 20**).

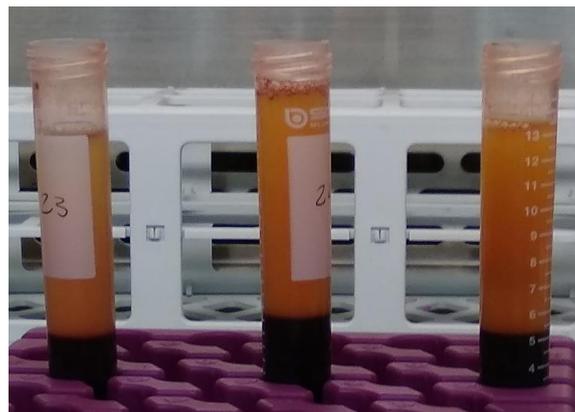


Figura 20. Eritrocitos sedimentados una hora después de la mezcla con Dextrano 500. En la parte alta se encuentran el resto de células sanguíneas mientras que en la parte baja se encuentran los eritrocitos.

Una vez transcurrido este tiempo, se aisló el sobrenadante añadiéndolo poco a poco sobre Ficoll-Paque™ Plus (GE Healthcare; Chicago, IL, EEUU) en una proporción 2:1 (sobrenadante:ficoll)

(Figura 21 A) y se centrifugó a 1800 rpm (aceleración: 2; deceleración: 1) a 4°C durante 30min para la separación de los elementos celulares sanguíneos por gradiente de densidad (Figura 21 B).

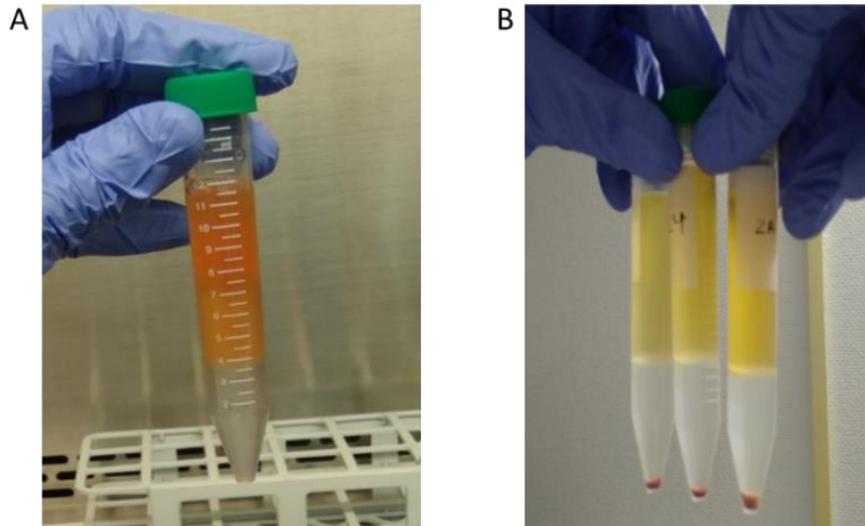


Figura 21. Pasos en el aislamiento de neutrófilos. A) Células sanguíneas recogidas y depositadas sobre Ficoll-Paque. **B)** Células sanguíneas separadas por gradiente de densidad después de la centrifugación con Ficoll-Paque.

El sobrenadante obtenido de esta centrifugación fue descartado y el pellet celular fue resuspendido con 5 ml de solución de lisis de eritrocitos a 4°C, dejándolo reposar en hielo durante 15 minutos con el fin de eliminar los restos de eritrocitos (la solución de lisis se preparó diluyendo 0,829 gr de NH_4Cl (125 mM, PM = 53,20), 0,025 gr de NaHCO_3 (2,96 mM, PM = 84,01) y 0,186 gr de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (3,72 mM, PM = 452,24) en 100 ml de agua destilada autoclavada). Pasados los 15 minutos se centrifugó a 1200 rpm (Aceleración: 2, Deceleración: 1) durante 5 minutos. Todos los reactivos de la solución de lisis se obtuvieron de Panreac AppliChem (Darmstadt, Alemania)

El sobrenadante obtenido se descartó, el pellet celular fue resuspendido con 5 ml de Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS, Biowest; Riverside, MO, EEUU) a 4°C y se centrifugó a 1200 rpm (Aceleración: 2, Deceleración: 1) durante 5 minutos.

Una vez llegados existían dos alternativas:

- Los neutrófilos eran almacenados para medir su expresión génica basal. Para ellos, una vez extraídos se les añadió 250µl del reactivo Tripure® Isolation Reagent (Roche

Diagnostics; Basilea, Suiza), la mezcla se pasó a tubos de 1,5ml (Eppendorf™; Hamburgo, Alemania) y se almacenó a -80°C para la posterior extracción de ARN.

- Los neutrófilos eran sembrados para experimento de estimulación con EHT y fármaco. Para ello, se descartó de nuevo el sobrenadante y se resuspendió el pellet celular con 1ml de medio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Biowest; Riverside, MO, EEUU) suplementado con 10% SFB, 1% de Penicilina/Estreptomina y 1% de Anfotericina B. Posteriormente, el número de neutrófilos se determinó mediante cámara de Bürker diluyendo 1:10 con azul tripano (Lonza Group, Basilea, Suiza) y se sembraron 10⁶ células/pocillo en placa de 24 pocillos dejando un periodo de adaptación de los neutrófilos a la placa de 1 hora a 37°C y 5% de CO₂. Tras este periodo de adaptación, se procedía a la estimulación con fármaco y EHT.

2.2 *Diseño experimental: estimulación in vitro con fármaco y EHT*

2.2.1 Preparación Extracto Humo de Tabaco

El EHT se obtuvo a partir de cigarrillos de investigación previamente mencionados. El cigarro se introdujo en una bomba de respiración (Apparatus Rodent Respirator 680, Harvard apparatus, Holliston, MA, EEUU) (**Figura 22**) y se generó humo simulando la acción humana de consumición de cigarro (3 respiraciones/minuto; 1 respiración 35 ml, cada respiración de 2 segundos de duración con 0,5 cm de volumen de cámara en el respirador). El humo de tres cigarrillos se burbujeó en un frasco con 25 ml de medio RPMI precalentado a 37°C. El EHT generado se filtró utilizando un filtro Millex-GS Syringe Driven Filter Unit (Sigma-Aldrich; Saint Louis, MO, EEUU) de 0,22µM. El extracto generado se consideró 100% EHT y se utilizó dentro de los 30 minutos posteriores a su preparación diluyéndose a las concentraciones empleadas como estímulo en los experimentos ⁴⁵³⁻⁴⁵⁵.

La normalización y calidad de la solución de EHT se comprobó mediante medida de absorbancia a 320 nm, longitud de onda específica de absorción del peroxinitrito contenido en el EHT. Las soluciones de EHT madre presentaron una absorbancia de 0.86 ± 0.05.

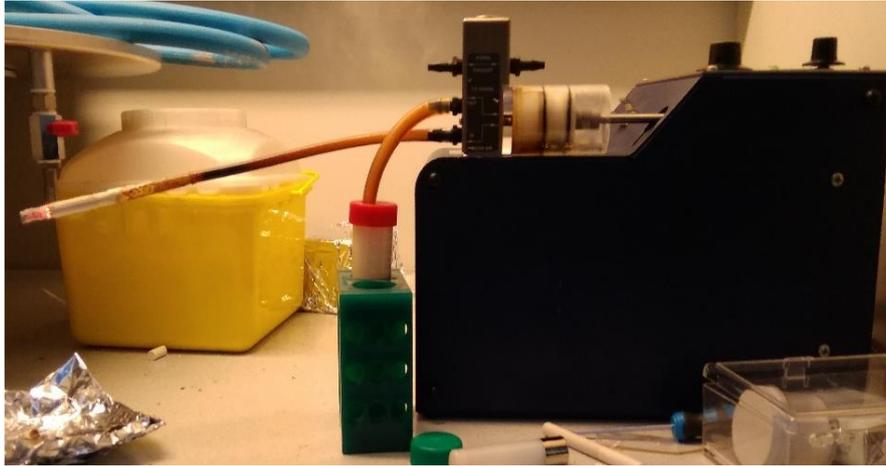


Figura 22. Bomba de respiración empleada para generar extracto de humo de tabaco.

2.2.2 Estimulación in vitro

Para los experimentos in vitro de este trabajo, los diferentes tipos celulares fueron estimuladas con EHT a diferentes porcentajes, en la mayoría de los casos al 3% como se explicará más adelante, durante los tiempos indicados (1h, 24h o 48h). Los porcentajes fueron elegidos para mantener la viabilidad celular a un 70-80% tras 24h de exposición al EHT o tras la realización de ensayos dosis-efecto del EHT. Los fármacos se añadieron a las diferentes concentraciones antes de la estimulación con EHT, 1h o 24h según el estudio como se verá a continuación. Las condiciones llamadas como control o estímulo fueron tratadas con la misma proporción de vehículo que las condiciones tratadas con fármaco, DMSO o agua. En la totalidad de los casos el porcentaje de DMSO máximo fue de menos del 0,003%, excepto en el caso de los ensayos en los que se trabajaba con obacunona, donde el porcentaje máximo fue de un 0,2% DMSO, porcentaje aceptable como se ha observado previamente con este fármaco ⁴²⁴.

2.3 Ensayo de viabilidad celular mediante MTT

Con el fin de comprobar la viabilidad celular del tabaco y la capacidad de los fármacos de prevenir la muerte celular sobre cultivo de epiteliales de bronquio en monocapa, se realizó un ensayo basado en la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT, Sigma-Aldrich; Saint Louis, MO, EEUU). La reducción metabólica del MTT se produce a través de la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa, transformándolo en un compuesto de color azul (formazan) cuantificable, permitiendo determinar el funcionamiento mitocondrial de las células y, por tanto, su viabilidad.

Para este ensayo, se sembraron 20000 y 30000 BEAS en placa de 96 pocillos (Corning Incorporated; Corning, NY, EEUU) en su medio correspondiente y se mantuvieron en incubación a 37°C y 5% de CO₂ hasta que alcanzaron una confluencia de 60%. Tras ello, las células fueron estimuladas a distintos porcentajes de EHT (2.5, 5 y 10%) durante 24h, los distintos fármacos se añadieron 1h antes del estímulo. Se utilizó como control positivo sodio docedil sulfato (SDS, Sigma-Aldrich; Saint Louis, MO, EEUU) al 0,2%. Tras la incubación durante 24h, se retiró el medio de cultivo de los pocillos y se incubó durante 3h con MTT 1 mg/mL. Tras ello, se lavaron las células con DPBS y, a continuación, se incubaron las células con DMSO durante 10min, tras lo que se procedió a la lectura de la absorbancia del formazan mediante espectrofotometría a 570nm con el equipo Infinite M200 (Tecan Group Ltd., Männedorf, Suiza).

2.4 Liberación de GSH mediante técnica luminiscencia

Para la presente tesis se utilizó el protocolo GSH-Glo™ Glutathione Assay (Promega; Madison, WI, EEUU), un ensayo basado en luminiscencia para la detección y cuantificación de GSH. El ensayo se fundamenta en la conversión de un precursor de la luciferina en luciferina en presencia de GSH, catalizada por la GST. La señal generada en una reacción acoplada con luciferasa de luciérnaga es proporcional a la cantidad de GSH presente en la muestra.

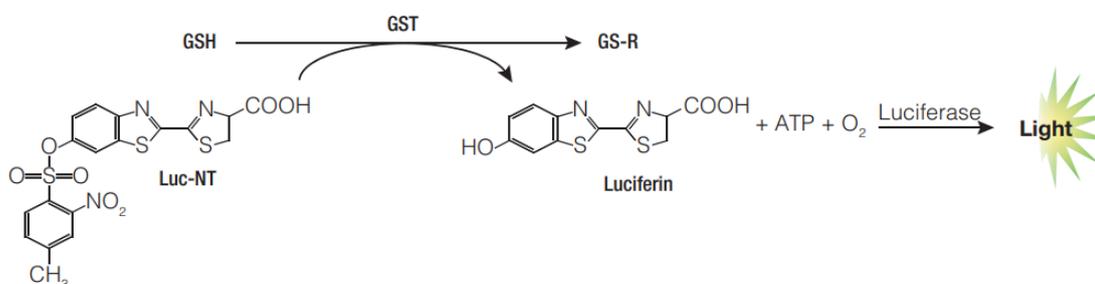


Figura 23. Esquema general de la reacción ocurrida en el ensayo GSH-Glo™ Glutathione. Imagen obtenida de www.promega.es. Abreviaturas: GSH: glutatió reducido; GS-R: glutatió oxidado; GST: glutatió-S-transferasa; Luc-NT: precursor luciferina.

En este ensayo las células crecieron, se trataron, se lisaron y se ensayaron en la misma placa. Para ello se sembraron 20000 BEAS-2B y 20000 CEBH por pocillo en placas de cultivo de 96 pocillos negras previamente recubiertas por colágeno (Corning Incorporated; Corning, NY, EEUU). Por otro lado, se sembraron 50000 neutrófilos y 20000 monocitos por pocillo en placas de cultivo de 96 pocillos negras en suspensión. Las células sembradas se mantuvieron en

incubación a 37°C y 5% de CO₂ hasta que alcanzaron una confluencia del 60%, normalmente 24h. Tras esto las células se trataron con los distintos fármacos a las concentraciones indicadas anteriormente y se incubaron a 37°C y 5% CO₂ durante 24h. Transcurrido este tiempo, las células se estimularon con EHT al 3% durante 1h. Posterior a esto, se procedió a la determinación de GSH tal como indica el protocolo. En el caso de los neutrófilos, la estimulación con EHT y la determinación de GSH se produjo tras el aislamiento de los mismos debido a su corta vida.

Para la cuantificación de la concentración de GSH se preparó una curva estándar de GSH, tal como indica el protocolo. Se utilizó una solución madre de 5mM y se prepararon diferentes concentraciones hasta obtener unas concentraciones finales que iban desde 0µM a 5µM. Se añadieron 10µl de cada dilución por pocillo y en duplicados.

Para las células adherentes se utilizó el reactivo GSH-Glo™ al 1X, que contiene el sustrato de la luciferina y la GST diluidos 1:100 en el tampón de reacción GSH-Glo™. Se añadió 100µL por pocillo de este reactivo y se incubó a 37°C durante 30min. Para las células en suspensión se utilizó el reactivo GSH-Glo™ al 2X, que contiene el sustrato de la luciferina y la GST diluidos 1:50 en el tampón de reacción GSH-Glo™, se añadieron 50µL por pocillo de este reactivo a los 50µL de las células en suspensión y se incubó a 37°C durante 30min. Transcurridos estos 30min, en ambos casos se añadieron 100µl del reactivo de detección que contiene la luciferina y se incubaron las placas a 37°C durante 15min. Tras esto se procedió a la lectura de luminiscencia en un lector de microplacas LUMIstar OMEGA (BMG Labtech; Ortenberg, Alemania).

Los resultados obtenidos de luminiscencia se extrapolaron con la curva estándar para la conversión de luminiscencia a concentración de GSH.

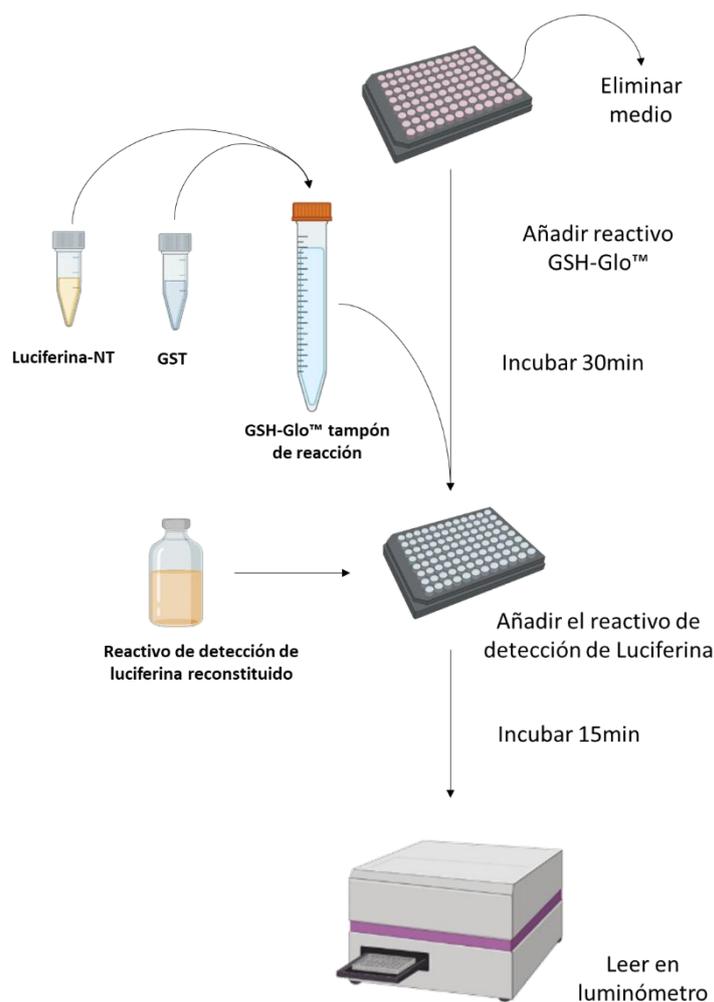


Figura 24. Protocolo ensayo GSH-Glo™ Glutathione. Se retira el medio de la placa que contiene las muestras y se añaden la luciferina-NT y la GST al tampón de reacción GSH-Glo™ para obtener el reactivo GSH-Glo™, que se añade a la placa. Tras una incubación de 30 minutos, se añade a la placa el reactivo de detección de luciferina reconstituido. Tras 15 minutos de incubación, se mide la luminiscencia con un luminómetro. Creada con BioRender.

2.5 Detección de Especies Reactivas de Oxígeno

Para la detección de ERO, se empleó la sonda CM-H₂DCFDA (Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, EEUU). El compuesto CM-H₂DCFDA es un derivado clorometílico de H₂DCFDA, que resulta útil como indicador de ERO en células. Su grupo de clorometilo reactivo al tiol reacciona con el glutatión y otros tioles. La oxidación posterior produce un aducto fluorescente que queda atrapado dentro de la célula, por lo que facilita los estudios a largo plazo. La fluorescencia puede monitorizarse mediante un citómetro de flujo, un fluorímetro, un lector de microplacas o un microscopio de fluorescencia a través de fuentes de excitación y filtros adecuados para la fluoresceína. Se utiliza para ello una longitud de onda de excitación de aproximadamente 492 – 495nm y una longitud de onda de emisión de 517 – 527nm.

Para este experimento in vitro, la monitorización de la fluorescencia se realizó de dos formas distintas según el tipo celular con el que trabajábamos. Para las BEAS-2B la lectura de la fluorescencia emitida se llevó a cabo mediante un lector de microplacas de fluorescencia, mientras que para las CEBH primarias, tanto sanas como EPOC, se realizó mediante citometría de flujo. En ambos casos sin embargo, tanto las CEBH como las BEAS-2B fueron estimuladas con EHT 5% durante 1h y se procedió a la detección de las ERO. Los fármacos se añadieron 24h antes de la estimulación con EHT. En ambos casos se utilizó como control positivo el tert-Butyl hydroperoxide (Sigma-Aldrich; Saint Louis, MO, EEUU) a 0,77mM.

En el caso de las BEAS-2B, se sembraron 20000 células por pocillo en placas de 96 pocillos negras previamente colagenizadas y se mantuvieron en incubación hasta alcanzar una confluencia del 60% aproximadamente. Tras esto las células fueron tratadas y estimuladas como se ha indicado anteriormente. Una vez transcurrido el tiempo de estímulo, se eliminó el medio y se realizaron lavados con DPBS. A continuación, las células se incubaron con la sonda CM-H2DCFDA a 5µM durante 30min en oscuridad . Transcurrido este tiempo, se lavaron las células con DPBS y se procedió a la lectura de la fluorescencia en lector de microplacas Gemini XPS (Molecular Devices; San José, CA, EEUU).

En el caso de las CEBH, se sembraron 50000 células por pocillo en placas de 24 pocillos (Corning Incorporated; Corning, NY, EEUU) previamente colagenizadas y se mantuvieron en incubación hasta alcanzar una confluencia del 60%. Tras esto las células fueron tratadas y estimuladas como se ha indicado anteriormente. Una vez transcurrido el tiempo de estímulo, se eliminó el medio y se realizaron lavados con DPBS. A continuación las células fueron levantadas con la enzima TrypLE™ Express (Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, EEUU), pasadas a tubos de microcentrífuga, centrifugadas 5min a 1200 rpm y resuspendidas en 100µl de sonda a 3µM en staining buffer (Thermo Fisher Scientific; ; Waltham, MA, EEUU) durante 30min en oscuridad a 37°C. Transcurrido este tiempo, las células se volvieron a centrifugar 5min a 1200rpm para eliminar el medio con la sonda y se resuspendieron en 400µl de staining buffer y se añadió 2µl de yoduro de propidio (IP (Molecular probes™, Thermo Fisher Scientific; ; Waltham, MA, EEUU). A continuación, se procedió a la detección de la fluorescencia utilizando el citómetro de flujo BD FACSVers™ (BD Bioscience; San José, CA, EEUU). Se analizaron un mínimo de 10.000 células para cada una de las condiciones. Los datos fueron analizados por el software Flow-Jo TreeStar (BD Biosciences; San José, CA, EEUU).

Se tomaron al menos tres réplicas por prueba, se seleccionaron mediante los diagramas obtenidos las población de células vivas y en singletes y de esta población se obtuvo el diagrama

para la determinación de la media de fluorescencia del canal FITC (donde emite la sonda empleada), lo que nos indicó los niveles de ERO.

2.6 Inmunofluorescencia

Estos experimentos se llevaron a cabo en CEBH y en BEAS-2B, para ello, fueron tratadas con los fármacos durante 24h. Transcurrido este tiempo, la células se lavaron 3 veces con DPBS y se fijaron con metanol 100% a -20°C durante 5 minutos. A continuación, las células se permeabilizaron con Triton X-100 (Panreac Applichem; Glenview, IL, EEUU) en tampón fosfato salino (PBS, Sigma-Aldrich; Saint Louis, MO, EEUU) (TBST) al 0,1% durante 8 minutos y se bloquearon con BSA (Sigma-Aldrich; Saint Louis, MO, EEUU) al 1% en PBS durante 1h a temperatura ambiente. Se añadió el anticuerpo primario disuelto (**Tabla 9**) en BSA 0,1%/TBST y se incubaron toda la noche en una cámara húmeda. Tras 3 lavados con TBST se añadió el anticuerpo secundario (**Tabla 9**) disueltos en BSA 0,1%/TBST y se incubaron 1h a temperatura ambiente y en oscuridad. Luego, se lavaron las células 3 veces con PBS y se marcaron los núcleos celulares con 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI, dilución 1:10000) (Invitrogen; Waltham, MA, EEUU) durante 3 minutos y se lavaron de nuevo. Finalmente, se procedió al montaje de las muestras con Fluoroprep (bioMérieux®, Marcy-l'Étoile, Francia) y un cubreobjetos. Las células se visualizaron en el microscopio Nikon Eclipse TE200 (Nikon Corporation; Tokyo, Japón).

Tabla 9. Anticuerpos primario y secundario empleados en inmunofluorescencia

Epítipo	Referencia	Dilución	Origen	Fluorocromo	Buffer
NRF2	Abcam (ab89443)	1:100	Ratón	Verde	BSA 0,1%/TBST
IgG (H+L) Ratón	Invitrogen (A-11001)	1:200	Cabra	Verde	BSA 0,1%/TBST

2.7 Determinación de la apoptosis celular mediante citometría de flujo

Para la determinación de los niveles de apoptosis celular se utilizó la técnica de citometría de flujo basada en la detección de anexina V, conocido marcador de apoptosis celular^{456,457}. Para

ello, las CEBH y las BEAS-2B se sembraron, 20000 células por pocillo, en placas de 96 pocills y se mantuvieron en cultivo monocapa durante 24h a 37°C y 5% CO₂. Tras esto las células fueron tratadas con los diferentes fármacos a las distintas dosis y se incubaron durante 24h más, finalmente fueron tratadas con EHT 8,5% durante 24h, tras lo que se procedió a la determinación de la apoptosis por citometría de flujo.

El medio con los fármacos y el EHT fue retirado, y conservado. Las células se lavaron con DPBS y éste se guardó con el resto del medio. Se añadió tripsina para levantar el cultivo, dejándose actuar durante 5 min. Una vez levantadas las células, se mezcló el medio inicial, el DPBS tras el lavado y la resuspensión celular en un mismo pocillo. A continuación, se utilizó el Annexin VFITC Apoptosis Detection Kit (Abcam; Cambridge, Reino Unido) para la detección de la apoptosis celular. Se añadió anexina V asociada al fluorocromo FITC (del inglés Fluorescein IsoTioCyanate) y yoduro de propidio (IP) incubándose durante 15min a temperatura ambiente bajo condiciones de oscuridad. El IP aparece cuando las células rompen sus membranas, una característica de necrosis y apoptosis tardía. Por último, se añadió el tampón de unión anexina V y se midieron utilizando el citómetro de flujo BD LSRFortessa™ X-20 (BD Biosciences; San Jose, CA, EEUU) antes de pasada 1 hora. Se analizaron un mínimo de 10000 células para cada una de las condiciones. Los datos fueron analizados por el software Flow-Jo TreeStar. Se tomaron al menos tres réplicas por prueba, se representaron los diagramas obtenidos del análisis de la anexina V asociada a FITC frente al IP. Los diagramas se pueden dividir en cuatro cuartiles (Q) que se definen de la siguiente manera: Q1 células necróticas (IP/FITC, +/-); Q2 células apoptóticas tardías (IP/FITC, +/+); Q3 células viables (IP/FITC, -/-) y Q4 células apoptóticas tempranas (IP/FITC, -/+). Los datos de los cuartiles tomados para la representación de la apoptosis celular fueron la suma del Q2 y el Q4, y los resultados se expresaron como media de cada uno de ellos.

2.8 Modelos animales

2.8.1 Inflamación pulmonar aguda por instilación intratraqueal de LPS

Para el modelo en ratón de daño pulmonar y exacerbación, la inflamación pulmonar se indujo mediante la instilación intratraqueal única de LPS mencionado anteriormente en este trabajo.

Para este estudio se utilizaron 70 ratones C57BL6/J macho de 12 semanas de edad divididos en 7 grupos homogéneos (n=10):

- Control (n=10)
- LPS (n=10)
- LPS + CDDO-Me 10mg/kg (n=10)
- LPS + CDDO-Me 5mg/kg (n=5)
- LPS + Roflumilast 5mg/kg (n=5)
- LPS + Omaveloxolona dosis 10mg/kg (n=10)
- LPS + Omaveloxolona dosis 5mg/kg (n=10)
- LPS + Obacunona 10mg/kg (n=10)

A los ratones LPS+fármaco se les administró el activador de NRF2 mediante administración oral forzada 48h, 24h y 1h antes de la instilación con LPS. En el caso de los ratones LPS y Control no se les administraron los activadores de NRF2, en su lugar se administró el vehículo de forma oral forzada (aceite de sésamo) paralelamente a los ratones LPS+fármaco para que todos los grupos de ratones estén sometidos a los mismos procedimientos.

A las 48h tras la primera administración del fármaco, a los ratones de los grupos LPS y LPS+fármaco se les realizó una instilación de LPS de forma intratraqueal para exacerbar la respuesta inflamatoria pulmonar (5mg/kg).

Para la instilación intratraqueal se anestesió al animal mediante anestesia inhalatoria con Isoflurano (Aerrane®, Baxter SL; Riba-roja del Turia, España) y manteniendo esta anestesia se procedió a la intubación de la tráquea. El animal se colocó en posición decúbito esternal, se le abrió la boca, se le separó la lengua hacia un lado con ayuda de unas pinzas y situó una lámpara a la altura de la tráquea para facilitar la visualización de la entrada de la tráquea. Una vez localizada, se introdujo una cánula de 16G a través de la cual se instiló el volumen de solución de LPS.

La administración se realizó mediante jeringas estériles de insulina de 1ml (BD Plastipak®; Franklin Lakes, NJ, EEUU) o micropipeta. Previa a la administración, para verificar la correcta canulación intratraqueal, se insuflaron 2mL de aire y se comprobó el inflamamiento pulmonar. Tras la administración de la solución de LPS se insuflaron 1mL de aire para facilitar el arrastre del producto y asegurar la correcta administración del producto.

A los ratones Control se le instiló de forma intratraqueal 25µl de PBS de forma paralela a los ratones LPS y LPS+fármaco.

Los animales se pesaron de forma periódica durante todo el experimento y se les aseguró el acceso a agua y comida.

Tras 24h de la instilación de LPS se procedió a la eutanasia de todos los ratones para la evaluación de distintos parámetros moleculares.

La **Figura 25** muestra un esquema del procedimiento seguido:

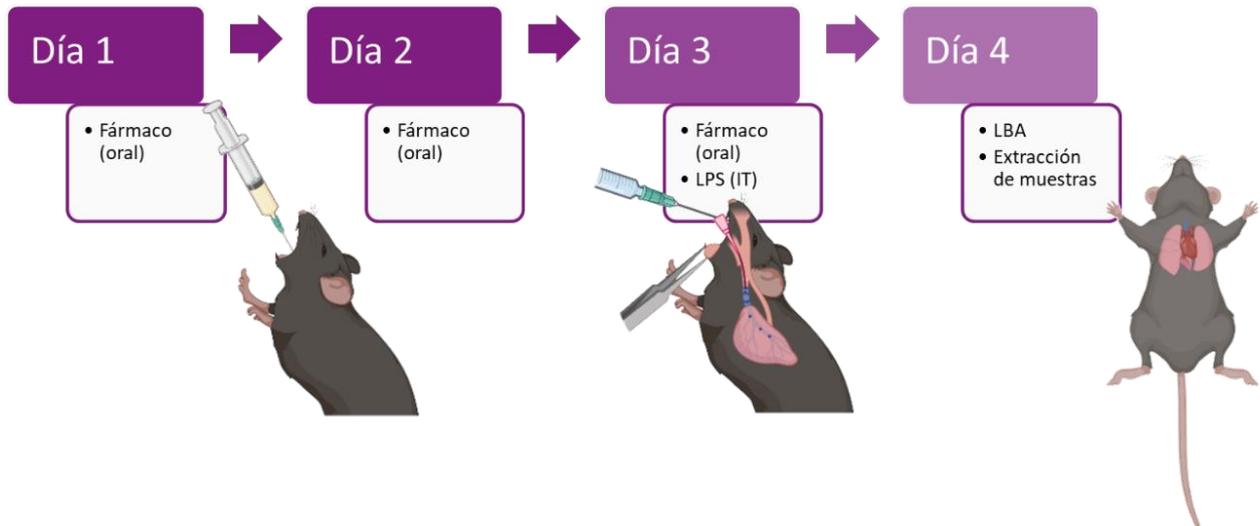


Figura 25. Esquema del modelo animal de daño pulmonar y exacerbación por LPS en ratones C57BL6/J.

IT: intratraqueal; LBA: lavado broncoalveolar. Creado con Biorender

2.8.2 Modelo animal de exacerbación en la EPOC inducido por instilación de LPS y exposición a humo de tabaco

Para generar el modelo de ratón de exacerbación en la EPOC, se realizó la instalación intratraqueal de LPS para exacerbar la respuesta inflamatoria pulmonar seguida de exposición continuada a humo de tabaco (HT) obtenido a partir de los cigarrillos de investigación descritos previamente.

Se utilizaron 70 ratones C57BL6/J macho de 12 semanas de edad divididos en 8 grupos (n=10 o n=5)

- Control (n=10)
- Exposición Humo de Tabaco (HT) + LPS (n=10)
- HT+ LPS+ CDDO-Me 5mg/kg (n=10)

- HT + LPS + Roflumilast 5mg/kg (n=10)
- HT + LPS + Omaveloxolona dosis 10mg/kg (n=10)
- HT + LPS + Omaveloxolona dosis 5mg/kg (n=10)
- HT + LPS + Obacunona 10mg/kg (n=10)

A los ratones HT+ LPS y HT+ LPS+fármaco se les realizó una instilación de LPS de forma intratraqueal pulmonar (4mg/kg) tal y como se ha explicado anteriormente. A las 24 horas de la instilación de LPS, los ratones HT + LPS y HT + LPS + fármaco fueron expuestos al humo de tabaco durante 4 días consecutivos. Previamente a la exposición a humo de tabaco, se les administró a los ratones sus respectivos fármacos o vehículo. El primer y segundo día fueron expuestos al humo de 6 cigarrillos, el tercer día a 8 y el cuarto día a 10. La exposición a cada cigarrillo dura por lo menos 5 minutos seguida de 8 minutos de exposición al aire ambiental con un flujo de 5l/min⁴⁵⁸.

Un sistema semiautomático (TSE Systems Head Nose Only; Berlín, Alemania) controló la duración de las caladas (1,9 segundos) y la separación entre las mismas (20 segundos). Los animales del grupo Control recibieron el mismo volumen de PBS de forma intratraqueal y fueron expuestos al oxígeno ambiental y sometidos a un estrés por inmovilización en habitáculos similares a los de la máquina de fumar (**Figura 26**).

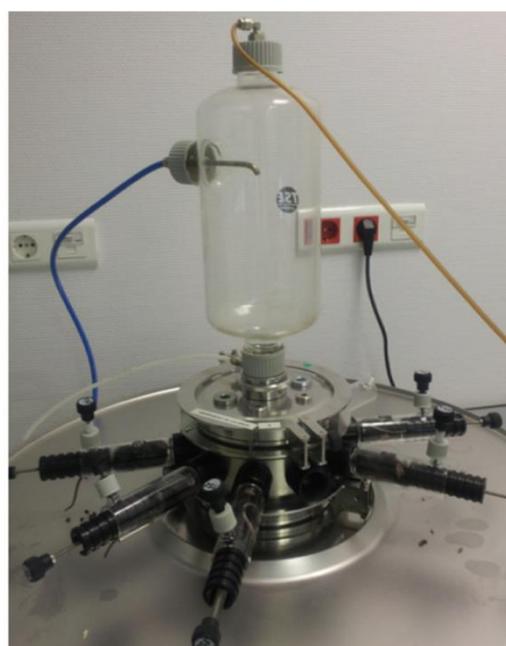
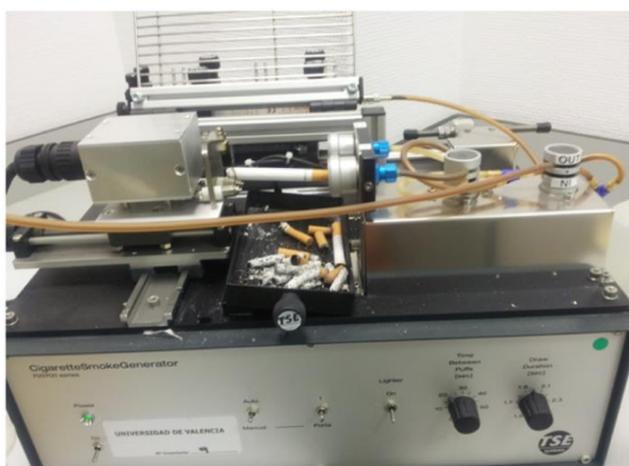


Figura 26. Sistema semiautomático de exposición pasiva al humo del tabaco de TSE systems® (“nose-only system”)

A los ratones EHT + LPS + fármaco se les administró los activadores de NRF2 mediante administración oral forzada diariamente 1h antes de la exposición con humo de tabaco. En el caso de los ratones EHT + LPS y Control no se les administró los activadores de NRF2, en su lugar se les administró el vehículo (aceite de sésamo) de forma oral paralelamente a los ratones EHT + LPS + fármaco para que todos los grupos de ratones estén sometidos a los mismos procedimientos. Los animales se pesaron diariamente durante todo el experimento.

Con el fin de evaluar la instauración y evolución de la enfermedad, se realizaron pruebas de imagen mediante tomografía computarizada (TC) y mediante imagen de fluorescencia in vivo mediante el sistema IVIS (PerkinElmer; Waltham, MA, EEUU) a día 0 y día 6 de la instalación de LPS. A día 6, además, se procedió a la eutanasia de todos los ratones para la evaluación de distintos parámetros moleculares.

La **Figura 27** muestra el procedimiento seguido en este modelo:

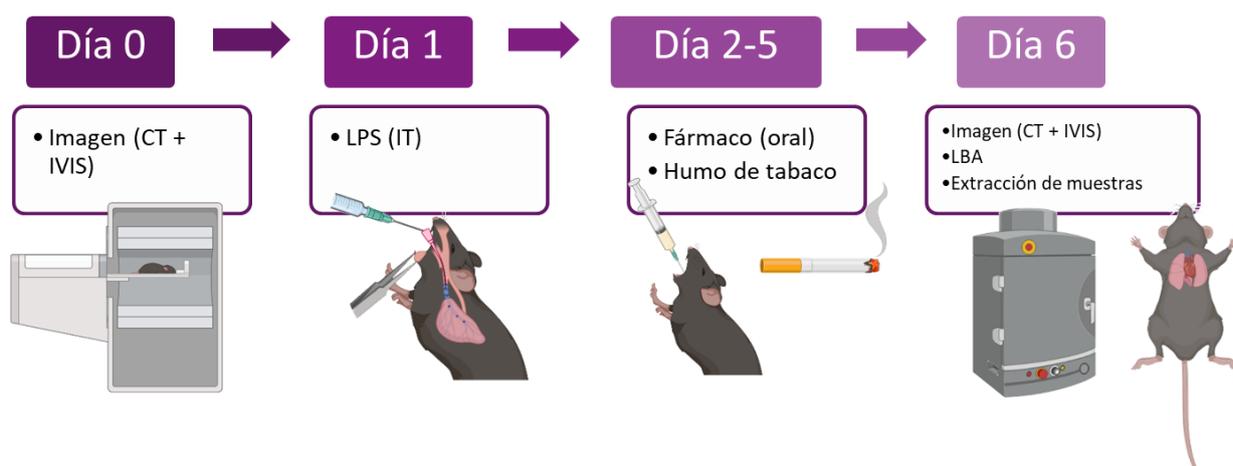


Figura 27. Esquema del modelo animal de exacerbación por LPS y exposición a humo de tabaco en ratones C57BL6/J.

CT: Tomografía Computarizada; HT: humo de tabaco; IT: intratraqueal; LBA: lavado broncoalveolar.
Creado con Biorender

2.8.3 Preparación de fármacos y estímulos

LPS: se preparó en solución con PBS 1x a una concentración de 2,7mg/ml y se administró por vía intratraqueal para que la concentración final fuera de 5mg/kg o 4mg/kg según el modelo (alrededor de 20-40µl por ratón).

CDDO-Me: se preparó una solución stock con DMSO a una concentración de 20mg/ml. El día de la administración se preparaba una solución con aceite de sésamo a una concentración de 0,5mg/ml. Y se administraba el volumen determinado para que la concentración final en el ratón fuera de 10mg/kg o 5mg/kg (alrededor de 200ul para 10mg/kg y 100ul para 5mg/kg).

Omaveloxolona: se preparó una solución stock con DMSO a una concentración de 100mg/ml. El día de la administración se preparaba una solución con aceite de sésamo a una concentración de 1mg/ml. Y se administraba el volumen determinado para que la concentración final en el ratón fuera de 10mg/kg o 5mg/kg (alrededor de 200ul para 10mg/kg y 100ul para 5mg/kg).

Obacunona: se preparó una solución stock con DMSO a una concentración de 100mg/ml. El día de la administración se preparaba una solución con aceite de sésamo a una concentración de 1mg/ml. Y se administraba el volumen determinado para que la concentración final en el ratón fuera de 10mg/kg (alrededor de 200ul).

Roflumilast: se preparó una solución stock con DMSO a una concentración de 50mg/ml. El día de la administración se preparaba una solución con aceite de sésamo a una concentración de 0,5mg/ml. Y se administraba el volumen determinado para que la concentración final en el ratón fuera de 5mg/kg (alrededor de 200ul).

2.9 Imagen IN VIVO: TC - IVIS

2.9.1 TC

La adquisición de imágenes de TC se emplearon para realizar ensayos desitométricos del entorno pulmonar. Los ratones fueron sometidos a pruebas TC a día 0 y 6.

La adquisición de las imágenes se realizó mediante el sistema multimodal micro-TC (Albira I, Bruker Biospin PCI GmbH Rheinstetten, Germany). Para la adquisición de las imágenes CT los ratones fueron anestesiados durante la adquisición de imágenes. Para ello se realizó una doble anestesia (Cyprane Keighlet), una de inducción a 4-5% de isoflurano con el 100% de oxígeno, luego mantenida al 1.5-2% de isoflurano para la obtención de las imágenes. Cada ratón se colocó en decubito prono en la camilla de ratón estándar del Albira-II®. Una vez finalizadas las adquisiciones, los ratones fueron retirados de la camilla y estabulados bajo observación.

La adquisición mediante TC (Carestream Molecular Imaging, Woodbridge, CT) se realizó con buena calidad de adquisición, dosis alta (0,8mA) y voltaje alto (45Kv) con la modalidad de adquisición single 0mm (en el cual se cubre alrededor de 75mm del animal) el y algoritmo de reconstrucción CT.REc.Alg".

Las imágenes procedentes de TC fueron analizadas y cuantificadas mediante el software libre de análisis de imagen AMIDE. Se determinaron volúmenes de interés (VOI) de la región pulmonar. El VOI fue analizado para cada sujeto para sus distintos días de adquisición. Se calculó la media de unidades Hounsfield (HU) por unidad de pixel.

2.9.2 IVIS - LUMINA X5 (Perkin-Elmer)

Para el análisis in vivo de la inflamación pulmonar aguda 24h antes de la instilación de LPS y 24h después de la exposición a humo de tabaco los ratones fueron anestesiados con una mezcla de isoflurano al 2% y 2 L/min de oxígeno (previamente inducidos para dormirlos y poder realizar la administración de manera más precisa) utilizando un sistema de anestesia por inhalación y depilados con maquinilla para minimizar la interferencia con la señal fluorescente. Aproximadamente 24h antes de la adquisición de las imágenes se les inyectó a los ratones vía intravenosa el compuesto ProSense® 680 (2 nmol/150 mL en PBS por ratón; PerkinElmer, Waltham, MA, EEUU). ProSense® 680 es un agente de imagen in vivo de fluorescencia activable por proteasa que emite fluorocromos en el infrarrojo cercano (excitación 680 nm; emisión 700 nm). El agente ProSense® 680 se activa por la proteasas clave asociadas a enfermedades como la catepsina B, L, S y la plasmina, que se han visto que están implicadas en la EPOC ⁴⁵⁹. Además, este agente se ha recomendado por el fabricante para el estudio de la inflamación pulmonar por LPS ⁴⁶⁰. ProSense 680® es ópticamente silencioso en su estado no activado y se vuelve altamente fluorescente tras la activación mediada por la proteasa.

24h después de la inyección del agente, se tomaron las imágenes de los ratones utilizando una cámara de dispositivo de carga acoplada (CCD), el sistema de imágenes IVIS-Lumina X5 (PerkinElmer, Waltham, MA, EEUU), que consiste en una lámpara halógena de tungsteno de cuarzo de 150 vatios con un reflector dicróico, que proporciona luz para la excitación de la fluorescencia, y una cámara CCD superenfriada, con un campo de visión fijado a 7,5 cm por encima del estante de la muestra, montada en una cámara de muestras estanca a la luz (caja oscura) y un sistema informático basado en Windows. Se adquirieron también imágenes de Rayos X. Las imágenes reflejadas de Rayos X y las coloreadas por fluorescencia se superpusieron

y analizaron utilizando el software Living Image 3.1 (Xenogen Corporation, Alameda, CA, EEUU). El software Living Image utiliza una técnica de desmezcla espectral para reducir los efectos de la autofluorescencia del tejido nativo y calcula la contribución respectiva de cada uno de ellos en cada píxel de la imagen. Este software permite además determinar las regiones de interés (ROI) para poder medir la fluorescencia media. Los valores se mostraron como eficiencia radiante ($p/sec/cm^2/steradian/\mu W/cm^2$). Los resultados in vivo procedían de siete animales, también se realizaron imágenes ex vivo de pulmones extraídos de tres de los mismos animales.

2.10 Extracción de muestras: LBA y tejido

El último día del procedimiento (día 4 en el caso del modelo por LPS y día 6 en el caso del modelo de LPS + HT) se procedió al sacrificio de los animales mediante anestesia con isoflurano, una vez se hubieron llevado a cabo las adquisiciones de las imágenes. A continuación, se realizó una traqueotomía para obtener el LBA. Para ello se realizaron 2 lavados mediante la infusión y recuperación de 0,8mL de suero fisiológico (Braun GmbH; Kronberg im Taunus, Alemania) a través de una cánula de 24G. Parte del LBA recogido se empleó para hacer ensayos de recuento celular. Se centrifugó el volumen total de LBA (1200 rpm, 5 min), el sobrenadante se registró y se almacenó a $-80^{\circ}C$ inmediatamente para posteriores estudios de expresión proteica y el pellet se utilizó para el recuento celular total y diferencial.

Finalmente se llevó a cabo una toracotomía para extraer los pulmones, que se pesaron de forma conjunta. Se separó el pulmón derecho para el estudio histológico y, para ello, se fijó en una solución de Formaldehído 3,7-4% (Panreac Applichem; Glenview, IL, EEUU), para su posterior deshidratación e inclusión en parafina. El pulmón izquierdo se empleó para analizar la expresión génica y proteica. Para ello se diseccionó y almacenó en viales de 1 ml con RNAlater® (Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, EEUU) o en seco, respectivamente. Los viales con RNAlater® se congelaron a $-80^{\circ}C$, mientras que las muestras en seco se congelaron con nitrógeno líquido y fueron posteriormente almacenadas a $-80^{\circ}C$ hasta el día del análisis.

2.11 Recuento de células totales y diferenciadas en LBA

Para determinar la respuesta inflamatoria pulmonar generada en la inducción de la enfermedad en ambos modelos, se procedió al recuento de células totales extravasadas y al recuento de células diferenciadas en el LBA. El pellet obtenido tras la centrifugación del volumen recogido

de LBA se resuspendió con 500µl de PBS y se procedió al conteo celular como se indica a continuación.

2.11.1 Células totales

Del volumen de pellet celular resuspendido, se tomó un volumen de 10µl de cada muestra y este volumen se marcó con el mismo volumen de azul tripano y se realizó un conteo de células totales en cámara de Bürker.

2.11.2 Células diferenciadas

En este caso, del volumen de pellet celular resuspendido bien homogeneizado se tomó una alícuota de 100µl. Esta alícuota se utilizó para fijar las células sobre un portaobjetos utilizando una citocentrífuga (Shandon Cytospin 4, Thermo Electron Corporation; Waltham, MA, EEUU) durante 5 minutos a 1200rpm. Se realizó tras esto una tinción panóptica rápida (Panreac; Glenview, IL, EEUU) de las células fijadas tal como indica el fabricante para cuantificar el porcentaje de cada tipo celular mediante microscopía óptica (Eclipse E200, Nikon; Tokio, Japón).

2.12 Expresión génica mediante qPCR

Se realizó expresión génica basal tanto de neutrófilos de sangre periférica como de tejido procedente de parénquima pulmonar humano o de ratón. Asimismo también se realizó análisis génico en cultivos celulares tratados, en este caso fueron neutrófilos de sangre periférica, BEAS-2B y CEBH, tanto sanas como EPOC.

Para los experimentos con cultivo celular, todos los tipos celulares fueron estimulados con EHT 3% durante 24h y se procedió a la extracción de ARN. Los fármacos se añadieron 1h antes de la estimulación con EHT. En el caso de las células epiteliales, BEAS-2B y CEBH, éstas fueron sembradas en placas de 6 pocillos (60000 células por pocillos) previamente colagenizadas (Corning Incorporated; Corning, NY, EEUU). En el caso de los neutrófilos, se utilizaron los neutrófilos empleados para la medida de liberación de interleucinas.

2.12.1 Extracción de ARN total y cuantificación

Para el aislamiento del ARN total, se utilizaron tres métodos diferentes según el tipo celular o tejido y el tipo de experimento realizado.

Tejido y neutrófilos sin tratar

Para las muestras de tejido de parénquima pulmonar humano, las muestras de pulmón animal y para los neutrófilos de sangre periférica no sembrados ni tratados, se empleó el reactivo Tripure® Isolation Reagent, que es una solución monofásica de fenol y tiocianato de guanidina (Trizol), que permite separar ARN, ADN y proteínas.

En primer lugar, las muestras se trituraron empleando el sistema TissueLyser II (Quiagen; Hilden, Alemania) (tejido) o empleando el vórtex (células) en presencia del reactivo de aislamiento Tripure® Isolation Reagent. En la suspensión con este reactivo se separaron las fases (una fase acuosa que contenía el ARN y otra orgánica que contenía el ADN) con cloroformo y se precipitó el ARN total de la muestra con isopropanol. A fin de facilitar dicha precipitación se le añadió a la fase acuosa 1 µl de glicógeno. Tras una centrifugación de 5 minutos a 7500 rpm, se resuspendió el ARN en 20 µl de agua DEPC (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, EEUU) en un termobloque seco a 60°C, 10 minutos.

Células epiteliales BEAS-2B y CEBH

Para las células epiteliales se empleó el método por extracción utilizando el MagMAX™-96 Total RNA Isolation Kit (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, EEUU), basado en el uso de bolas magnéticas. Tras la incubación pertinente con EHT y los fármacos, las células se lavaron y se levantaron utilizando el reactivo de lisis del fabricante. La solución con las células lisadas podía mantenerse a -80°C o proceder directamente al aislamiento del ARN. Para el aislamiento se siguió el protocolo marcado por el fabricante. Se utilizó para ello una placa de pocillos profundos donde se depositaban los diferentes reactivos de lavado, de elución y la solución con las células, las bolas magnéticas y la DNasa. Este método se basa en la separación del ARN por unión a las bolas que posteriormente son atraídas por imanes. Este ARN unido pasa por sucesivos pasos de lavado y, por último, es diluido en el reactivo correspondiente marcado por el fabricante.

Neutrófilos estimulados y tratados

En este caso los neutrófilos provenían de experimentos para la medición de interleucinas liberadas en el medio. Los neutrófilos y el medio fueron recogidos y traspasados a tubos de centrífuga para su centrifugación a 1200rpm durante 10min. Tras esta centrifuga, el sobrenadante se separaba del pellet para la posterior medición de interleucinas y el pellet se utilizaba para la extracción de ARN. Dado el pequeño tamaño de los neutrófilos se utilizó para el aislamiento del ARN un método por columnas (Total RNA Purification Kit, Norgen Biotek Corp.; Thorold, Canadá) que se basa en la separación del ARN cromatografía en columna.

Para llevar a cabo este protocolo, el pellet de neutrófilos fue resuspendido con el buffer de lisis correspondiente, indicado por el fabricante. Posteriormente esta dilución fue transferida a una columna con una matriz de separación de resina y se siguió el protocolo indicado por el fabricante. Este protocolo consistió en una serie de lavados, centrifugaciones y eluciones, para obtener finalmente el ARN diluido en el diluyente que marca el fabricante.

En todos los casos, una vez resuspendido el ARN, se determinó su concentración mediante el espectrofotómetro *NanoDrop 2000C* (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EEUU), siguiendo las instrucciones del fabricante. Este sistema permitió determinar la concentración del ARN total (ng/ μ L) mediante medidas de absorbancia a 260 nm (A_{260}) y 280 nm (A_{280}), a partir del espectro de absorción de las muestras. También se obtuvo el valor de la pureza de las muestras, determinado por la ratio A_{260}/A_{280} . El ARN fue guardado a -80°C hasta su uso.

2.12.2 Transcripción reversa

En la reacción de transcripción reversa o retrotranscripción (RT), la enzima transcriptasa inversa sintetiza ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc) a partir de un ARN mensajero molde (**Figura 28**). Este paso fue necesario para realizar la cuantificación de la expresión génica por PCR a tiempo real.

Tomando en consideración la cuantificación del ARN extraído, se transformó un total de 500 ng de ARN en ADNc utilizando el PrimeScript™ RT Reagent Kit (Perfect Real Time) (Takara; Kusatsu, Japón) para la transcripción inversa. Se realizó este proceso en un termociclador Veriti™ 96-Well Fast Thermal Cycler (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, EEUU). con los siguientes pasos: incubación durante 10 minutos a 25°C , ciclo de 30 minutos a 42°C e

inactivación de la enzima durante 5 minutos a 95°C. El ADNc sintetizado se almacenó a -80°C hasta su utilización.

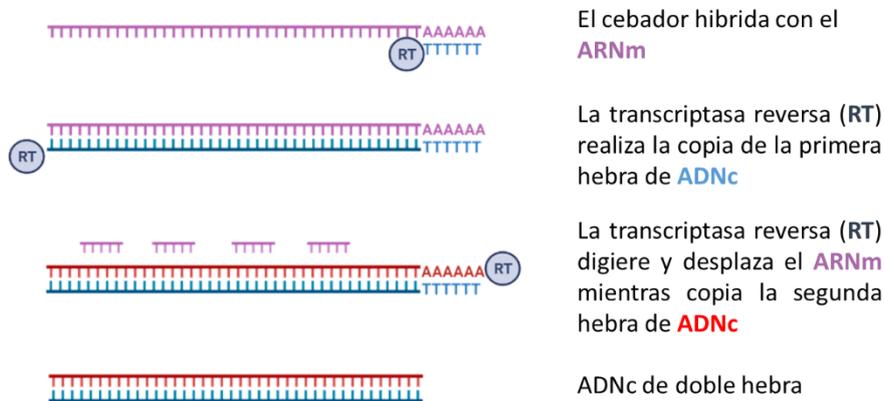


Figura 28. Diagrama de las etapas de la reacción de transcripción inversa. Creado con BioRender.

2.12.3 Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) consiste en la amplificación selectiva de una región de ADN de interés utilizando oligonucleótidos como cebadores de la síntesis de ADN. Los cebadores se unen específicamente a secuencias que flanquean la región que se pretende amplificar. La reacción de amplificación consiste en la repetición de un ciclo integrado por tres etapas a diferentes temperaturas. Cada repetición del ciclo produce un aumento exponencial en el número de copias de ADN de la región de interés.

La variante denominada PCR a tiempo real (RT-PCR) constituye una forma precisa de detectar y cuantificar los niveles de ARN mensajero (ARNm). Los equipos de RT-PCR permiten la detección directa del producto de amplificación durante la fase exponencial de la reacción empleando lectores de fluorescencia que permiten medir la fluorescencia emitida durante la reacción. Para ello se utilizaron ensayos de expresión génica TaqMan® (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, EEUU), que son mezclas pre-formuladas de sondas y cebadores específicos para el gen de interés marcadas con fluorocromos. Los reactivos TaqMan® utilizan una sonda fluorogénica y la actividad 5' nucleasa de la Taq Polimerasa de ADN para detectar un producto de PCR específico a medida que se acumula durante la reacción, tal y como se detalla en la siguiente figura (Figura 29):

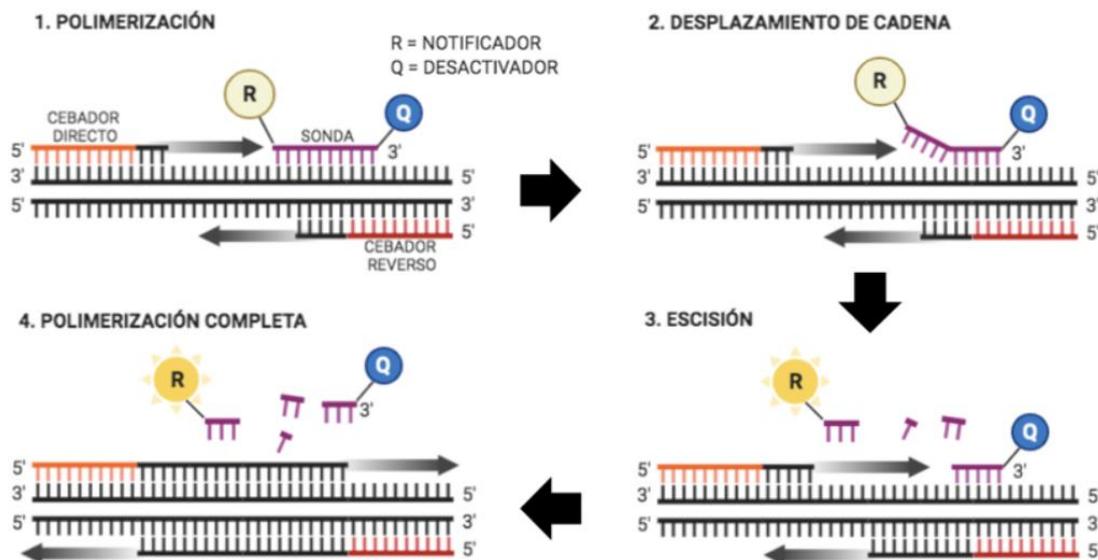


Figura 29. Sistema TaqMan® de cuantificación fluorimétrica de la expresión génica. 1. Etapa de polimerización donde la sonda específica del gen Taqman® con un notificador (R) y un desactivador (Q) unidos a los extremos 5' y 3' hibrida con el ADNc. 2. Desplazamiento de cadena donde empieza a copiarse el ADNc, cuando ambos marcadores están unidos a la sonda se inhibe la emisión del fluorocromo R por el desactivador Q. 3. En la etapa de escisión durante cada ciclo de polimerización la polimerasa degrada la sonda separando R de Q, comenzando la emisión de fluorescencia. 4. Se completa la polimerización, en la que el notificador y el desactivador están separados emitiendo por tanto la fluorescencia característica. Creado con BioRender.

La existencia de estas sondas fluorogénicas permite la detección en tiempo real únicamente de los productos de amplificación específicos. En las siguientes tablas (**Tabla 10 y 11**) se enumeran las sondas de expresión génica TaqMan® utilizadas para el estudio de la expresión de los genes de interés en este trabajo.

Tabla 10. Sondas de expresión Taqman humanas empleados en la RT-PCR.

Gen	Símbolo del gen	Referencia
GAPDH	GAPDH	4310384e
NRF2	NFE2L2	Hs00975961_g1
HO-1	HMOX1	Hs01110250_m1
NQO1	NQO1	Hs00168547_m1
KEAP1	KEAP1	Hs00202227_m1
MAF	MAF1	Hs01070921_g1
GPx1	GPX1	Hs00829989_gH

Abreviaturas: GAPDH: Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenas; GPx1: glutatión peroxidasa 1; HO-1: hemoxigenasa 1; KEAP1: Proteína 1 Asociada A ECH Tipo Kelch; MAF: proteína pequeña del fibrosarcoma musculoaponeurótico; NQO1: NADPH quinona oxidoreductasa 1; NRF2: factor nuclear eritroide 2.

Tabla 11. Sondas de expresión Taqman de ratón empleados en la RT-PCR.

Gen	Símbolo del gen	Referencia
GAPDH	GAPDH	4351309
NRF2	NFE2L2	Mm00477784_m1
HO-1	HMOX1	Mm00516004_m1
NQO1	NQO1	Mm01253561_m1
TNF-α	TNF	Mm00443258_m1
CLXC15 (IL-8)	CLXC15	Mm04208136_m1
IL-6	IL6	Mm00446190_m1
iNOS	NOS2	Mm00440502_m1

Abreviaturas: GAPDH: Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenas; HO-1: hemoxigenasa 1; IL-6: interleucina 6; IL-8: interleucina 8; iNOS: óxido nítrico sintasa inducible; NQO1: NADPH quinona oxidoreductasa 1; NRF2: factor nuclear eritroide 2; TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa

Cada reacción de PCR contenía los componentes indicados en la **Tabla 12**.

Tabla 12. Componentes de la PCR.

Componente	Volumen (μ l)
ADNc	2
TaqMan® Gene Expression Master Mix	2,5
Sonda TaqMan®	0,,25
Agua dietilpirocarbonato (DEPC)	0,25

El proceso de PCR-RT se desarrolló en un termociclador QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Waltham, MA, EEUU) con las siguientes condiciones: un paso inicial de 2 minutos a 0°C y 45 ciclos formados por las siguientes etapas: 10 minutos a 95°C (desnaturalización), 15 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C (Hibridación y extensión).

A partir de los datos de fluorescencia registrados se obtuvieron curvas de amplificación en las que se representaba el logaritmo de la intensidad de fluorescencia frente al número de ciclos transcurridos (**Figura 30**). Para medir la expresión de un determinado gen se utilizó el ciclo umbral (Ct), ciclo en el que la fluorescencia supera el umbral o threshold, en inglés. El threshold

es el nivel determinado automáticamente o manualmente y fijado en la región exponencial de la gráfica de amplificación; por encima de esta línea el nivel de fluorescencia se considera significativamente superior a la fluorescencia basal. Cuantas más copias haya de ARNm de partida del gen estudiado, más ADNc se obtendrá en la transcripción reversa y antes comenzará la amplificación a ser exponencial.

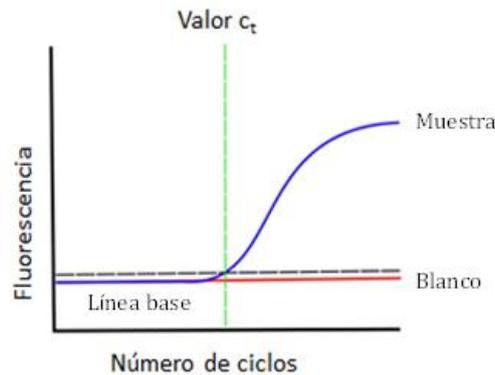


Figura 30. PCR a tiempo real. Gráfica obtenida tras el proceso de RT-PCR, en la que el gen diana ha sido amplificado. El instrumento de PCR determinará la posición del Threshold, que corta la curva de amplificación por el valor C_t , proporcionando un dato numérico de la expresión génica.

La cuantificación relativa de los distintos genes se realizó con el método de comparación de C_t , utilizando el gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH) como gen endógeno y al grupo control como calibrador. El valor medio de las réplicas para cada muestra (desviación estándar ≤ 1) se calculó y expresó como el umbral del ciclo (C_t). A continuación, se calculó el nivel de expresión génica como la diferencia (ΔC_t) entre el valor C_t del gen diana y el valor C_t del GAPDH. Los cambios en la expresión de los distintos genes de interés se representaron como $2^{-\Delta C_t}$.

2.13 Expresión proteica

2.13.1 Western blot

La técnica de Western Blotting permite detectar y cuantificar una proteína específica en una mezcla compleja de proteínas. En el presente trabajo se empleó para detectar cambios en la expresión proteica tanto en células como en tejido.

Para los experimentos in vitro, las CEBH y las BEAS-2B fueron estimuladas con EHT 3% durante 48h, los fármacos se añadieron 1h antes de la estimulación con EHT. El medio de cultivo, el estímulo y los fármacos se cambiaron cada 24h.

En células en cultivo, el aislamiento de la proteína total se realizó lisando y homogeneizando la muestra en hielo con el Buffer C (20mM 4-(2-hidroxietilo)-1-ácido piperazinetanosulfónico (HEPES), 1mM de EDTA, 1mM ácido etilenglicol tetraacético (EGTA), 20mM NaCl y 21,1% glicerol, obtenidos de Sigma-Aldrich; Sanint Louis, MI, EEUU y Panreac Applichem; Darmstadt, Alemania). Este buffer se complementó con un cóctel de Inhibidores de proteasas Pierce™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EEUU) y Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) (Roche Diagnostics; Basilea, Suiza) todo esto constituye el tampón de lisis.

En el caso de las muestras de tejido de ratón que habían sido congeladas previamente a -80°C en seco, se homogenizaron empleando el sistema Tissuelyser II en presencia de 500 µl de un tampón de lisis, descrito en el párrafo anterior.

Las muestras, tanto celulares como de tejido, se centrifugaron y se descartó el sedimento, mientras que el sobrenadante se sometió a tres ciclos de choque térmico por congelación-descongelación con nitrógeno líquido y con agitación a 37°C, respectivamente. A continuación, se le adicionó el detergente nonidet p40 (Sigma-Aldrich; Saint Louis, MO, EEUU) al 1% y durante 15 minutos se mantuvo en hielo con agitación energética cada 5 minutos. Finalmente, se centrifugó a 10000 rpm durante 20 min a 4°C y se recogió el sobrenadante para determinar la concentración de proteína total mediante el kit del método de ácido bicinónico (BCA). El ensayo BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EEUU) fue utilizado, siguiendo las instrucciones del fabricante, para cuantificar el nivel de proteína y así garantizar una cantidad equivalente de proteína cargada para cada muestra. Este kit se basa en la reacción de Buriel, donde las proteínas reducen el Cu²⁺ a Cu¹⁺ en medio alcalino. El BCA forma un complejo púrpura intenso en presencia de iones Cu¹⁺ proporcional a la concentración de proteínas en la muestra.

Para detectar la presencia del epítipo deseado se separaron las proteínas de acuerdo a su peso molecular mediante electroforesis en gel de acrilamida con SDS. Para ello primero se desnaturalizaron las proteínas en presencia de β-mercaptoethanol (Sigma-Aldrich; Saint Louis, MO, EEUU) (1:1 en volumen) a 95°C, 10 minutos. 15 o 20 µg de la proteína desnaturalizada y el marcador de peso molecular Spectra™ Multicolor (Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, EEUU) se cargaron en los pocillos de un gel de poli(acrilamida) 4-20%. Se aplicó al gel una corriente

eléctrica de 100V durante 1 hora, provocando que las proteínas migrasen a través de él (**Figura 31**). Posteriormente, las proteínas se transfirieron del gel a una membrana de difluoruro de polivinilideno de 0,2 μm utilizando el sistema Trans-Blot® Turbo™ Transfer System (Bio-Rad; Hercules, CA, EEUU). La membrana con las proteínas fue bloqueada con BSA al 5% en PBS durante 2 horas e incubada con el anticuerpo primario (**Tabla 13**) durante toda la noche a 4°C. Tras la incubación, se lavó la membrana y se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente (**Tabla 13**), conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) durante 1 hora. Las proteínas marcadas se detectaron realizando autoradiografías (**Figura 31**) en cámara oscura con película fotográfica Amersham™ Hyperfilm™ MP (Cytiva; Washington DC, EEUU), que recoge la emisión de quimioluminiscencia inducida por el kit Amersham™ ECL™ Prime (Cytiva; Washington DC, EEUU). La densitometría de las películas se midió mediante Image J 1.42q software (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>, EEUU). Los resultados se expresaron como ratios respecto a controles endógenos de β -Actina.

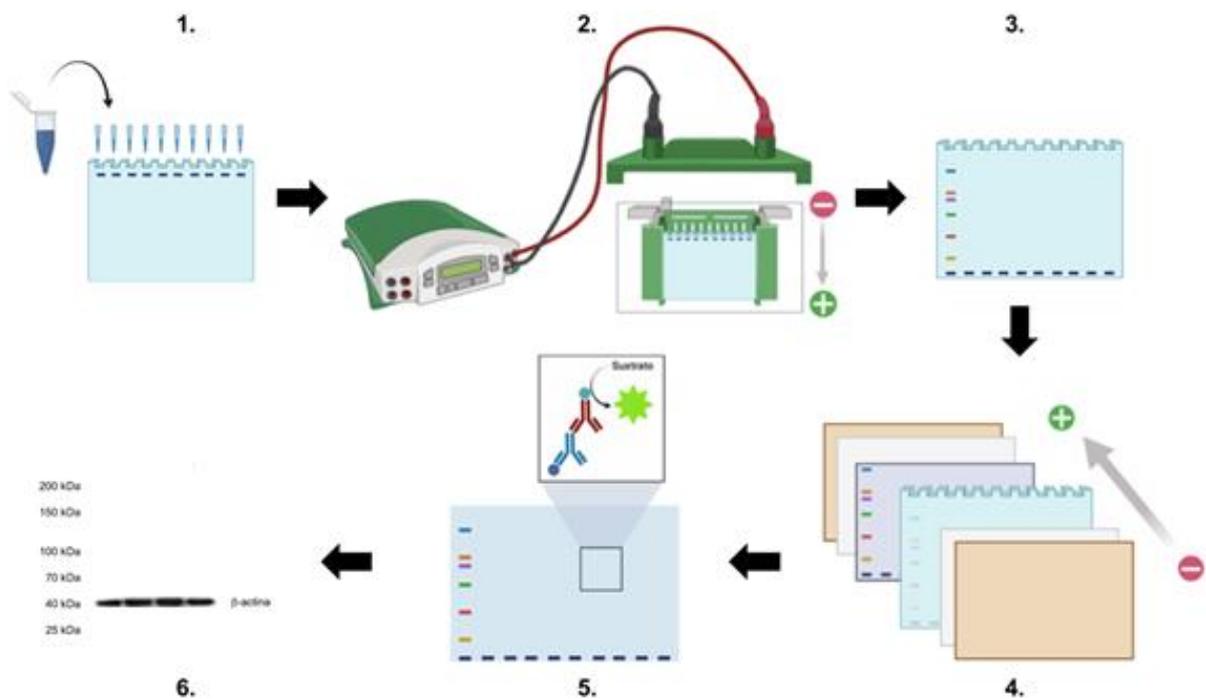


Figura 31. Esquema de la técnica Western Blot. 1. Carga de las muestras y del marcador de peso molecular. 2. Separación de las proteínas en gel de acrilamida-SDS. 3. Tras la electroforesis las muestras quedan separadas a lo largo del gel, incluido el marcador. 4. Transferencia de las proteínas desde el gel hacia una membrana de nitrocelulosa. 5. Incubación de la membrana con anticuerpo primario, anticuerpo secundario y reacción de quimioluminiscencia. 6. Revelado de la quimioluminiscencia para visualizar la banda donde se encuentra la proteína de interés. Creado con Biorender

Tabla 13. Anticuerpos primarios y secundarios empleados en Western Blot.

Epítipo	Referencia	Dilución	Buffer	Especie de origen
HO-1	Cell Signaling (43966S)	1:1000	BSA5%/TBST	Conejo
NOQ1	Invitrogen (MA1-16672)	1:1000	BSA5%/TBST	Ratón
β-actin	Sigma-Aldrich (A1978)	1:7000	BSA5%/TBST	Ratón
HRP - IgG (H+L) Conejo	Thermo Fisher Scientific (SA1-100)	1:1000	BSA5%/TBST	Asno
HRP - IgG (H+L) Ratón	Thermo Fisher Scientific (SA1-200)	1:5000/ 1:15000	BSA5%/TBST	Asno

Abreviaturas: BSA: albumina de suero bovino; HO-1: hemoxigenasa 1; Ig: inmunoglobulina; NOQ1: NADPH quinona oxidorreductasa 1; TBST: Solución salina tamponada con Tween20

2.13.2 Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)

La técnica ELISA (del inglés Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay: “Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas”) se empleó para cuantificar la expresión de citoquinas y proteasas liberadas en LBA de los ratones de ambos modelos animales y en el sobrenadante de neutrófilos de sangre periférica tratados y estimulados.

Para los experimentos in vitro de liberación de citoquinas y proteasas, los neutrófilos fueron tratados con fármacos y 1h después estimulados con EHT 3%, se incubaron durante 24h y tras esto se procedió a recoger el sobrenadante.

Las concentraciones se determinaron según ficha técnica de los kits ELISA comerciales: IL-8, Human IL-8/CXCL8 duoset (RD systems; Minneapolis, MN, EEUU); MMP-9, Human MMP-9 (RD systems; Minneapolis, MN, EEUU); TNF- α de ratón, Mouse TNF- α (RD systems; Minneapolis, MN, EEUU); IL-8 de ratón, Mouse IL-8/CXCL15 (EM1592) (Fine test; Wuhan, China); IL-6 de ratón, Mouse IL-6 (DY406) (RD systems; Minneapolis, MN, EEUU); IL-1 β de ratón, Mouse IL-1 β /IL1F2 (DY401-05) (RD systems; Minneapolis, MN, EEUU).

Los kits empleados utilizan la técnica de ELISA cuantitativa por inmuno-detección indirecta de proteínas o sistema “sandwich” en fase sólida. En este sistema los pocillos de la placa tienen adheridos a su base anticuerpos específicos contra nuestra proteína de interés (**Figura 32, 1**).

Para ello las placas se revistieron previamente como indica el fabricante y se dejaron incubar 24h. Transcurrido este tiempo, la placa se lavó y se bloqueó para evitar las uniones inespecíficas durante 1h. A continuación, se lavó y se añadió a los pocillos 100µl de las muestras, del estándar (en concentraciones seriadas para la recta patrón) diluidas en el diluyente marcado por el fabricante y del blanco (diluyente solo), todas por duplicado. Se incubó la placa durante 2h para favorecer la unión entre nuestra proteína de interés y el anticuerpo inmovilizado (**Figura 32, 2**). Tras esto, se realizaron lavados para eliminar las uniones inespecíficas (**Figura 32, 3**) y se añadieron 100µl de anticuerpo específico conjugado a biotina (**Figura 32, 4**) incubándose durante otras 2h. Se realizaron lavados y se añadió 100µl del conjugado de estreptavidina-peroxidasa, que se unió a la biotina aprovechando la alta afinidad biológica entre la biotina y la estreptavidina (**Figura 32, 5.**), se incubó durante 20min más. Por último, tras los lavados, se añadieron 100µl de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) como sustrato y se incubó 20min en oscuridad (**Figura 32, 6**). Se produce una reacción al entrar en contacto el sustrato con la peroxidasa, se modifica el sustrato produciendo un producto coloreado, ofreciendo una absorbancia proporcional a la concentración de la proteína de estudio. Finalmente, se detuvo la reacción añadiendo 50µl de ácido sulfúrico 1M y se midió la absorbancia mediante espectrofotometría a 450nm con el equipo Infinite M200 (Tecan Group Ltd.; Mannedorf, Switzerland) . Los datos de concentración de la proteína se extrapolaron de la recta patrón estándar previa, realizada según las instrucciones del fabricante.

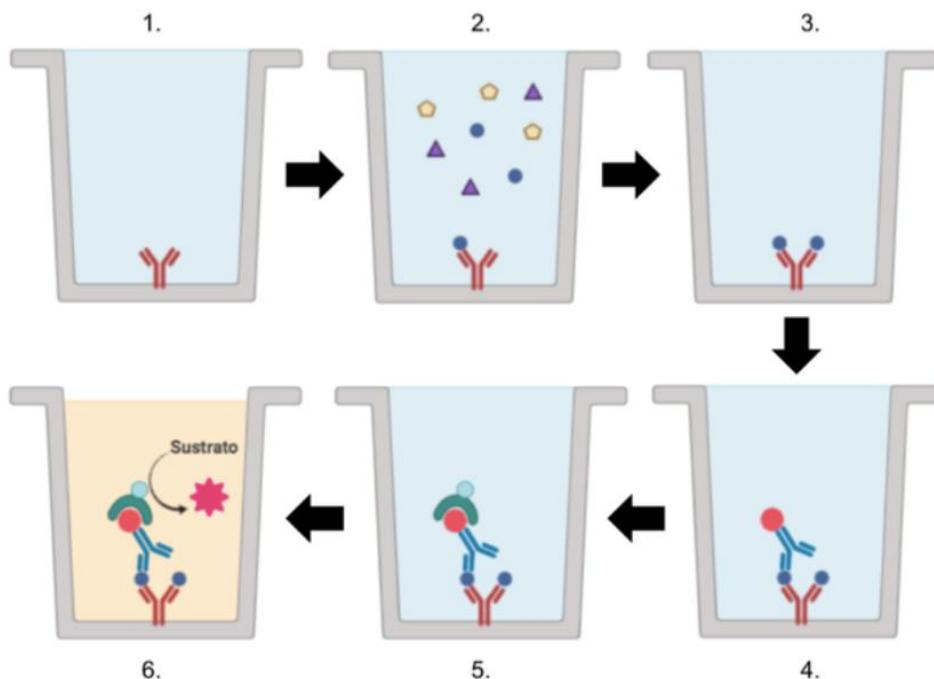


Figura 32. Esquema de la técnica ELISA de cuantificación de proteínas por inmuno-detección indirecta, en el que se describen las diferentes fases del proceso. Creado con BioRender

2.14 Histología

2.14.1 Fijación y deshidratación de tejidos

Los tejidos humanos o de ratón empleados fueron fijados con formaldehído 3,7-4,0% (pH=7) durante 24h para realizar ensayos histológicos. Seguidamente los tejidos se incluyeron en cassettes de inclusión, se rotularon con lápiz y se deshidrataron mediante los siguientes tratamientos (Tabla 14):

Tabla 14. Protocolo de deshidratación de tejidos.

Tratamiento	Tiempo	Repeticiones
Etanol 70%	60 minutos	x1
Etanol 96%	180 minutos	X1
Etanol 96%	90 minutos	X1
Etanol 100%	Toda la noche	X1
Xileno	60 minutos	x2
Parafina	Toda la noche	x1

A continuación, se procedió a la inclusión en bloques de parafina con un inclusor EC350-1 Myr (Leica Geosystems; Heerbrugg, Suiza). A partir de los bloques obtenidos, se cortaron secciones (4-6 μm de espesor) con un micrótopo HM 340 E (Leica Geosystems; Heerbrugg, Suiza) y se adherieron a portaobjetos, dejándose en secado a temperatura ambiente durante 48 horas.

2.14.2 Tinción hematoxilina eosina

Para el análisis histológico del tejido pulmonar humano y de ratón y de rata las secciones de tejido se desparafinaron e hidrataron (Tabla 15).

Tabla 15. Protocolo de desparafinado e hidratación.

Tratamiento	Tiempo	Nº de repeticiones
Estufa 60	15 min	X1
Xileno	10 min	X2
Etanol 100%	10 min	X2
Etanol 95%	10 min	X1
Etanol 70%	5 min	X1
Etanol 50%	5 min	X1
Agua	5 min	X1

Una vez rehidratadas las secciones se tiñeron durante 3min en una solución pura de hematoxilina Gill (Sigma-Aldrich; Saint Louis, MO, EEUU), a continuación los cortes se lavaron abundantemente con agua. Tras esto se sumergieron las secciones en agua corriente con 10-12 gotas de ácido clorhídrico (Panreac Applichem; Darmstadt, Alemania) hasta virar el color a un morado/rojizo. Posteriormente se sumergieron en solución de saturada de carbonato de litio (Sigma-Aldrich; Saint Louis, MO, EEUU) hasta que vire a color azul. Por último, las secciones se tiñeron con eosina (Panreac Applichem; Darmstadt, Alemania) durante 2min. Tras esto las cortes se aclararon con agua.

Tras la tinción se deshidrataron las secciones mediante una sucesión de alcoholes crecientes y xileno (**Tabla 16**) y se montaron los portaobjetos con el medio de montaje DPX (Dibutylphthalate Polystyrene Xylene) (Panreac Applichem; Darmstadt, Alemania) y con cubreobjetos. Se tomaron fotografías de las preparaciones obtenidas con un microscopio de luz visible Nikon Eclipse TE200 (Tokio, Japón).

Los cambios en el tejido pulmonar se examinaron morfológicamente como se ha descrito en trabajos previos^{461,462}. El grado de lesión microscópica se calificó en una escala de 0 a 4 (0, ausente y parece normal; 1, ligero; 2, moderado; 3, fuerte; 4, intenso). La media puntuación total de la lesión pulmonar se calculó a partir de tres secciones de cada pulmón.

Tabla 16. Protocolo de deshidratación.

Tratamiento	Tiempo	Número de repeticiones
Etanol 90%	5 min	X2
Etanol 100%	5 min	X2
Xileno	10 min	X2

2.14.3 Inmunohistoquímica

Para el análisis inmunohistoquímico del tejido pulmonar humano se siguió el mismo protocolo de desparafinado e hidratación explicado anteriormente (Tabla 15).

Una vez hidratados los cortes, los portaobjetos se sumergieron en una cubeta con una solución de citrato 10mM en un baño maría hirviendo durante 15 minutos para el desenmascaramiento antigénico. Se atemperaron las muestras y se sumergieron en una cubeta con agua mili-Q durante 5 minutos. Para el bloqueo de la peroxidasa endógena el tejido se incubó en una solución al 3% de metanol en agua destilada durante 20 minutos y se lavó con solución salina tamponada con Tween20 (TBST). La membrana celular se permeabilizó con Tritón 100 al 0,1% en PBS a temperatura ambiente durante 10 min y los sitios de unión no específicos del tejido se bloquearon con BSA 5% en PBS durante una hora a temperatura ambiente dentro de una cámara húmeda. Posteriormente, las secciones de tejido se incubaron con el anticuerpo primario a testar (Tabla 17) durante 24h a 4°C. Después de realizar tres lavados con TBST se incubó con el Master Polymer Plus HRP (del kit Master Polymer Plus Detection System, Master diagnóstica; Granda, España) durante 30 minutos. Tras el periodo de incubación, se realizaron 3 lavados con PBS. Para el revelado de la inmunotinción se usó DAB Chromogen concentrate diluido en DAB substrate Buffer. Para parar la reacción se sumergieron los portaobjetos en una cubeta con agua mili-Q y se tiñeron con Hematoxilina durante 1 minuto para diferenciar los componentes celulares. Tras 3 lavados se prosiguió con el protocolo de deshidratación (Tabla 16). Finalmente, se procedió al montaje añadiendo DPX sobre la muestra y el cubreobjetos.

Los cortes seleccionados fueron observados mediante un microscopio de luz Nikon Eclipse TE200 (Tokio, Japón).

Tabla 17. Anticuerpo primario empleado en el ensayo inmunohistoquímico.

Epítipo	Referencia	Dilución	Buffer
NRF2	Abcam (ab89443)	1:1000	BSA 0,1%/TBST

2.15 Presentación de datos y análisis estadístico

Los datos se presentaron como media \pm Error estándar de la media (SEM) de al menos dos experimentos independientes ($p=2$), con cada condición por triplicado ($n=3$). El análisis estadístico de los resultados se resolvió mediante análisis paramétricos o no paramétricos según el caso. El análisis de la distribución normal para cada grupo de datos se realizó mediante el test de Kolmogorov-Smirnov. Las comparaciones entre dos grupos se llevaron a cabo mediante la prueba bilateral t de Student para muestras independientes o la prueba no paramétrica Mann-Whitney. Para comparaciones entre más de dos grupos se llevó a cabo mediante el análisis de varianza (ANOVA) de una vía independiente seguido de la prueba post hoc de Bonferroni. Los resultados se tomaron como significativos (*) cuando el valor $p < 0,05$. Se utilizó para los estudios estadísticos el software GraphPad Prism 8 (GraphPad Software Inc, San Diego, CA, EE

RESULTADOS

I. Expresión del sistema NRF2 en pacientes EPOC

I.1. Neutrófilos periféricos

En primer lugar se determinó el número de neutrófilos procedentes de sujetos sanos y pacientes EPOC de los distintos GOLD. El número de neutrófilos fue significativamente mayor en pacientes EPOC que en controles sanos y este número incrementaba con el estadio de la enfermedad, a mayor gravedad el número de neutrófilos era mayor. La media del número de neutrófilos en sujetos sanos (n=20) fue de 16,12 millones, la de pacientes EPOC GOLD 2 (n=12) de 27,62 millones, la de los pacientes GOLD 3 (n=20) de 35,57 millones y finalmente la de los pacientes GOLD 4 (n=15) de 37,21 millones (**Figura 33**). Pacientes EPOC con GOLD 0 y 1 también seguían esta tendencia, pero no pudieron ser incluidos en el estudio debido al bajo número de sujetos de estas características con los que contábamos.

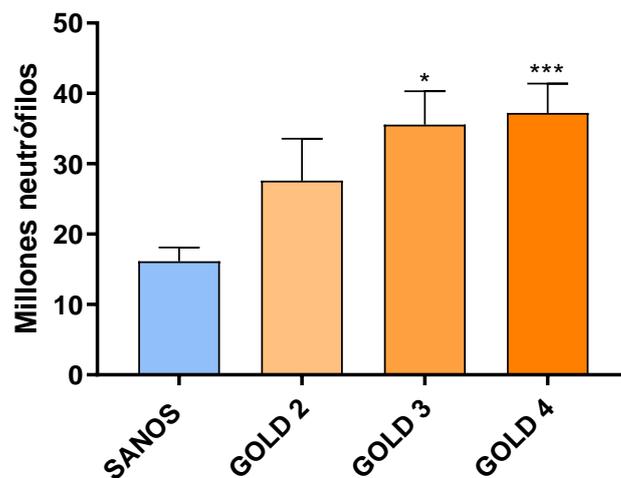


Figura 33. Recuento de neutrófilos en sangre de sujetos sanos y pacientes EPOC de distintos GOLD. El número de neutrófilos periféricos es significativamente mayor en los pacientes EPOC que en los sujetos sanos y su número aumenta con la gravedad de la enfermedad. Los resultados se expresan como la media \pm SEM. Las comparaciones fueron analizadas mediante test ANOVA de una vía seguido de un test post hoc de Bonferroni (* $p < 0,005$).

I.2. Expresión de los genes implicados en la ruta NRF2

La expresión la ruta *NRF2* y de los principales genes antioxidantes fue determinada en neutrófilos de sangre periférica y en parénquima pulmonar homogeneizado tanto en los sujetos control como en pacientes EPOC.

En los neutrófilos de sangre periférica, la expresión génica de los genes implicados en la ruta NRF2, *NRF2*, *MAF1* y *KEAP1* fue menor en pacientes EPOC (n=54) que en los controles sanos (n=73), aunque las diferencias solo fueron estadísticamente significativas en el caso de *NRF2*. De la misma forma la expresión de los genes activados por NRF2 que codifican para las enzimas antioxidantes NQO1, HO-1 y GPX1 fue menor en pacientes EPOC que en los sujetos sanos, en este caso tanto para el gen *HO-1* y el gen *GPX1* las diferencias fueron significativas (**Figura 34**).

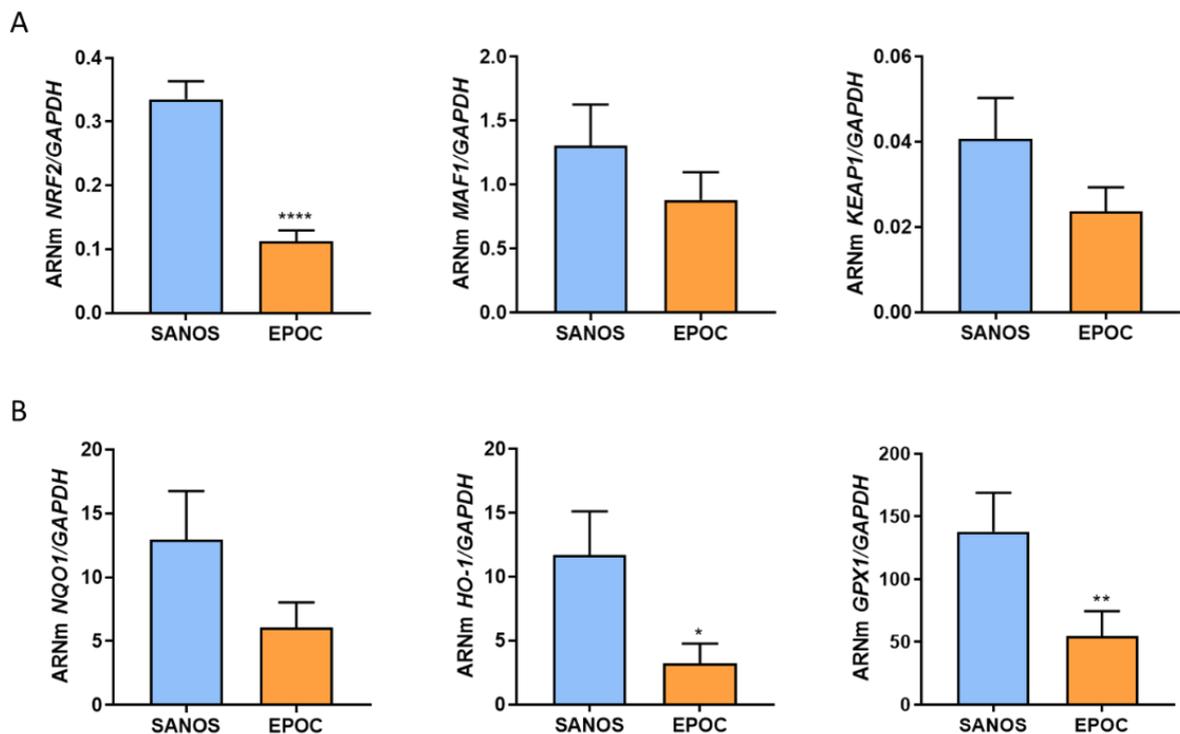


Figura 34. Expresión de genes de la ruta Nrf2 y antioxidantes en neutrófilos de sangre periférica de sujetos sanos y pacientes EPOC. La expresión de los genes implicados en la ruta NRF2 (*NRF2*, *MAF1* y *KEAP1*) (**A**) y de los genes antioxidantes *NQO1*, *HO-1* y *GPX1* (**B**) está disminuida en los pacientes EPOC con respecto a los sanos. Los resultados se expresan como la media ± SEM. Las comparaciones fueron analizadas mediante test de Student (* p<0,005).

Asimismo, la expresión de estos genes en neutrófilos de sangre periférica disminuía conforme aumentaba la gravedad de la enfermedad, pacientes de un GOLD mayor presentaban niveles menores de expresión génica (**Figura 35**).

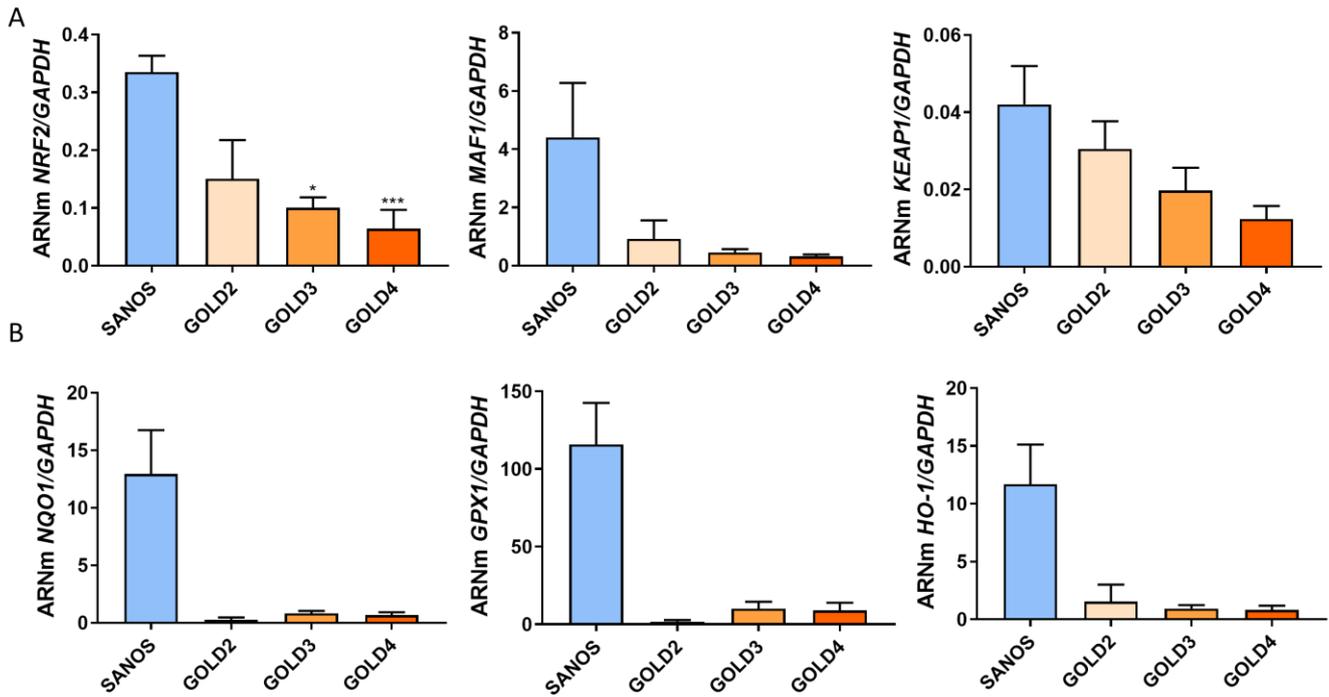


Figura 35. Expresión de genes de la ruta NRF2 y antioxidantes en neutrófilos de sangre de voluntarios sanos y pacientes EPOC según GOLD. La expresión de los genes implicados en la ruta Nrf2 y genes antioxidantes disminuye conforme aumenta la gravedad de la enfermedad. Sanos, n=73; GOLD 2, n=12; GOLD 3, n=22; GOLD 4, n=20. Los resultados se expresan como la media \pm SEM. Las comparaciones fueron analizadas mediante test ANOVA de una vía seguido de un test post hoc de Bonferroni (* $p < 0,005$).

En parénquima pulmonar, tanto la expresión de los genes implicados en la ruta NRF2 como los genes que codifican para las enzimas antioxidantes antes mencionadas, fue menor en pacientes EPOC (n=15) en comparación a sujetos control (n=25) (**Figura 36**).

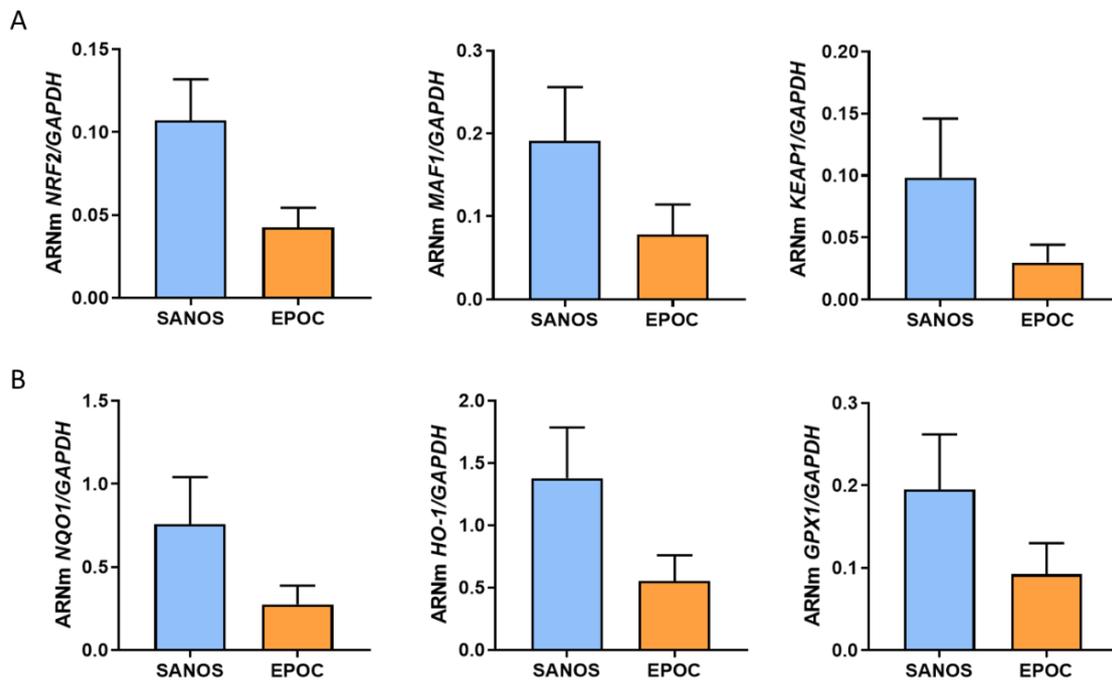


Figura 36. Expresión de genes de la ruta NRF2 y antioxidantes en parénquima pulmonar procedente de sujetos sanos y pacientes EPOC. La expresión de los genes implicados en la ruta NRF2 (NRF2, MAF1 y KEAP1) (A) y de los genes antioxidantes NQO1, HO-1 y GPX1 (B) está disminuida en los pacientes EPOC con respecto a los sanos. Los resultados se expresan como la media \pm SEM. Las comparaciones fueron analizadas mediante test de Student (* $p < 0,005$).

Se estudió, además, la expresión proteica de NRF2 mediante estudios inmunohistoquímicos, las secciones pulmonares de pacientes EPOC mostraron una débil expresión de NRF2, tanto en el parénquima pulmonar como en los bronquiolos. En contraste, en los sujetos sanos se observó una elevada expresión de esta proteína. Asimismo, se pudo observar en las secciones de pacientes EPOC el ensanchamiento de la pared bronquiolar y, en consecuencia, la disminución del espacio bronquiolar, característica de la bronquiolitis crónica que padecen los pacientes con EPOC. De igual forma se pudo observar una mayor destrucción del parénquima pulmonar en las secciones de los pacientes EPOC, signo del enfisema pulmonar característico de los pacientes con EPOC (Figura 37).

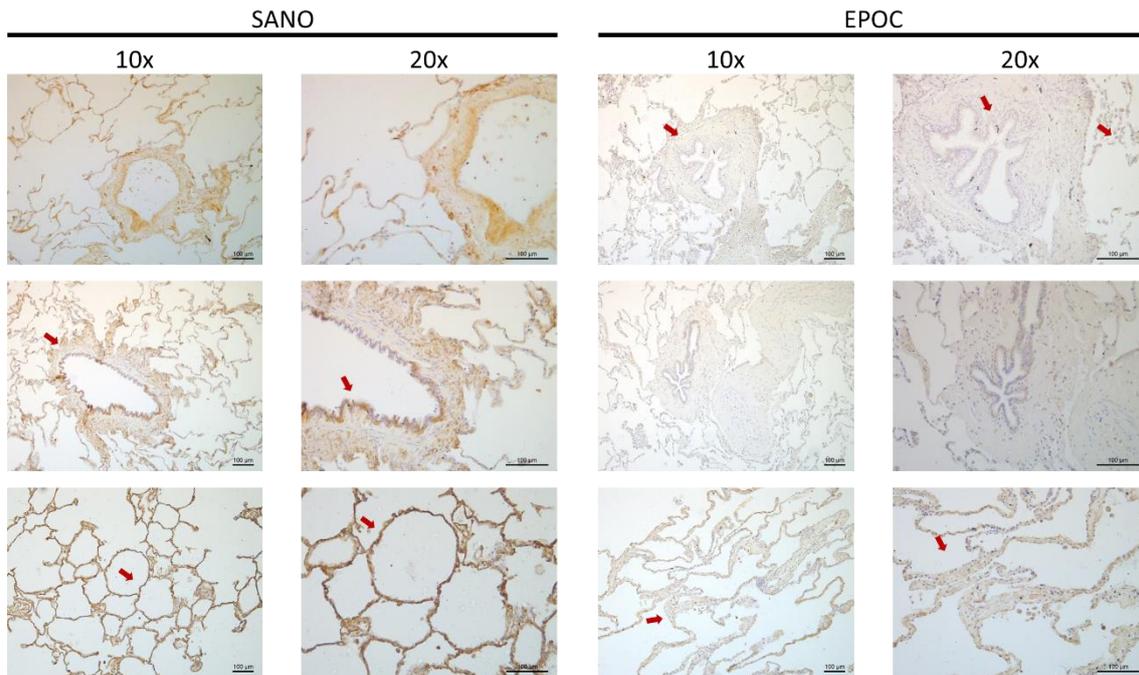


Figura 37. La expresión de NRF2 en parénquima pulmonar y en los bronquiolos se encuentra disminuida en pacientes con EPOC en comparación a sujetos sanos. Las inmunohistoquímicas se realizaron con cortes histológicos de tejido pulmonar obtenidos de sujetos sanos o de pacientes con EPOC. Fueron marcos para NRF2 (tinción marrón) y definidos con hematoxilina. Se muestran fotografías visualizadas con objetivos 10x y 20x. La barra representa 100µm en todos los casos.

2. Determinación de glutatión

2.1 Neutrófilos periféricos

Para determinar la respuesta antioxidante basal de pacientes EPOC y sujetos sanos se realizó la medida de GSH, molécula antioxidante por excelencia, de forma basal y tras estimulación con tabaco en neutrófilos y células epiteliales primarias.

Se observó que los niveles de GSH basales en neutrófilos de sangre periférica son significativamente menores en pacientes EPOC que en sujetos sanos. Además, tras estimulación con tabaco al 3% los niveles de GSH totales disminuían en la misma proporción tanto en sujetos sanos como en pacientes EPOC (**Figura 38**).

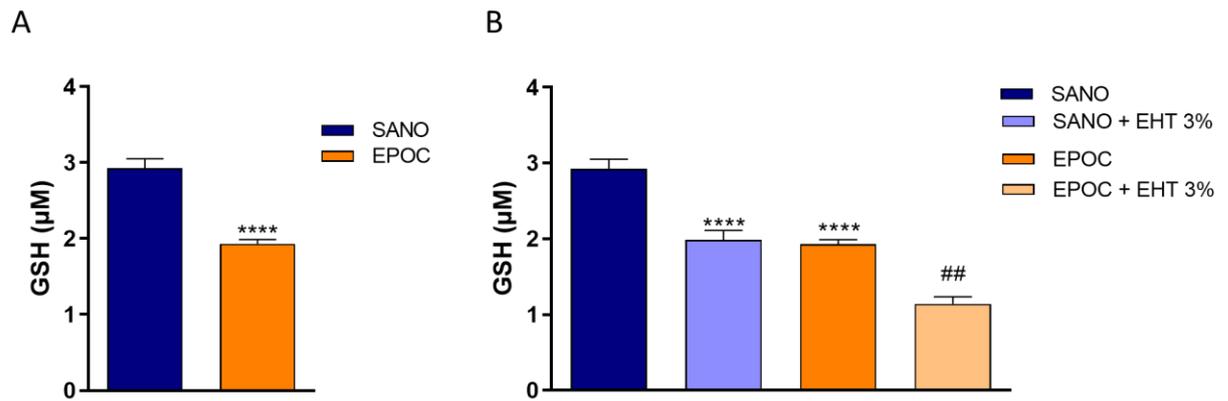


Figura 38. Niveles de GSH basales y tras estimularse con EHT 3% en neutrófilos de sangre periférica de sujetos sanos y pacientes EPOC. A) Los niveles de GSH basales son menores en pacientes EPOC (n=8) que en sanos (n=8). **B)** La estimulación con EHT 3% disminuye los niveles de GSH y lo hace en la misma proporción tanto en sanos como en pacientes EPOC. Los resultados se expresan como la media \pm SEM. Las comparaciones fueron analizadas mediante test de Student o ANOVA de una vía seguido de un test post hoc de Bonferroni (*, # p<0,005. *respecto al grupo SANO; # respecto al grupo EPOC) *Abreviaturas:* EHT: extracto de humo de tabaco; GSH: glutatión.

2.2 Células epiteliales primarias

Asimismo, se encontraron resultados similares cuando se realizó el ensayo con células epiteliales primarias tanto de sujetos sanos como de pacientes EPOC. De nuevo, los niveles basales de GSH eran menores en los pacientes EPOC en comparación con los sujetos sanos y los niveles disminuían tras la estimulación de tabaco, en la misma proporción tanto en sujetos sanos como en pacientes EPOC (**Figura 39**).

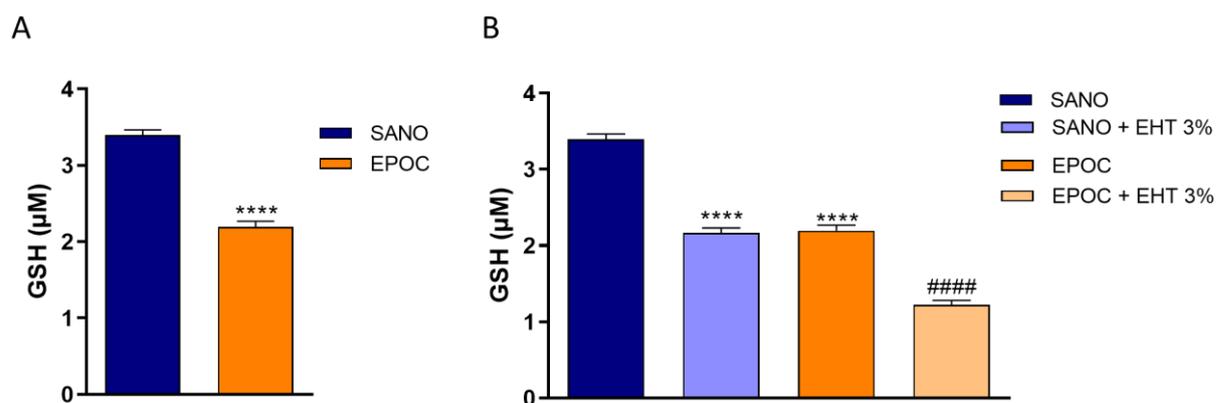


Figura 39. Niveles de GSH basales y tras estimularse con EHT 3% en células epiteliales bronquiales primarias de sanos y pacientes EPOC.. A) Los niveles de GSH basales son menores en pacientes EPOC (n=8) que en sujetos sanos (n=8). **B)** La estimulación con EHT 3% disminuye los niveles de GSH y lo hace en la misma proporción tanto en sujetos sanos como en pacientes EPOC. Los resultados se expresan como la media \pm SEM. Las comparaciones fueron analizadas mediante test de Student o ANOVA de una vía

seguido de un test post hoc de Bonferroni (*, # $p < 0,005$. *respecto al grupo SANO; # respecto al grupo EPOC) *Abreviaturas: EHT: extracto de humo de tabaco; GSH: glutatión.*

2.3 Fármacos activadores de NRF2 en células epiteliales bronquiales de línea

Para la elección de los fármacos activadores de NRF2 idóneos, se realizó una medición de los niveles de GSH tras la estimulación con tabaco y tras el tratamiento con los diferentes fármacos seleccionados en células epiteliales bronquiales de línea, BEAS-2B, además se determinó la concentración efectiva 50 (CE50) para cada uno de los casos. Se trabajó con diferentes fármacos seleccionados según su origen o su método de activación, se ensayaron fármacos electrofílicos, no electrofílicos, naturales, peptídicos e inhibidores de la PDE4.

Por lo que respecta a los electrofílicos y no electrofílicos, se testaron la CDDO-Me y la omaveloxolona como electrofílicos y el astemizol como no electrofílico. Se observó en todos los casos como los niveles de GSH disminuían significativamente tras la estimulación con EHT al 3%. En las células tratadas previamente con CDDO-Me, el fármaco prevenía la disminución provocada por el EHT de los niveles de GSH, aumentado linealmente con la concentración, llegando a ser los niveles de GSH mayores que para las células control. Se determinó una CE50 de 13,7nM y un efecto máximo de más del 200%, tomando los niveles de la condición control como el 100% (**Figura 40, A y Tabla 18**). En el caso de las células tratadas con omaveloxolona se obtuvieron resultados similares a los de la CDDO-Me, con un aumento de los niveles de GSH con la concentración de fármaco, una CE50 de 25nM y un efecto máximo de más del 150% (**Figura 40, B y Tabla 18**). Por el contrario, en el caso de las células tratadas con astemizol, no se encontró que el fármaco a ninguna de las concentraciones probadas fuera capaz de prevenir significativamente la disminución de los niveles de GSH tras la estimulación, aunque la CE50 fue de 70nM el efecto máximo fue de aproximadamente el 40%, no llegando a los niveles obtenidos en la condición control (**Figura 40, C y Tabla 18**).

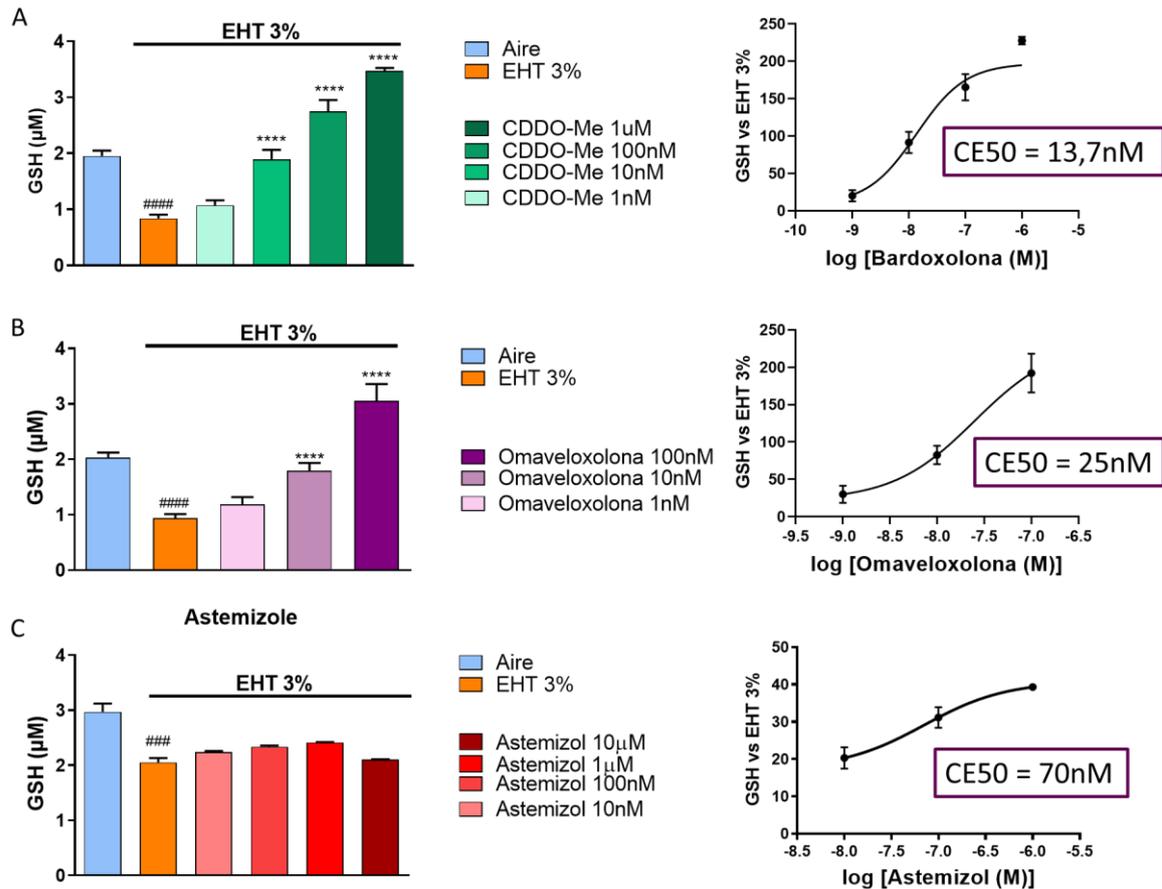


Figura 40. Niveles de GSH tras el tratamiento con los fármacos electrofílicos CDDO-Me y omaveloxolona y no electrofílico astemizol y la posterior estimulación con EHT 3% en células epiteliales bronquiales de línea. Las células BEAS2B se trataron con CDDO-Me (A), omaveloxolona (B) o astemizole (C) a concentraciones de 1n a 1 μM , 1nM a 100nM, o de 10nM a 10 μM , respectivamente, durante 24h y se estimularon posteriormente con EHT 3% durante 1h. Se calculó la CE50. Los fármacos CDDO-Me y omaveoloxolona son capaces de prevenir la disminución de GSH generada por la estimulación con EHT. Los resultados de la izquierda se expresan como la media \pm SEM y los resultados de la derecha representan la regresión no-lineal para el cálculo de la CE50 todos ellos de al menos dos experimentos independientes ($p=2$), con cada condición por triplicado ($n=3$). Las comparaciones fueron analizadas la prueba ANOVA de una vía seguido de un test post hoc de Bonferroni (*, # $p<0,005$. # respecto al grupo Aire; # respecto al grupo EHT 3%) Abreviaturas: CE50: concentración efectiva 50; CDDO-Me: bardoxolona metyl; EHT: extracto de humo de tabaco; GSH: glutatión.

De fármacos peptídicos se testaron el compuesto TAT-14, un péptido diseñado en nuestro laboratorio LK1-14 y el péptido LAS200813:8 cedido por la empresa Almirall. Se confirmó como que los niveles de GSH disminuían tras la estimulación con EHT. En el caso de las células tratadas con TAT-14, se encontró que el fármaco no conseguía prevenir de forma significativa la disminución de los niveles de GSH generada por la estimulación con EHT, con una CE50 de 4,66mM y un efecto del 60%, asumiendo los niveles alcanzados por la condición control como el 100 (Figura 41, A y Tabla 18). Por otro lado, en el caso del péptido LK1-14 se observó que el

tratamiento con el fármaco no producía un efecto considerable (**Figura 41, B y Tabla 18**). Por último, en las células tratada con el péptido LAS2008:13 cedido por Almirall, se encontró que el fármaco prevenía de forma significativa la disminución de GSH generada por el EHT y que los niveles de GSH aumentaban con la concentración de fármaco alcanzado los niveles de las células control (100%), además la CE50 calculada fue de 9,3nM (**Figura 41, C y Tabla 18**).

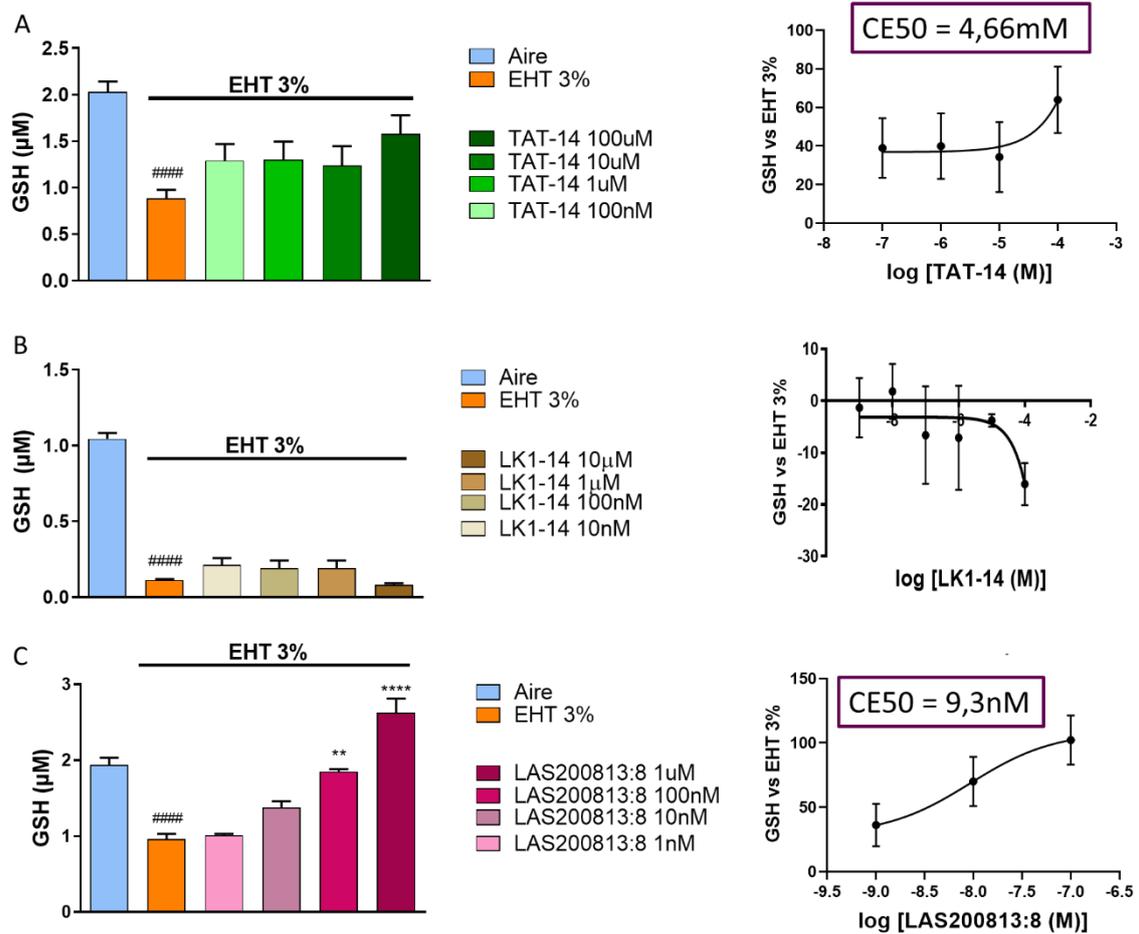


Figura 41. Niveles de GSH tras el tratamiento con los compuestos peptídicos TAT-14, LK1-14 o LAS200813:8 y la posterior estimulación con EHT 3% en células epiteliales bronquiales de línea. Las células BEAS2B se trataron con el péptido comercial TAT-14 (A), el péptido diseñado LK1-14 (B) o el péptido cedido por Almirall LAS (C) a concentraciones de 100n a 100µM, , 10nM a 10µM, o de 1nM a 1µM, respectivamente, durante 24h y se estimularon posteriormente con EHT 3% durante 1h. Se calculó la CE50. El péptido LAS200813:8 es capaz de prevenir la disminución de GSH generada por la estimulación con EHT. Los resultados de la izquierda se expresan como la media ± SEM y los resultados de la derecha representan la regresión no-lineal para el cálculo de la CE50 todos ellos de al menos dos experimentos independientes (p=2), con cada condición por triplicado (n=3). Las comparaciones fueron analizadas mediante la prueba ANOVA de una vía seguido de un test post hoc de Bonferroni (*, # p<0,005. # respecto al grupo Aire; # respecto al grupo EHT 3%) Abreviaturas: CE50: concentración efectiva 50; EHT: extracto de humo de tabaco; GSH: glutatión.

Por último se determinaron los niveles de GSH para conocer su potencial antioxidante los fármacos naturales BH4, aspalatina, taurina y obacunona y el fármaco inhibidor de la PDE4, glaucina. En todos los casos se comprobó que la estimulación con EHT 3% disminuía los niveles de GSH. En el ensayo con BH4 se observó que el fármaco no era capaz de prevenir la disminución de los niveles de GSH tras la estimulación con EHT al 3%, se determinó una CE50 de 2M y un efecto máximo de tan solo el 22%, cuando asumimos que el 100% son los niveles obtenidos por las condiciones control (**Figura 42, A y Tabla 18**). Por otro lado, los casos de las células tratadas con aspalatina, taurina y glaucina, los fármacos no mostraron capacidad alguna de prevenir la disminución de los niveles de GSH causada por la estimulación con EHT (**Figura 42, B, C y E y Tabla 18**). Sin embargo, en los ensayos realizados con el fármaco natural obacunona, a diferencia de los otros casos, se demostró que este fármaco era capaz de prevenir la disminución de los niveles de GSH. Se determinó, en este caso, una CE50 de 23,5µM y un efecto máximo de más del 150% (**Figura 42, D y Tabla 18**).

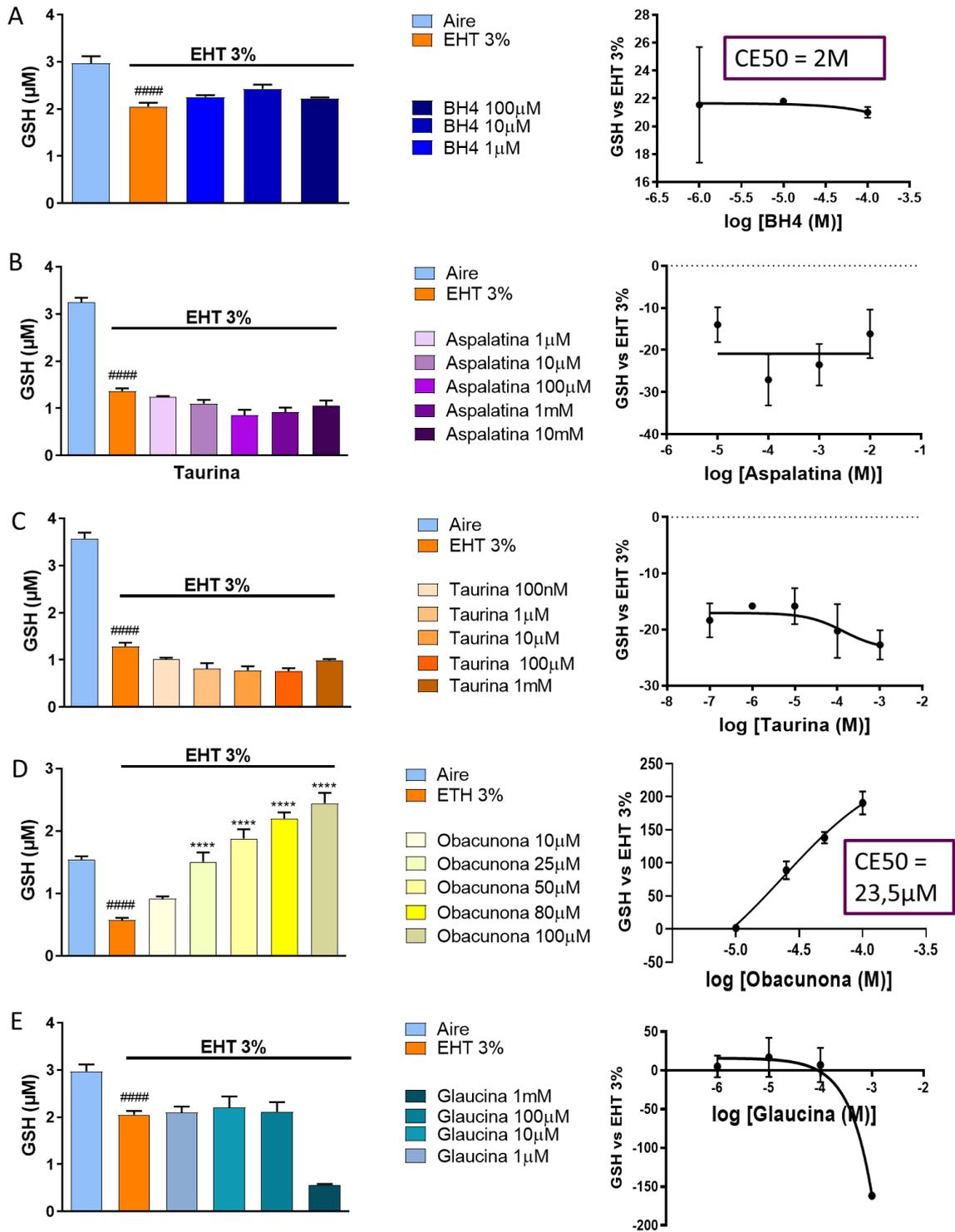


Figura 42. Niveles de GSH tras el tratamiento con los compuestos naturales BH4, aspalatina, taurina y obacunona y el inhibidor de PDE4 glaucina y la posterior estimulación con EHT 3% en células epiteliales bronquiales de línea. Las células BEAS2B se trataron con los compuestos naturales BH4 (de 1 μM a 100 μM) (A) aspalatina (de 1 μM a 10mM) (B), taurina (de 100nM a 10mM) (C) Obacunona (de 10 μM a 100 μM) (D) y Glaucina (de 1 μM a 1mM) (E) durante 24h y se estimularon posteriormente con EHT 3% durante 1h. Se calculó la CE50. El fármaco natural obacunona es capaz prevenir la disminución de GSH generada por

la estimulación con EHT. Los resultados de la izquierda se expresan como la media \pm SEM y los resultados de la derecha representan la regresión no-lineal para el cálculo de la CE50 todos ellos de al menos dos experimentos independientes ($p=2$), con cada condición por triplicado ($n=3$). Las comparaciones fueron analizadas mediante la prueba ANOVA de una vía seguido de un test post hoc de Bonferroni (*, # $p<0,005$. # respecto al grupo Aire; # respecto al grupo EHT 3%) *Abreviaturas: CE50: concentración efectiva 50; EHT: extracto de humo de tabaco; GSH: glutatión.*

Tabla 18. CE50 y máximo efecto de los fármacos testado como activadores de NRF2 en células epiteliales de línea.

BEAS2B	Fármaco	CE50	Máximo efecto
ELECTROFÍLICOS Y NO ELECTROFÍLICO	CDDO-Me	13,7nM	>200%
	Omaveoloxona	25nM	>150%
	Astemizol	70nM	<40%
PEPTÍDICOS	TAT-14	4,66mM	<60%
	LK1-14		No efecto
	LAS200813:8	9,3nM	100%
NATURALES	BH4	2M	22%
	Aspalatina		No efecto
	Taurina		No efecto
	Obacunona	23,5 μ M	>150%
INHIBIDOR PDE4	Glaucina		No efecto

Tras estos ensayos se seleccionaron los fármacos que mejores efectos mostraron para realizar los ensayos posteriores. Estos fueron CDDO-Me, omaveoloxona, LAS200813:8 y obacunona, intentando tener un fármaco representante de cada grupo.

2.4 Fármacos activadores de NRF2 en células epiteliales bronquiales primarias

Para conocer la respuesta antioxidante de los fármacos seleccionados en células epiteliales bronquiales primarias de sujetos sanos y pacientes EPOC, se midieron los niveles de GSH tras el tratamiento con los diferentes fármacos y la posterior estimulación con EHT y se determinó la CE50 para cada uno de los casos (**Tabla 19**).

Por lo que respecta a las células bronquiales procedentes de sujetos sanos, se confirmó que los niveles de GSH disminuían tras la estimulación con EHT. Además, se observó que todos los fármacos utilizados eran capaces de prevenir la disminución de GSH provocada por el EHT y que los niveles de GSH aumentaban con la concentración de fármaco. Para la CDDO-Me, en particular, se obtuvo una CE50 de 6,1nM y el efecto máximo superaba el 100% del control

(Figura 43, A). Asimismo, para el caso de la omaveloxolona la CE50 obtenida fue de 38nM (Figura 43, B) de nuevo con un efecto máximo que superaba el 100% del control. Además, en los ensayos realizados con el péptido LAS200813:8 (Figura 43, C) y el compuesto natural obacunona (Figura 43, D) se obtuvieron unas CE50 de 287nM y 21µM, respectivamente, se alcanzaron, con estos fármacos, efectos por encima del control.

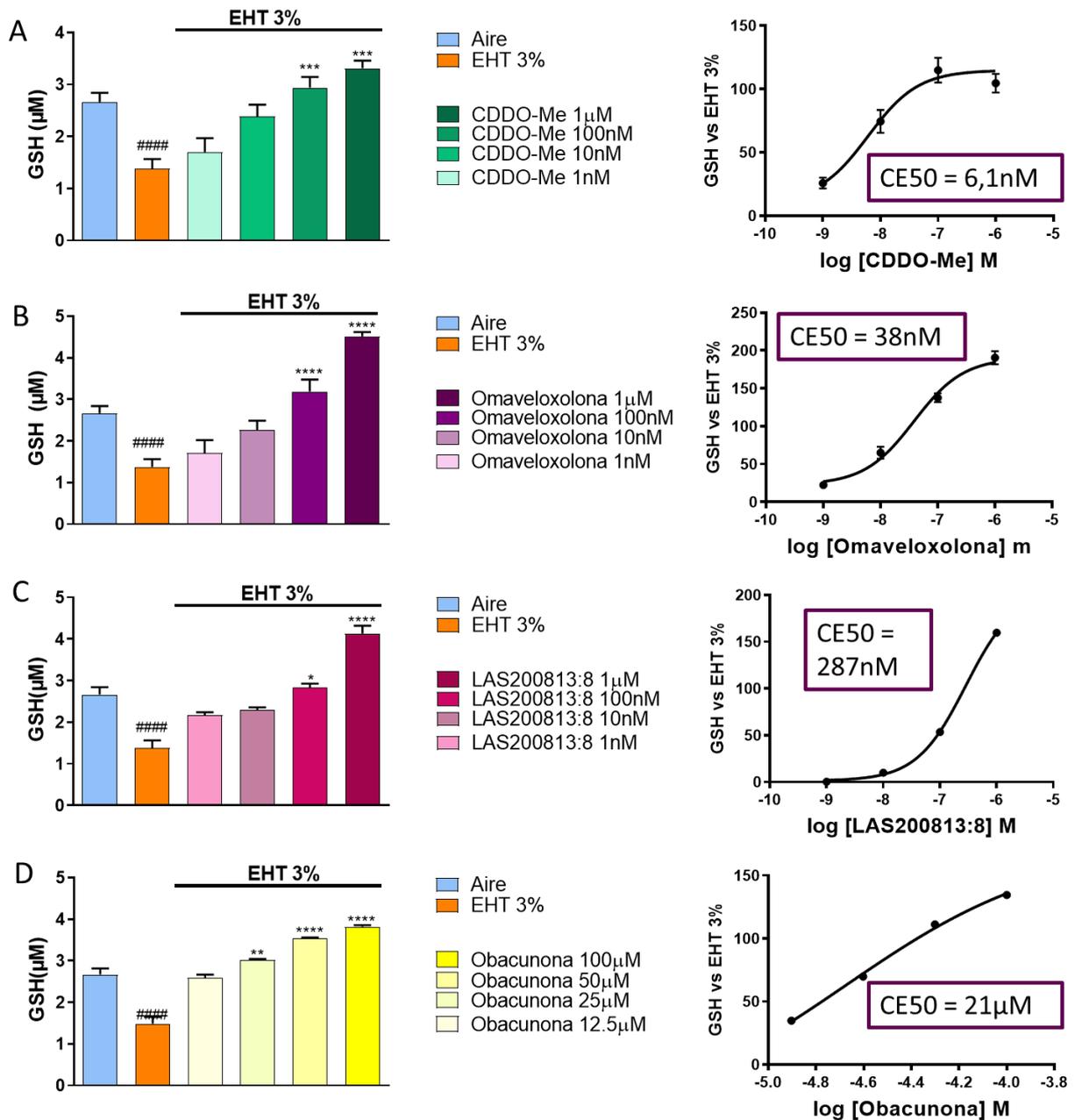


Figura 43. Niveles de GSH tras el tratamiento con los compuestos CDDO-Me, omaveloxolona, el péptido LAS200813:8 y obacunona y posterior estimulación con EHT 3% en células epiteliales bronquiales primarias obtenidas de sujetos sanos. Las CE50 de sano se trataron con los compuestos CDDO-Me (1nM a 1µM) (A), omaveloxolona (1nM a 1µM) (B), péptido LAS2008:13 (1nM a 1µM) (C), y obacunona (12,5µM a 100µM) (D) durante 24h y se estimularon posteriormente con EHT 3% durante 1h. Se calculó la CE50.

Los tres compuestos son capaces prevenir la disminución de GSH generada por la estimulación con EHT. Los resultados de la izquierda se expresan como la media \pm SEM y los resultados de la derecha representan la regresión no-lineal para el cálculo de la CE50 todos ellos de al menos dos experimentos independientes ($p=2$), con cada condición por triplicado ($n=3$). Las comparaciones fueron analizadas mediante la prueba ANOVA de una vía seguido de un test post hoc de Bonferroni (*, # $p<0,005$. # respecto al grupo Aire; # respecto al grupo EHT 3%) *Abreviaturas: CE50: concentración efectiva 50; EHT: extracto de humo de tabaco; GSH: glutatión.*

Tal como ocurría en las células procedentes de sujetos sanos, los niveles de GSH disminuían tras la estimulación con EHT y los fármacos seleccionados eran capaces de prevenir esta disminución generada por el EHT, asimismo los niveles de GSH aumentaban con la concentración del fármaco. Se obtuvieron unas CE50 de 19nM, 10nM, 101nM y 21,2 μ M para la CDDO-Me, la omaveloxolona, el péptido LAS200813:6 y la obacunona, respectivamente (**Figura 44**). De nuevo los efectos máximos observados superaban a la condición control.

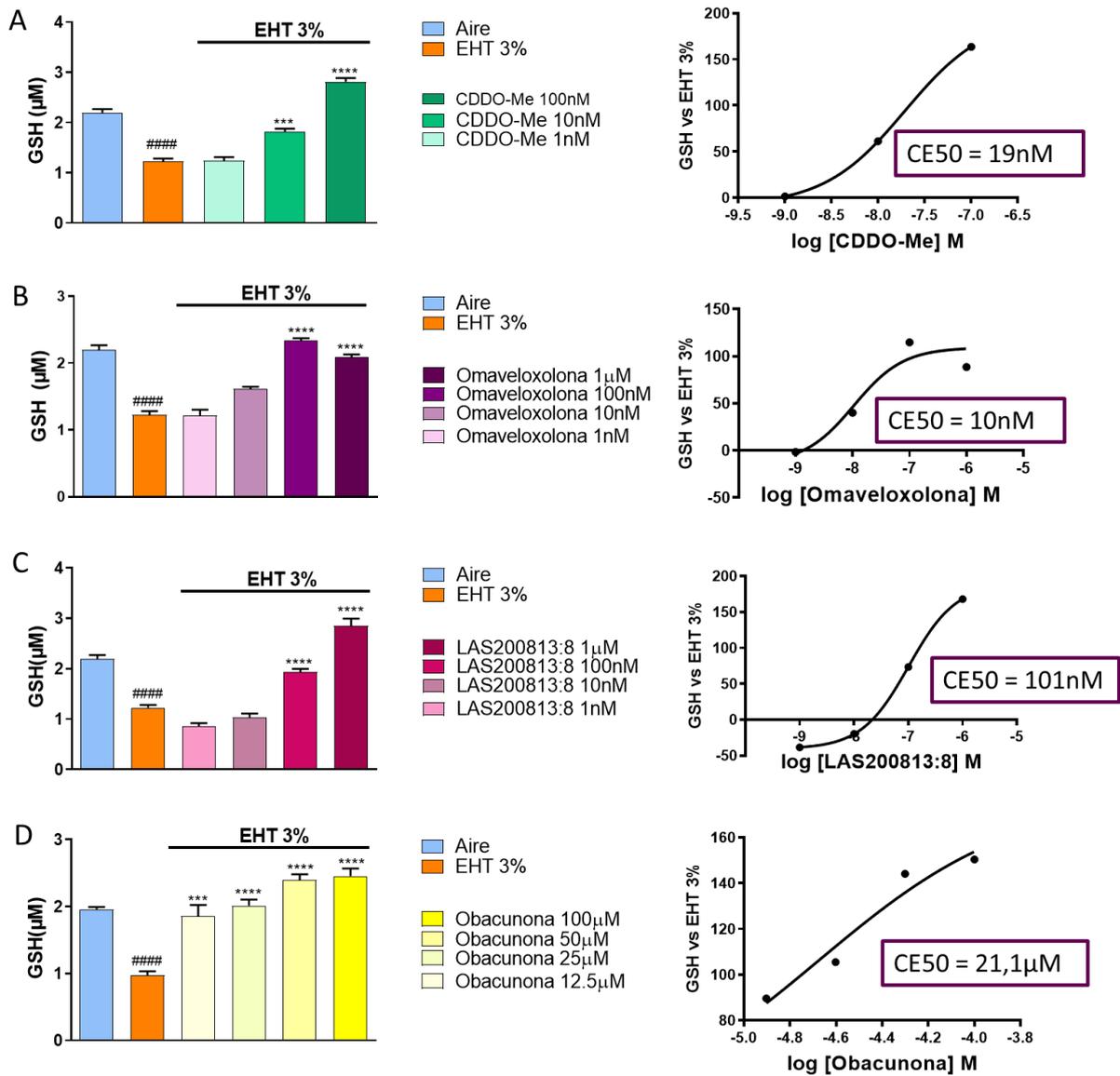


Figura 44. Niveles de GSH tras el tratamiento con los compuestos CDDO-Me, omaveloxolona, el péptido LAS200813:8 y obacunona y posterior estimulación con EHT 3% en células epiteliales bronquiales primarias obtenidas de pacientes EPOC. Las CEBH de pacientes EPOC se trataron con los compuestos CDDO-Me (1nM a 100nM) (A), omaveloxolona (1nM a 1µM) (B), péptido LAS2008:13 (1nM a 1µM) (C), y obacunona (12,5µM a 100µM) (D) durante 24h y se estimularon posteriormente con EHT 3% durante 1h. Se calculó la CE50. Los tres compuestos son capaces prevenir la disminución de GSH generada por la estimulación con EHT. Los resultados de la izquierda se expresan como la media \pm SEM y los resultados de la derecha representan regresión no-lineal para el cálculo de la CE50 todos ellos de al menos dos experimentos independientes ($p=2$), con cada condición por triplicado ($n=3$). Las comparaciones fueron analizadas mediante la prueba ANOVA de una vía seguido de un test post hoc de Bonferroni (*, # $p<0,005$. # respecto al grupo Aire; # respecto al grupo EHT 3%). Abreviaturas: CE50: concentración efectiva 50; EHT: extracto de humo de tabaco; GSH: glutatión.

Tabla 19. CE50 de los fármacos testado activadores de NRF2, los electrofílicos CDDO-Me y omaveloxolona, el péptido LAS200813:8 y el compuesto natural obacunona en células epiteliales primarias procedentes de sujetos sanos y pacientes EPOC.

	Fármaco	CE50 primarias SANO	CE50 primarias EPOC
ELECTROFÍLICOS	CDDO-Me	6,1nM	19nM
	Omaveloxolona	38nM	10nM
PÉPTIDO	LAS200813:8	287nM	101nM
NATURAL	Obacunona	21μM	21,1μM

Se comparó el efecto de los fármacos en células de sujetos sanos y pacientes EPOC, con el objetivo de comprobar si existía alguna diferencia en las células de pacientes EPOC debido a su menor expresión de NRF2. Sin embargo, no se encontraron diferencias reseñables en el comportamiento del fármaco en los distintos tipos celulares (**Figura 45**).

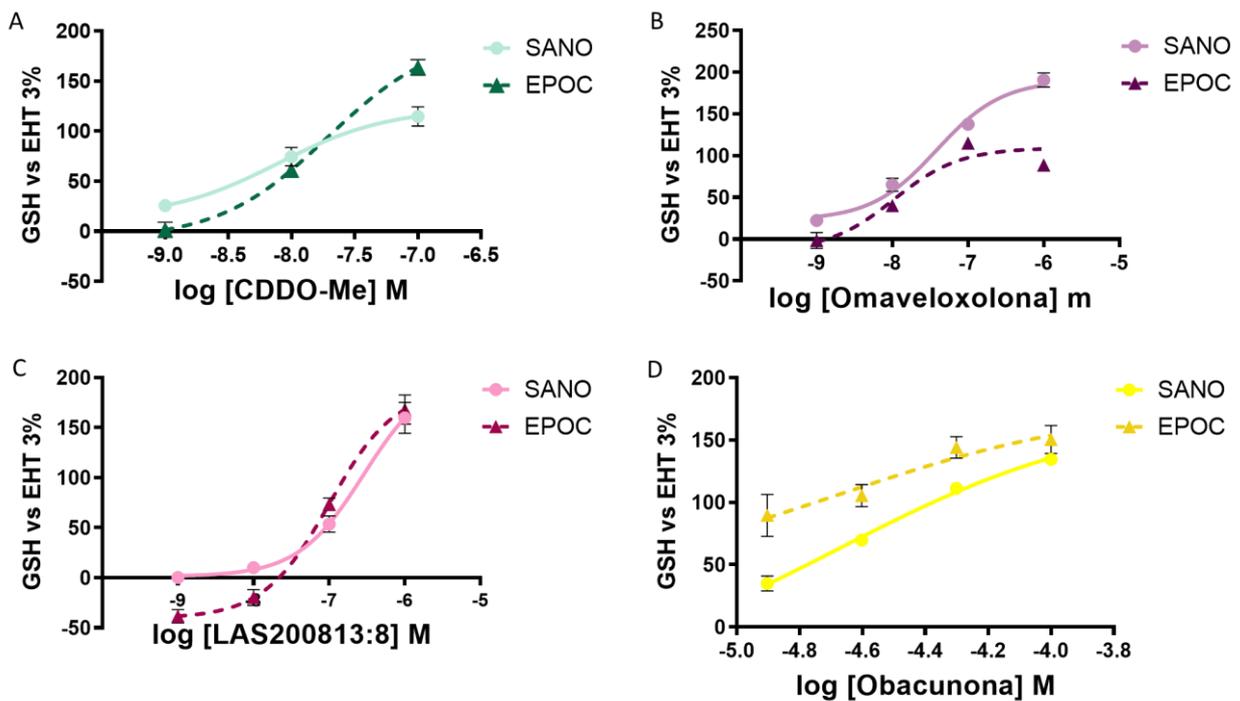


Figura 45. Comparación de los efectos en los niveles de GSH de los fármacos seleccionados en células epiteliales bronquiales primarias de sujetos sanos y pacientes EPOC. Se representan las regresiones no-lineales de efectos versus concentración logarítmica de fármaco de la CDDO-Me (A), la omaveloxolona (B), el péptido LAS200813:8 (C) y la obacunona (D). Abreviaturas: EHT: extracto de humo de tabaco; GSH: glutatión.

2.5 Fármacos activadores de NRF2 en células inflamatorias

A continuación, tras haber demostrado el potencial antioxidante de los fármacos activadores de NRF2 seleccionados se quiso comprobar su potencial en células inflamatorias. Las primeras células candidatas seleccionadas fueron los neutrófilos periféricos procedentes de sujetos sanos o pacientes EPOC, dado el papel de los neutrófilos en la enfermedad. Sin embargo, los neutrófilos tienen una vida media de tan solo 8-20 horas en circulación ⁴⁶³, lo que pudimos comprobar tras ensayos de viabilidad y apoptosis, en los que se observó que a las 24h el porcentaje de neutrófilos vivos era de alrededor del 20% (resultados no mostrados). Por lo tanto, debido a que los fármacos requerían una incubación previa de 24h, el uso de neutrófilos no era posible en este tipo de ensayo. Por este motivo se decidió utilizar como células inflamatorias, los monocitos, ya que también se trataban de células inflamatorias en suspensión que se encuentran normalmente en el torrente sanguíneo y que derivan a macrófagos, células muy implicadas también en la EPOC ¹¹⁷.

Así, por lo tanto, para conocer la respuesta antioxidante de los fármacos seleccionados en células inflamatorias en suspensión se determinaron los niveles de GSH tras el tratamiento con los diferentes fármacos y la posterior estimulación con EHT en monocitos U937, ya que esta línea celular había sido previamente utilizada para la determinación de los niveles de GSH ^{464,465}. Asimismo, se determinó la CE50 para cada uno de los fármacos (**Tabla 20**).

Igual que en los ensayos realizados con células epiteliales, los niveles de GSH disminuían tras la estimulación con EHT y los fármacos seleccionados eran capaces de prevenir la disminución generada por la exposición a EHT. En todo los casos, los niveles de GSH aumentaban conforme aumentaba la concentración de fármaco. Las CE50 obtenidas en estos ensayos fueron de 3,4nM, 3,35nM, 5,9µM y 640nM para la CDDO-Me, la omaveloxolona, el péptido LAS200813:6 y la obacunona, respectivamente (**Figura 46**). De nuevo los efectos máximos observados superaban a la condición control. Se observó, sin embargo, que para el péptido LAS200813:8 la concentración utilizada para obtener un efecto similar al control fue mucho mayor que en las células epiteliales.

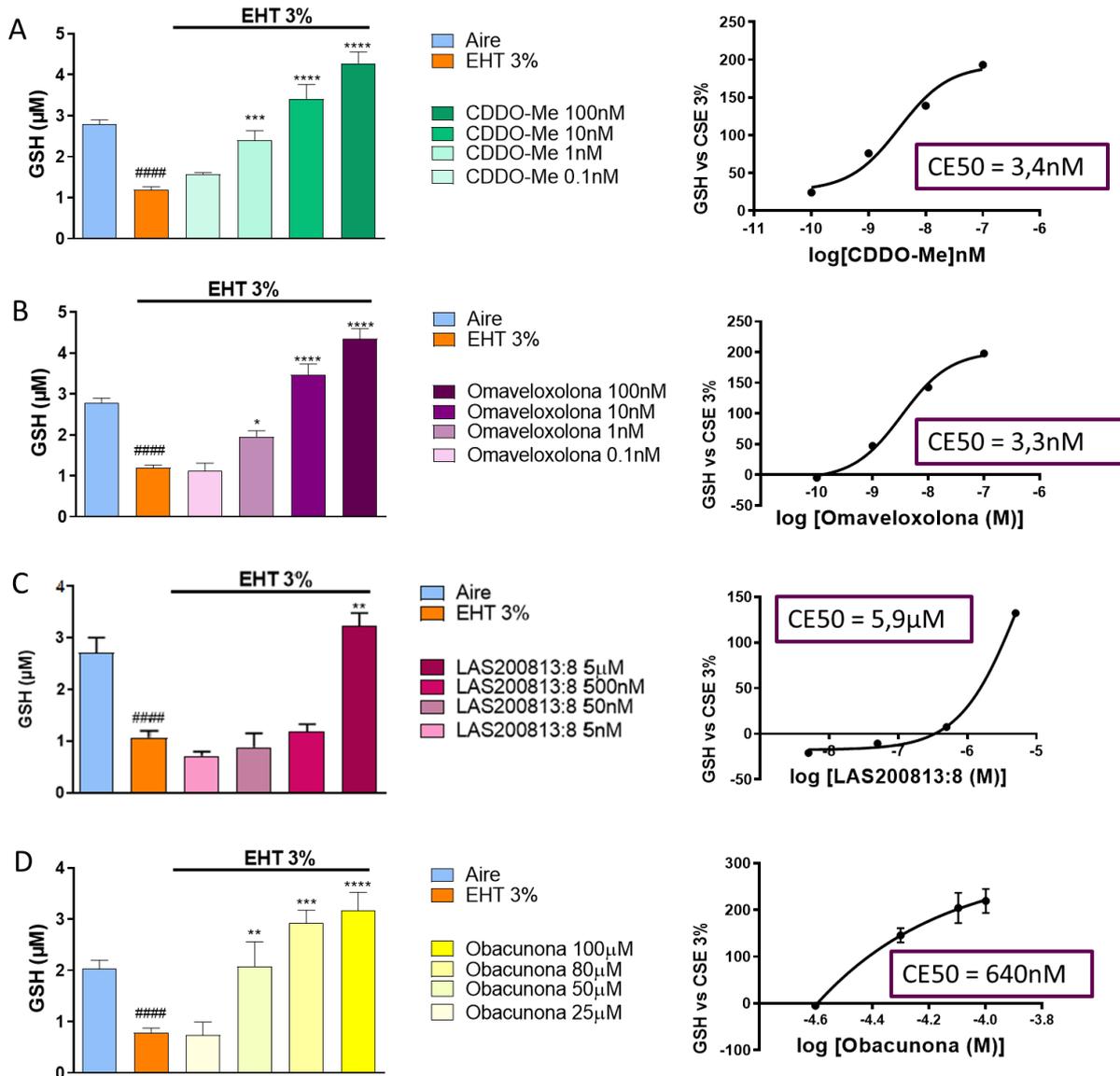


Figura 46. Niveles de GSH tras el tratamiento con los compuestos CDDO-Me, omaveloxolona, el péptido LAS200813:8 y obacunona y posterior estimulación con EHT 3% en monocitos U937. Los monocitos se trataron con los compuestos CDDO-Me (1nM a 100nM) (A), omaveloxolona (1nM a 100nM) (B), péptido LAS2008:13 (5nM a 5 μM) (C), y obacunona (25 μM a 100 μM) (D) durante 24h y se estimularon posteriormente con EHT 3% durante 1h. Se calculó la CE50. Los tres compuestos son capaces prevenir la disminución de GSH generada por la estimulación con EHT. Los resultados de la izquierda se expresan como la media \pm SEM y los resultados de la derecha representan la regresión no-lineal para el cálculo de la CE50 todos ellos de al menos dos experimentos independientes ($p=2$), con cada condición por triplicado ($n=3$). Las comparaciones fueron analizadas mediante la prueba ANOVA de una vía seguido de un test post hoc de Bonferroni (*, # $p<0,005$. # respecto al grupo Aire; # respecto al grupo EHT 3%). *Abreviaturas: CE50: concentración efectiva 50; EHT: extracto de humo de tabaco; GSH: glutatión.*

Tabla 20. CE50 de los fármacos testado activadores de NRF2, los electrofílicos CDDO-Me y omaveloxolona, el péptido LAS200813:8 y el compuesto natural obacunona en monocitos U937.

	Fármaco	CE50 Monocitos
ELECTROFÍLICOS	CDDO-Me	3,4nM
	Omaveloxolona	3,35nM
PÉPTIDO	LAS200813:8	5,9µM
NATURAL	Obacunona	640nM

3. Determinación de especies reactivas oxígeno

Además de la detección de los niveles de GSH, para determinar la capacidad antioxidante de los fármacos activadores de NRF2, se midieron los niveles de ERO en células epiteliales bronquiales tanto de línea como primarias. Para ello las células fueron tratadas con los diferentes fármacos durante 24h y estimuladas con EHT al 5% durante 1h, tras lo que se procedió a la determinación de las ERO por detección de fluorescencia o citometría de flujo. Además se determinó la concentración inhibidora 50 (CI50) para cada uno de los casos (Tabla 21).

3.1 Fármacos activadores de NRF2 en células epiteliales bronquiales de línea y primarias

En todos los casos se observó que la estimulación con EHT producía un aumento significativo de los niveles de ERO y que además, los fármacos eran capaces de inhibir de forma significativa el aumento de los niveles de ERO en todos los tipos celulares ensayados y que esta inhibición era dosis dependiente. En las células epiteliales de línea, BEAS-2B, la CDDO-Me obtuvo un CI50 de 0,02nM, la omaveloxolona de 0,01nM, el péptido LAS200813:8 de 16nM y la obacunona de 34µM (Figura 47). Por otro lado se obtuvieron en CEBH de sujetos sanos CI50 para la CDDO-Me de 27nM, para la omaveloxolona de 14nM, para el péptido LAS200813:8 de 16nM y para la obacunona de 3734µM (Figura 48). En el caso de las CEBH de pacientes EPOC se determinaron unas CI50 de 30nM, 10nM, 4nM y 33µM para la CDDO-Me, la omaveloxolona, el péptido LAS 200813:8 y la obacunona, respectivamente (Figura 49).

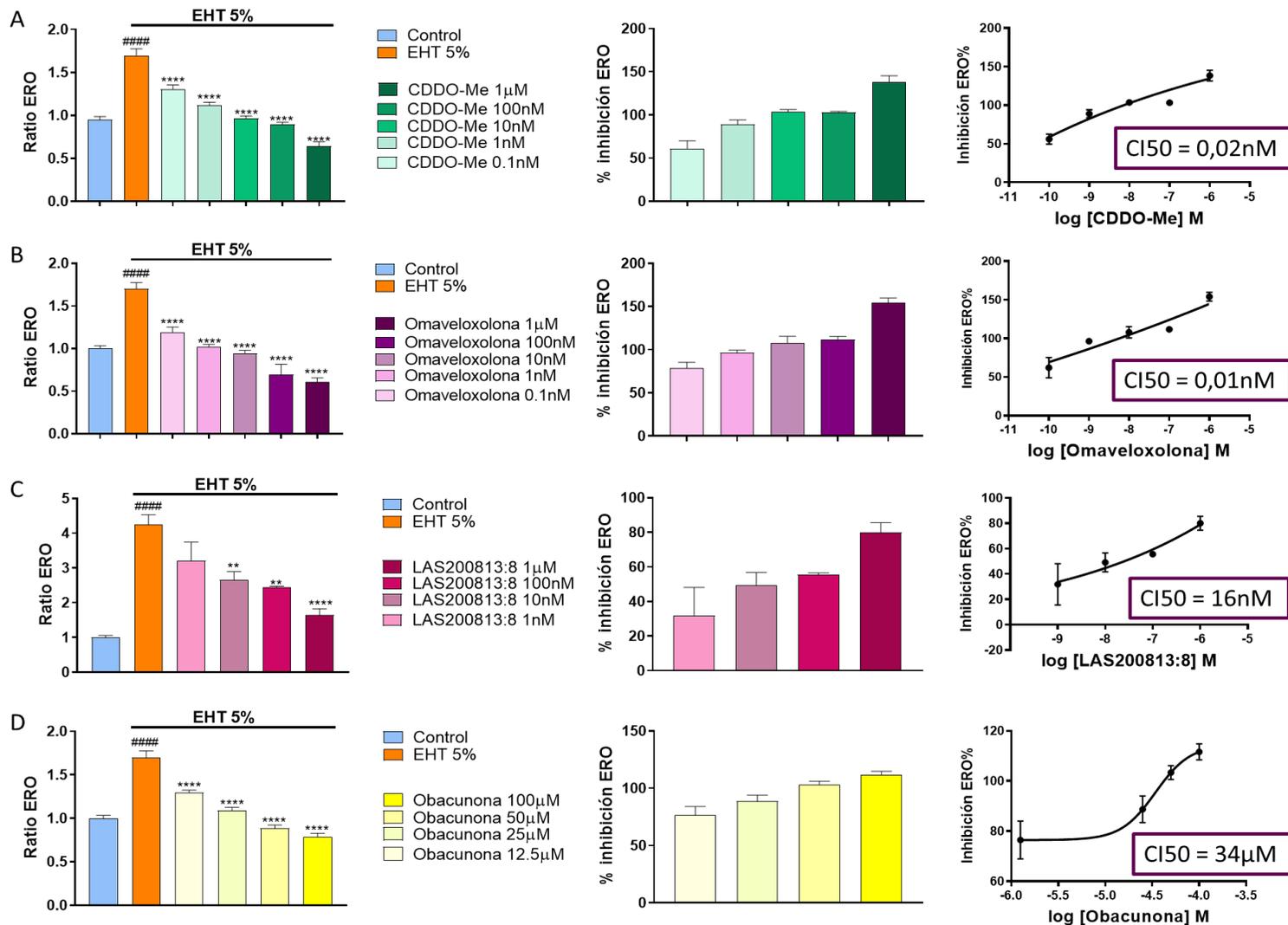


Figura 47. Niveles de ERO tras el tratamiento con los compuestos CDDO-Me, omaveloxolona, el péptido LAS200813:8 y obacunona y posterior estimulación con EHT 5% en BEAS-2B. Las BEAS-2B se trataron con los compuestos CDDO-Me (0,1nM a 1μM) (A), omaveloxolona (0,1nM a 1μM) (B), LAS2008:13 (1nM a 1μM) (C), y obacunona (12,5μM a 100μM) (D) durante 24h y se estimularon con EHT 5% durante 1h. Tras esto se detectaron los niveles de ERO por fluorescencia. Se calculó la CI50. Los tres compuestos son capaces inhibir las ERO generadas por la estimulación con EHT. Los resultados de la izquierda expresan el ratio de los niveles de ERO respecto al control y se presentan como la media ± SEM. Los resultados del medio representan el porcentaje de inhibición y los resultados de la derecha representan la regresión no-lineal para el cálculo de la CI50. Se realizaron al menos dos experimentos independientes (p=2), con cada condición por triplicado (n=3). Las comparaciones fueron analizadas mediante la prueba ANOVA de una vía seguido de un test post hoc de Bonferroni (* p<0,005 respecto al grupo EHT 5%). *Abreviaturas: CI50: concentración inhibidora 50; EHT: extracto de humo de tabaco; ERO: especies reactivas de oxígeno.*

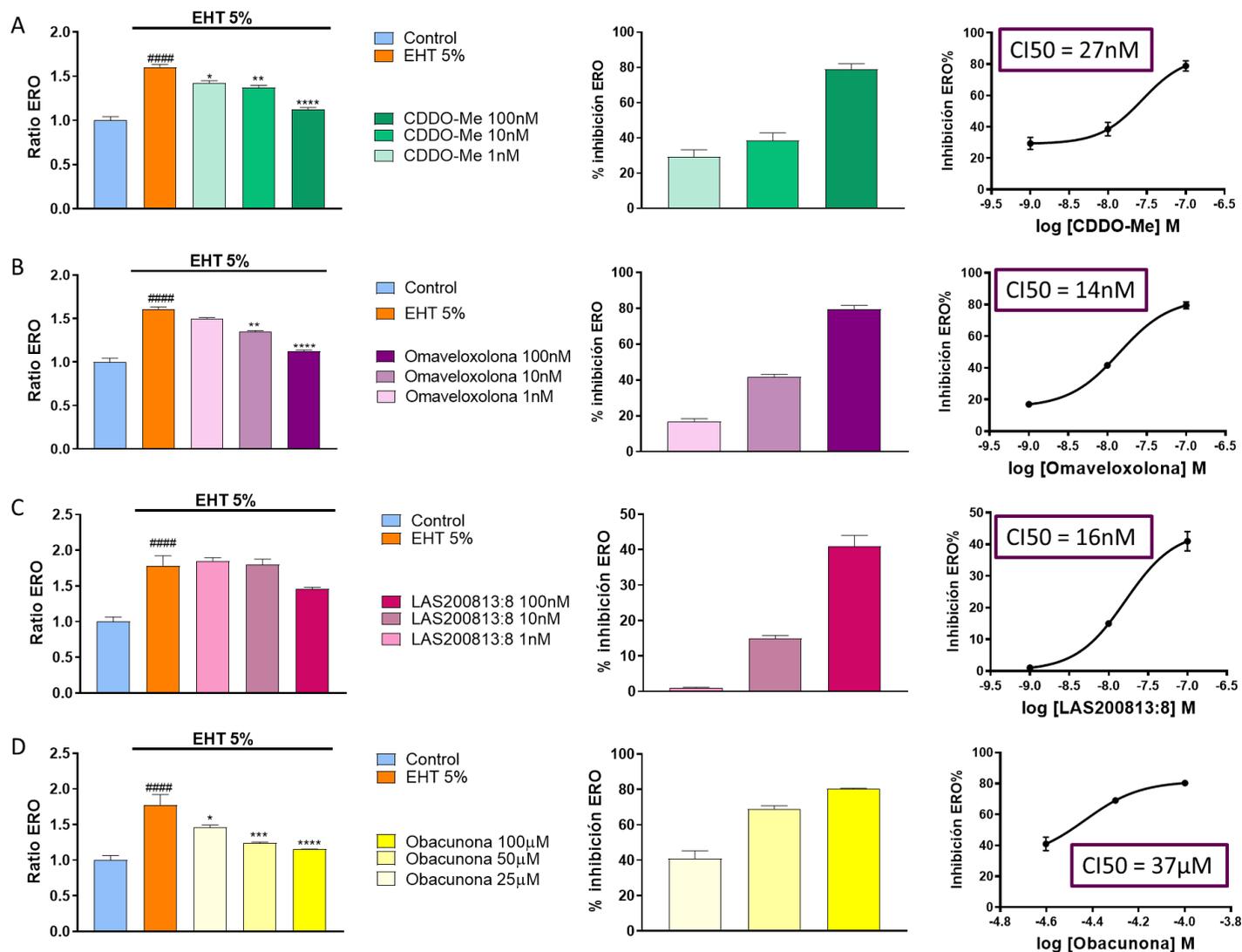


Figura 48. Niveles de ERO tras el tratamiento con los compuestos CDDO-Me, omaveloxolona, el péptido LAS200813:8 y obacunona y posterior estimulación con EHT 5% en células epiteliales bronquiales primarias obtenidas de sujetos sanos. Las CEBH se trataron con los compuestos CDDO-Me (1nM a 100nM) (A), omaveloxolona (1nM a 100nM) (B), LAS2008:13 (1nM a 100nM) (C), y obacunona (25µM a 100µM) (D) durante 24h y se estimularon con EHT 5% durante 1h. Tras esto se detectaron los niveles de ERO por citometría de flujo. Se calculó la CI50. Los tres compuestos son capaces inhibir el aumento de ERO generado por la estimulación con EHT. Los resultados de la izquierda expresan el ratio de ERO respecto al control y se presentan como la media \pm SEM. Los resultados del medio representan el porcentaje de inhibición y los resultados de la derecha representan la regresión no-lineal para el cálculo de la CI50. Se realizaron al menos dos experimentos independientes ($p=2$), con cada condición por triplicado ($n=3$). Las comparaciones fueron analizadas mediante la prueba ANOVA de una vía seguido de un test post hoc de Bonferroni (*, # $p<0,005$. # respecto al grupo Control; # respecto al grupo EHT 5%). Abreviaturas: CI50: concentración inhibidora 50; EHT: extracto de humo de tabaco; ERO: especies reactivas de oxígeno

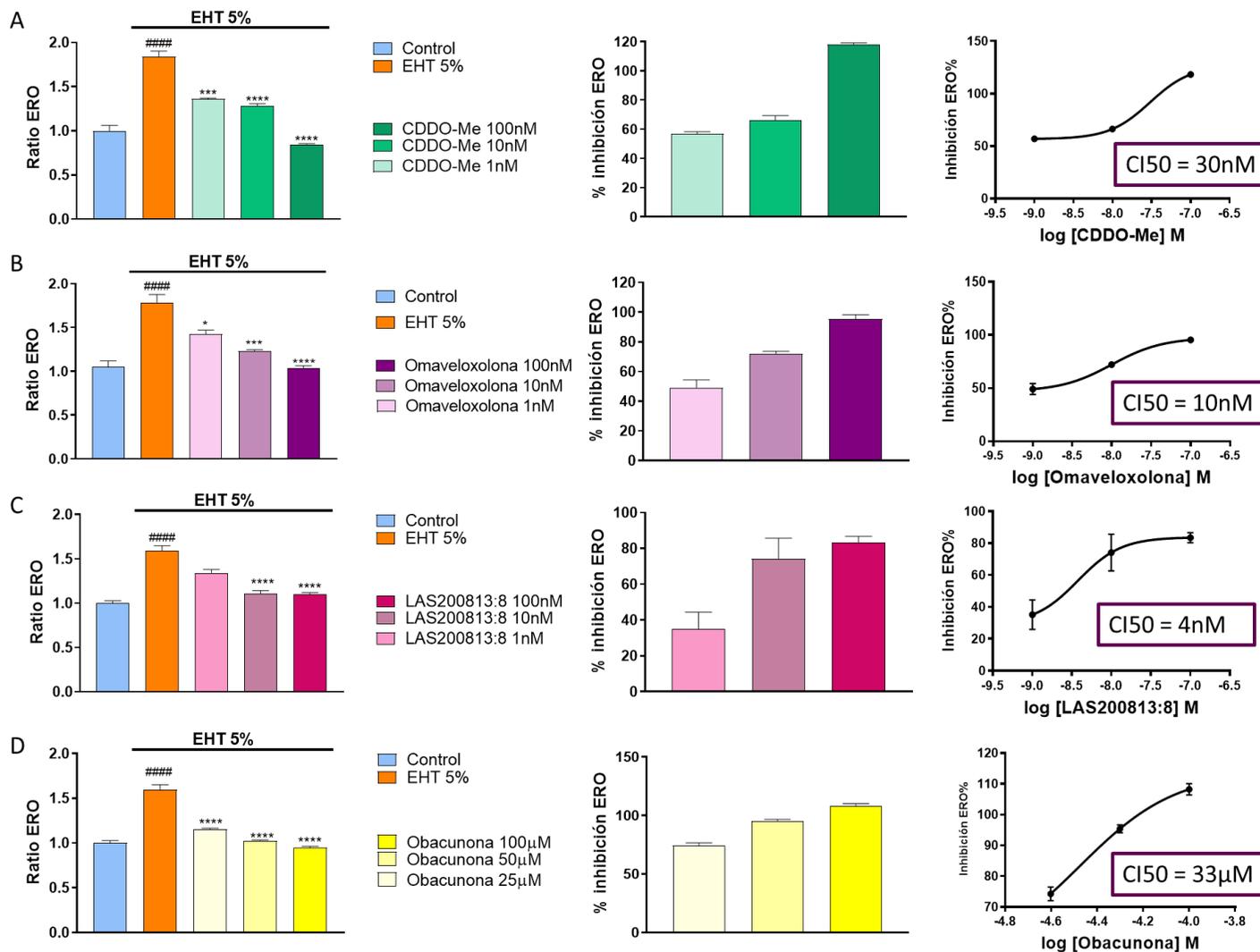


Figura 49. Niveles de ERO tras el tratamiento con los compuestos CDDO-Me, omapixeloxolona, el péptido LAS200813:8 y obacunona y posterior estimulación con EHT 5% en células epiteliales bronquiales primarias obtenidas de pacientes EPOC. Las CEBH se trataron con los compuestos CDDO-Me (1nM a 100nM) (A), omapixeloxolona (1nM a 100nM) (B), péptido LAS200813:8 (1nM a 100nM) (C), y obacunona (25µM a 100µM) (D) durante 24h y se estimularon posteriormente con EHT 5% durante 1h. Tras esto se detectaron los niveles de ERO por citometría de flujo. Se calculó la CI50. Los tres compuestos son capaces de inhibir el aumento de las ERO generada por la estimulación con EHT. Los resultados de la izquierda se expresan el ratio de los niveles de ERO respecto al control y se presentan como la media ± SEM. Los resultados del medio representan el porcentaje de inhibición y los resultados de la derecha representan la regresión no-lineal para el cálculo de la CI50. Se realizaron al menos dos experimentos independientes (p=2), con cada condición por triplicado (n=3). Las comparaciones fueron analizadas mediante la prueba ANOVA de una vía seguido de un test post hoc de Bonferroni (*, # p<0,005. # respecto al grupo Control; # respecto al grupo EHT 5%). Abreviaturas: CI50: concentración inhibidora 50; EHT: extracto de humo de tabaco; ERO: especies reactivas de oxígeno

Tabla 21. CI50 en los niveles de ERO de los fármacos activadores de NRF2, los electrofílicos CDDO-Me y omaveloxolona, el péptido LAS200813:8 y el compuesto natural obacunona en epiteliales de línea y primarias.

	Fármaco	CI50 BEAS-2B	CI50 Primarias SANO	CI50 Primarias EPOC
ELECTROFÍLICOS	CDDO-Me	0,02nM	27nM	30nM
	Omaveloxolona	0,01nM	14nM	10nM
PÉPTIDO	LAS200813:8	16nM	16nM	4nM
NATURAL	Obacunona	34μM	37μM	33μM

Asimismo, se comparó el efecto de los fármacos en la inhibición de las ERO en células de sujetos sanos y pacientes EPOC, con el objetivo de comprobar si existía alguna diferencia debida a la procedencia de las células. En este caso se encontró, que los fármacos tenían mayor potencial inhibidor de las ERO en las células procedentes de pacientes EPOC en comparación de las procedentes de sujetos sanos (Figura 50).

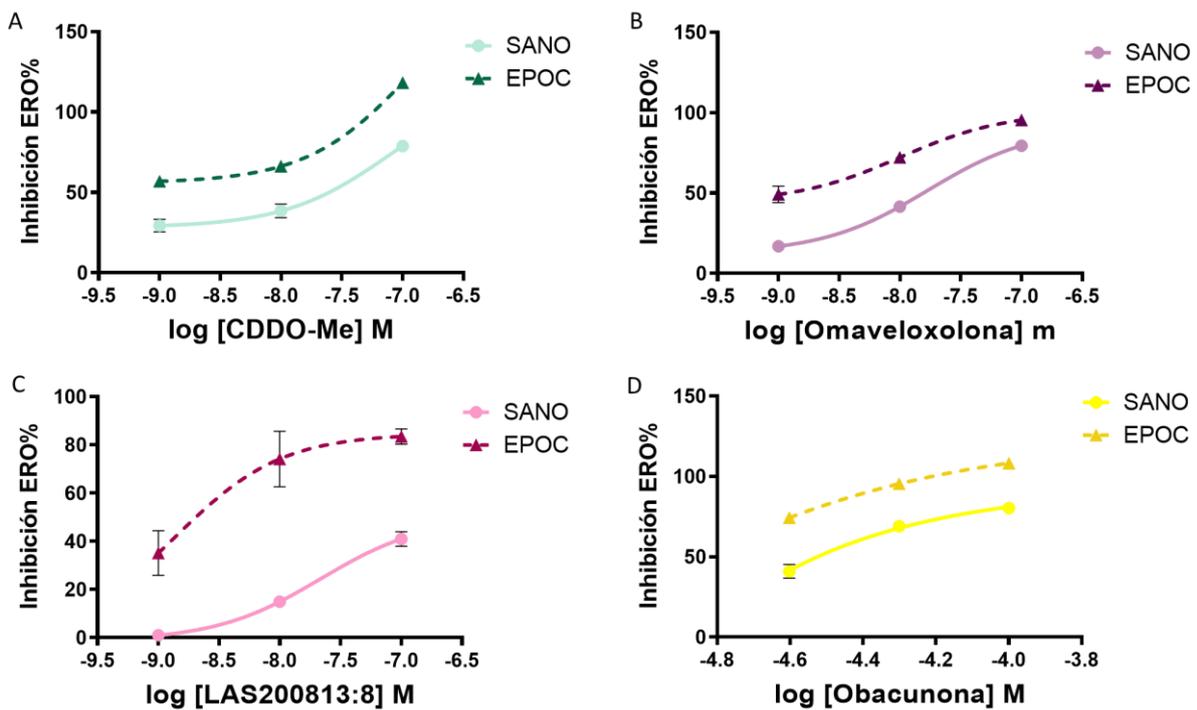


Figura 50. Comparación de los efectos en la inhibición de las ERO de los fármacos seleccionados en células epiteliales bronquiales primarias de sujetos sanos y pacientes EPOC. Los fármacos tienen mayor efecto en células de pacientes EPOC. Se representan las regresiones no-lineales de inhibición de las ERO versus concentración logarítmica de fármaco de la CDDO-Me (A), la omaveloxolona (B), el péptido LAS200813:8 (C) y la obacunona (D). Abreviaturas: ERO: especies reactivas de oxígeno

4. Expresión de genes antioxidantes por fármacos activadores de NRF2

Con el objetivo de analizar más en profundidad el potencial antioxidante de los fármacos activadores de NRF2 en la EPOC, paralelamente a la determinación de los niveles de GSH y de ERO, se analizaron los niveles de expresión de distintos genes antioxidantes. Los genes de interés para estos ensayos fueron *NQO1*, *HO-1*, *NRF2* y *GPX-1*. Se eligió *NRF2* para comprobar qué efecto tenían los activadores en la propia expresión de la proteína que activaban. Además, se escogieron los genes *NQO1*, *HO-1* y *GPX-1* ya se tratan de genes cuya expresión está regulado por el factor de transcripción NRF2 y dan lugar a proteínas antioxidantes.

Se estudió, además, la expresión de estos genes antioxidantes en los diferentes tipos celulares implicados en la patología de la EPOC.

4.1 Células epiteliales bronquiales de línea

Se estudió la expresión de los genes antioxidantes mencionados en células epiteliales bronquiales. Se realizaron los ensayo en primer lugar en células de línea, debido a su disponibilidad y su rápido crecimiento.

Las BEAS-2B se sembraron y se trataron con los diferentes fármacos a distintas concentraciones. Después de 1h del tratamiento, las células fueron estimuladas con EHT 3%. Tras 24h de incubación se extrajo el RNA y se llevó a cabo la técnica de qPCR para determinar la expresión de los genes mencionados.

Se observó en todos los casos que la estimulación únicamente con EHT aumentaba la expresión de los genes antioxidantes *NQO1*, *HO-1* y *GPX-1* de forma significativa, sin embargo, la expresión de *NRF2* se mantenía prácticamente igual a pesar de la estimulación con EHT.

Asimismo, se demostró que en las BEAS-2B tratadas con CDDO-Me la expresión tanto de *NRF2*, *NQO1*, *HO-1* y *GPX-1* aumentaba conforme aumentaba la concentración de fármaco (**Figura 51, A**), llegando a niveles significativos respecto a la condición tratada únicamente con EHT. Cabe destacar que el aumento de la expresión de los genes era muy superior en los genes que codificaban para las enzimas *NQO1*, *HO-1* y *GPX-1* que en el propio factor *NRF2*.

En las células tratadas con omaveloxolona también se encontró como la expresión de *NRF2*, *NQO1*, *HO-1* y *GPX-1* aumentaba con el tratamiento de los fármaco y que el aumento era

proporcional a la concentración de fármaco (**Figura 51, B**), igual que en el caso de la CDDO-Me, el aumento de la expresión del propio factor *NRF2* era menor que el resto de genes antioxidantes. Además, cabe destacar que para en el caso de la omaveloxolona, el nivel de inducción de la expresión de los genes fue menor que en el caso de la CDDO-Me.

Por otro lado, en el caso del tratamiento con el péptido LAS200813:8 se encontró que la expresión de *NRF2*, *HO-1* y *GPX-1* aumentaba con la concentración del fármaco. Sin embargo, a diferencia de los otros fármacos se alcanzaban diferencias significativas respecto a las células estimuladas únicamente con EHT a concentraciones más elevadas. Además, en este caso, no se encontró un aumento significativo de la expresión del gen *NQO1* con este fármaco. De nuevo, el aumento de la expresión del propio factor *NRF2* era menor que el resto de genes antioxidantes y además el nivel de inducción con este fármaco es menor que en los casos de la CDDO-Me y la omaveloxolona (**Figura 51, C**).

Por último, en las condiciones tratadas con el compuesto natural obacunona se observaron que los niveles de expresión de los genes estudiados aumentaba con la concentración del fármaco y que, además, estos niveles de expresión eran mayores en comparación con el resto de los fármacos. Sin embargo, se ha de tener en cuenta que por ser un fármaco natural, las concentraciones empleadas eran mucho mayores que en los otros casos. Tal como ocurría en los otros casos, expresión del propio factor *NRF2* era menor que el resto de genes antioxidantes (**Figura 51, D**).

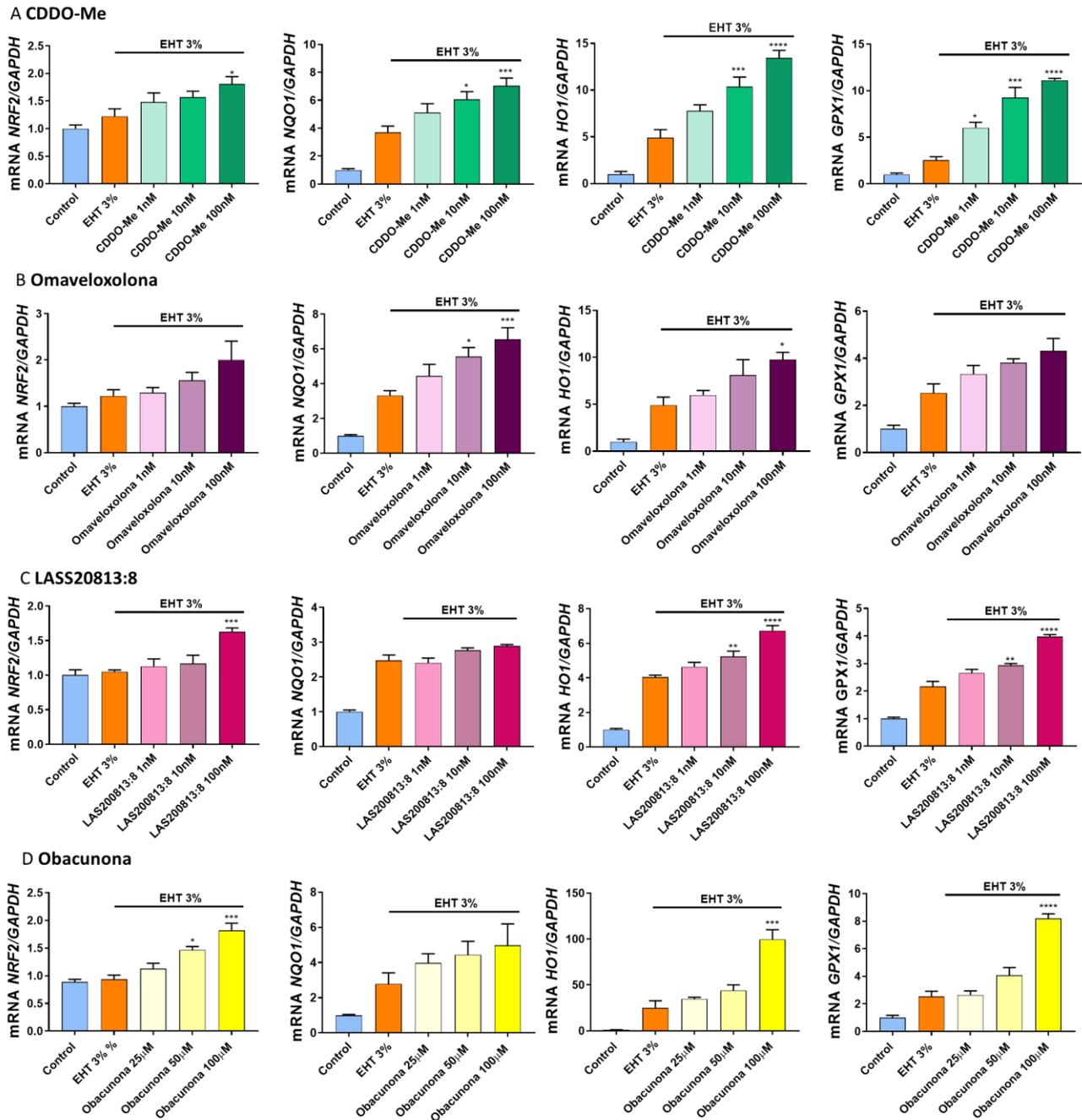


Figura 51. Los fármacos CDDO-Me, omapixeloxolona, el péptido LAS200813:8 y el compuesto natural obacunona aumentan la expresión de NRF2 y de los genes antioxidantes NQO1, HO-1 y GPX-1 en células epiteliales bronquiales de línea. Las BEAS-2B fueron tratadas con CDDO-Me (1nM – 100nM) (A), omapixeloxolona (1nM – 100nM) (B), LAS200813:8 (1nM – 100nM) (C) o obacunona (25µM – 100µM) (D) y estimuladas con EHT 3% durante 24h. Mediante qPCR se midieron los niveles de expresión génica de NRF2 (factor nuclear eritroide 2), NQO1 (NADPH quinona oxidoreductasa 1), HO-1 (hemoxigenasa 1) y GPX-1 (glutatión peroxidasa 1). Los resultados se expresan como ratio entre la expresión del gen de estudio y la expresión génica del control endógeno GAPDH. Además, los resultados se presentan como la media \pm SEM relativizados respecto al condición control de al menos dos experimentos independientes ($p=2$), con cada condición por triplicado ($n=3$). Las comparaciones fueron analizadas mediante la prueba ANOVA de una vía seguido de un test post hoc de Bonferroni (*, $p<0,005$ respecto al grupo EHT 3%).

4.2 Células epiteliales primarias

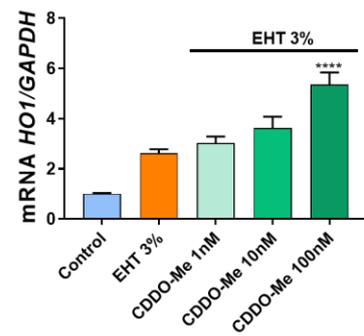
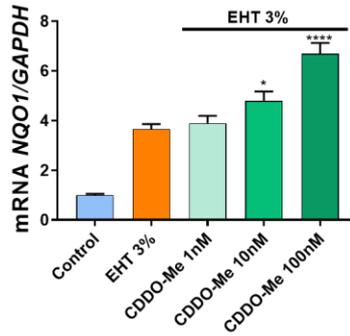
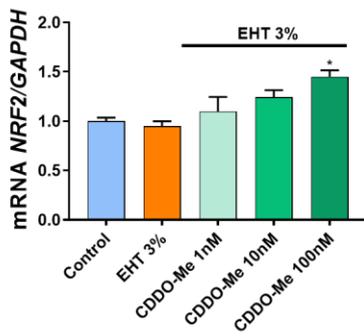
Una vez determinado el efecto antioxidante de los fármacos en la expresión génica en células epiteliales de línea, se pasó estudiar el efecto en la expresión en células epiteliales bronquiales primarias tanto de sujetos sanos como de pacientes EPOC, para poder determinar si la condición patológica afectaba a la expresión génica inducida por estos fármacos. Para este tipo celular los genes estudiados fueron *NRF2*, *HO-1* y *NQO1*.

Las CEBH, del mismo modo que las BEAS-2B, fueron sembradas y tratadas con los diferentes fármacos y después de una 1h fueron estimuladas con EHT al 4%. Tras 24h de incubación se procedió a la determinación de la expresión génica mediante qPCR.

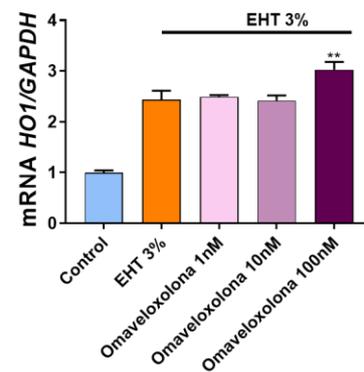
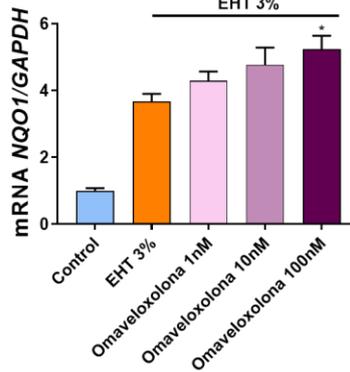
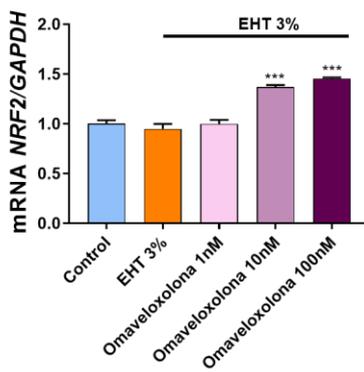
Tal como ocurría en las BEAS-2B y tanto para las células procedentes de sujetos sanos, como las procedentes de pacientes EPOC, la estimulación con EHT al 3% generaba per se un aumento de los genes antioxidantes *HO-1* y *NQO1*, mientras que la expresión de *NRF2* tras la estimulación con EHT apenas se veía modificada.

En el caso de las células procedentes de sujetos sanos, todos los fármacos utilizados eran capaces de aumentar la expresión de los genes antioxidantes *HO-1* y *NQO1* y el factor *NRF2*, aunque este último en mucha menor medida (**Figura 52**). Además, el nivel de expresión era proporcional a la concentración de fármaco empleada. Para la mayoría de los fármacos testados, exceptuando la obacunona, se requirió utilizar la máxima concentración del rango empleado para obtener diferencias significativas respecto a las células estimuladas únicamente con EHT. Mientras que la CDDO-Me (**Figura 52, A**) y la omaveloxolona (**Figura 52, B**) presentaban niveles de inducción de la expresión similares y el péptido LAS200813:8 (**Figura 52, C**) mostró niveles un tanto mayores de inducción. Sin embargo, el fármaco que mostró un mayor nivel de inducción de la expresión fue el compuesto natural obacunona (**Figura 52, D**), especialmente en el caso del gen *HO-1*. Por otro lado, hay que tener en cuenta que la tratarse de un fármaco natural, la concentraciones empleadas eran mayores que en el resto de los casos.

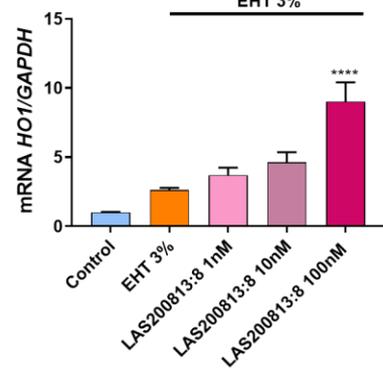
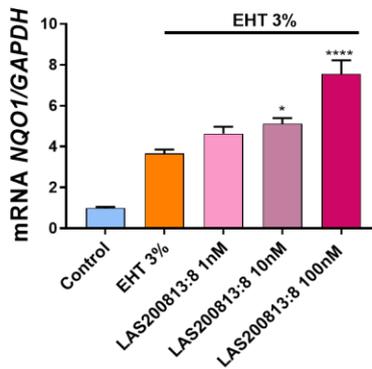
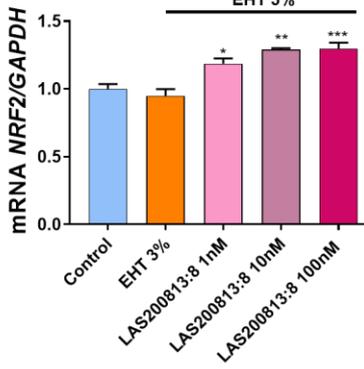
A CDDO-Me



B Omaveloxolona



C LASS20813:8



D Obacunona

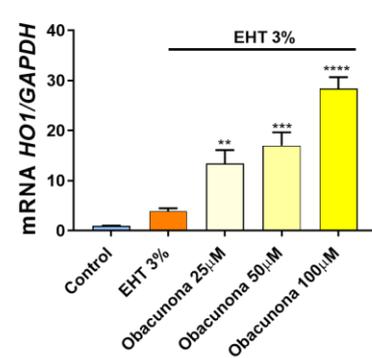
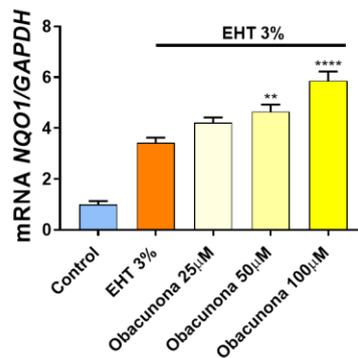
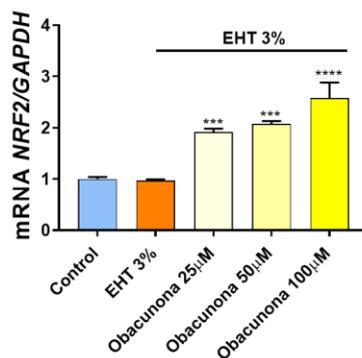


Figura 52. Los fármacos CDDO-Me, omaveloxolona, el péptido LAS200813:8 y el compuesto natural obacunona aumentan la expresión de NRF2 y de los genes antioxidantes NQO1 y HO-1 en células epiteliales bronquiales procedentes de sujetos sanos. Las CEHB fueron tratadas con CDDO-Me (1nM – 100nM) (A), omaveloxolona (1nM – 100nM) (B), LAS20013:8 (1nM – 100nM) (C) o obacunona (25µM –

100µM) (**D**) y estimuladas con EHT 3% durante 24h. Mediante qPCR se midieron los niveles de expresión génica de NRF2 (factor nuclear eritroide 2), NQO1 (NADPH quinona oxidorreductasa 1) y HO-1 (hemoxigenasa 1). Los resultados se expresan como ratio entre la expresión del gen de estudio y la expresión génica del control endógeno GAPDH. Además, los resultados se presentan como la media ± SEM relativizados respecto al condición control de al menos dos experimentos independientes (p=2), con cada condición por triplicado (n=3). Las comparaciones fueron analizadas mediante la prueba ANOVA de una vía seguido de un test post hoc de Bonferroni (*, p<0,005 respecto al grupo EHT 3%). *Abreviaturas: EHT: extracto de humo de tabaco*

Por otro lado, las células procedentes de pacientes EPOC mostraron niveles de expresión diferentes cuando eran tratadas por los diferentes fármacos. Mientras que todos los fármacos fueron capaces de aumentar la expresión de los genes antioxidantes *HO-1* y *NQO1*, incluso con niveles mayores que en células sanas, en ninguno de los casos la expresión del factor *NRF2* aumentó con el tratamiento de los fármacos, como sí que ocurría en el resto de células epiteliales bronquiales (**Figura 53**). En el caso de los genes *HO-1* y *NQO1* el nivel de expresión aumentaba conforme aumentaba la concentración de los fármacos, aunque en muchos casos se alcanzaban diferencias significativas a las concentraciones más altas. Asimismo, tal como ocurría con las células procedentes de sujetos sanos, la CDDO-Me (**Figura 53, A**) y la omaveloxolona (**Figura 53, B**) presentaron perfiles de nivel de expresión similares, el péptido LAS200813:8 (**Figura 53, C**) mostró un potencial de inducción de la expresión un tanto mayor, pero fue el compuesto natural obacunona (**Figura 53, D**) el que mostró el mayor nivel de inducción de expresión génica, especialmente para el gen *HO-1*.

Estudiada la expresión génica tras el tratamiento con los fármacos activadores NRF2, se compararon, entre células procedentes de sujetos sanos y células procedentes de pacientes EPOC, los niveles de inducción de la expresión de los genes (*HO-1* y *NQO1*) tras el tratamiento con cada uno de los fármacos. Se observó, como se ha comentado arriba y tal como ocurría en la inhibición de las ERO, que los fármacos tienen un mayor efecto en las células obtenidas de pacientes EPOC (**Figura 54 y 55**).

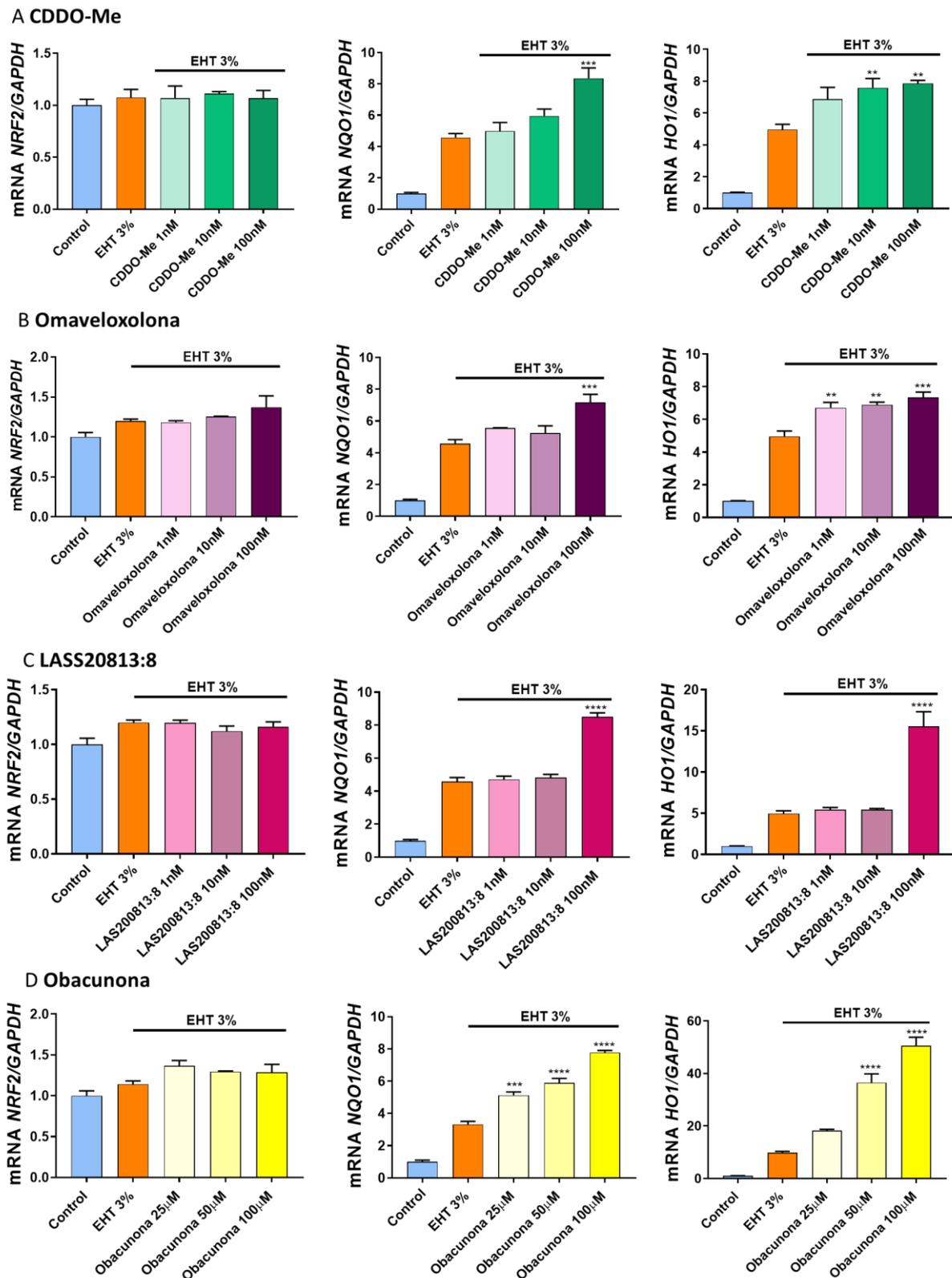


Figura 53. Los fármacos CDDO-Me, omaveloxolona, el péptido LAS20813:8 y el compuesto natural obacunona aumentan la expresión de NRF2 y de los genes antioxidantes NQO1 y HO-1 en células epiteliales bronquiales procedentes de pacientes EPOC. Las CEBH fueron tratadas con CDDO-Me (1nM – 100nM) (A), omaveloxolona (1nM – 100nM) (B), LAS20813:8 (1nM – 100nM) (C) o obacunona (25µM – 100µM) (D) y estimuladas con EHT 3% durante 24h. Mediante qPCR se midieron los niveles de expresión génica de NRF2 (factor nuclear eritroide 2), NQO1 (NADPH quinona oxidoreductasa 1) y HO-1

(hemoxigenasa 1). Los resultados se expresan como ratio entre la expresión del gen de estudio y la expresión génica del control endógeno GAPDH. Además, los resultados se presentan como la media \pm SEM relativizados respecto al condición control de al menos dos experimentos independientes ($p=2$), con cada condición por triplicado ($n=3$). Las comparaciones fueron analizadas mediante la prueba ANOVA de una vía seguido de un test post hoc de Bonferroni (*, $p<0,005$ respecto al grupo EHT 3%). *Abreviaturas: EHT: extracto de humo de tabaco*

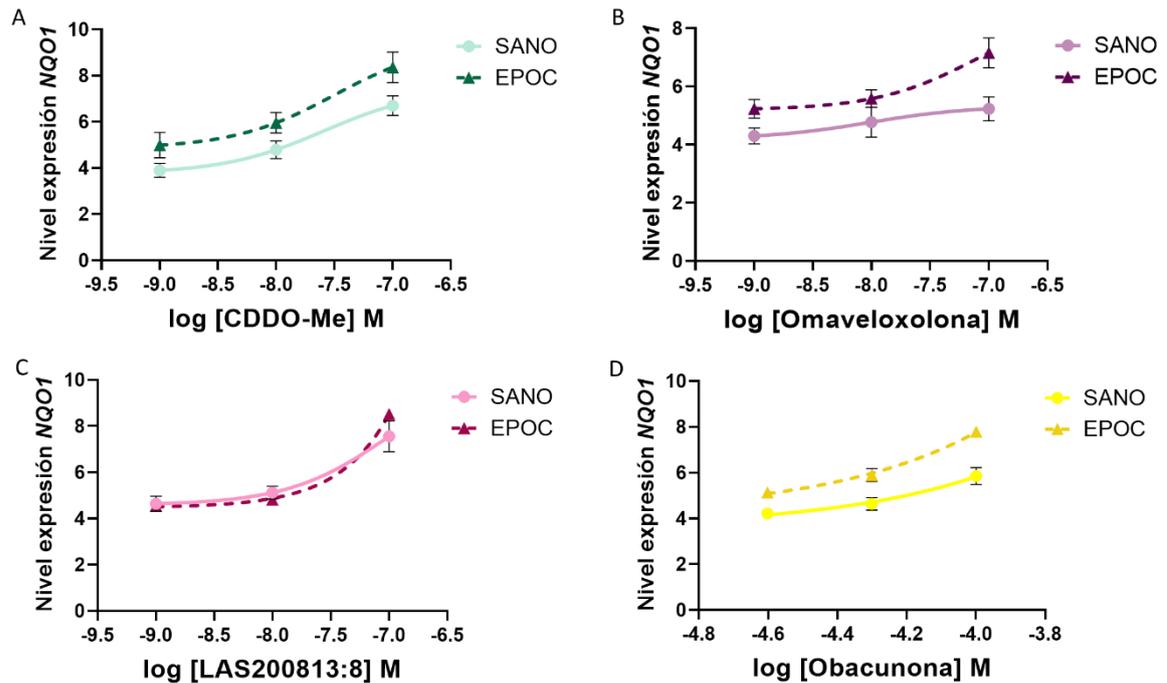


Figura 54. Comparación de los efectos en la inducción de la expresión del gen NQO1 en células epiteliales bronquiales primarias de sujetos sanos y pacientes EPOC. Los fármacos tienen mayor efecto en células de pacientes EPOC. Se representan las regresiones lineales de niveles de expresión de NQO1 versus concentración logarítmica de fármaco CDDO-Me (A), la omaveloxolona (B), el péptido LAS200813:8 (C) y la obacunona (D).

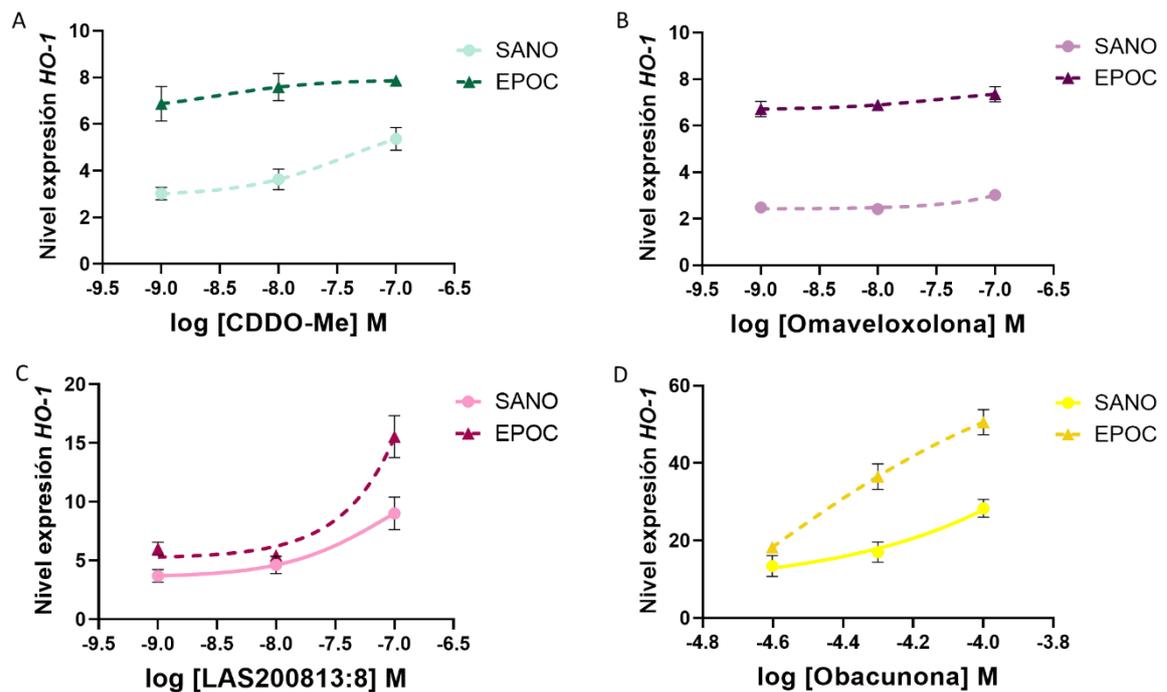


Figura 55. Comparación de los efectos en la inducción de la expresión del gen HO-1 en células epiteliales bronquiales primarias de sujetos sanos y pacientes EPOC. Los fármacos tienen mayor efecto en células de pacientes EPOC. Se representan las regresiones lineales de niveles de expresión de HO-1 versus concentración logarítmica de fármaco CDDO-Me (A), la omaveloxolona (B), el péptido LAS200813:8 (C) y la obacunona (D).

4.3 Neutrófilos periféricos

En la EPOC existen una gran cantidad de células implicadas en los mecanismos patológicos, sin embargo, destacan, entre ellas, las células epiteliales bronquiales y los neutrófilos. Estudiado el efecto de los fármacos en la expresión génica en células epiteliales bronquiales, se procedió a investigar el efecto en la expresión en neutrófilos, otras de las células claramente implicadas en la patología de la EPOC. Se utilizaron neutrófilos procedentes de sujetos sanos y de pacientes EPOC, con el fin de determinar si existían diferencias en la expresión a consecuencia de la patología.

Debido a la imposibilidad de mantener los neutrófilos durante varios días o congelarlos para sembrarlos en otro momento, los experimentos debían realizarse en el momento que había muestra disponible. Por este motivo, los neutrófilos utilizados para el estudio de la expresión génica también se emplearon para estudiar la liberación de interleucinas. Los neutrófilos, una vez aislados de la sangre periférica, fueron sembrados y tratados con los distintos fármacos, una

hora más tarde fueron estimulados con EHT al 3% e incubados durante 24h. Tras este tiempo se procedió a la extracción de ARN y a la determinación por qPCR de los niveles de expresión de los genes *NRF2*, *HO-1*, *NQO1* y *GPX1*.

Del mismo modo que con las células epiteliales bronquiales de línea o primarias, la estimulación con únicamente EHT 3% producía un aumento en la expresión de los genes antioxidantes ocurría en las BEAS-2B y tanto para las células procedentes de sujetos sanos, *HO-1* y *NQO1*. Sin embargo, a diferencia de las células epiteliales, en el caso de los neutrófilos, la estimulación con EHT 3% generaba una disminución en la expresión de *NRF2* y de *GPX1*.

En el caso de los neutrófilos procedentes de sujetos sanos, todos los fármacos utilizados aumentaron la expresión de los genes antioxidantes *HO-1*, *NQO1* y *GPX1* y del factor *NRF2* respecto a las células estimuladas únicamente con EHT 3% (**Figura 56**). De todos los genes estudiados, tal como ocurría con las células epiteliales, los niveles de expresión fueron mayores siempre para el gen *HO-1*, seguido de cerca del gen *NQO1*. Los niveles de expresión de *NRF2* y *GPX1* no fueron especialmente altos en comparación con los otros dos genes estudiados, coincidiendo con ser los dos genes cuya expresión disminuye con la estimulación con EHT. Respecto a los fármacos, todos, excepto el péptido LAS200813:8, mostraron niveles de inducción de la expresión similares, pero siendo el compuesto natural obacunona el que mayores niveles de expresión presentaba en la mayoría de los genes estudiados. El péptido, sin embargo, no fue capaz de aumentar la expresión del factor *NRF2* a esas concentraciones, pero sí de aumentar su actividad.

Por otro lado, en el caso de los neutrófilos procedentes de pacientes EPOC, todos los fármacos fueron capaces de incrementar la expresión de los genes antioxidantes respecto a la condición EHT, sin embargo, lo hicieron a unos niveles de expresión mucho menores y en la mayoría de los casos se necesitaron las concentraciones más altas para alcanzar diferencias significativas (**Figura 57**). Asimismo, de nuevo, el gen *HO-1* fue el que presentó mayores niveles de expresión, seguido de *NQO1*. De nuevo, el fármaco que produjo un incremento mayor de expresión génica fue el compuesto natural obacunona, tal como ocurría en el resto de las células estudiadas.

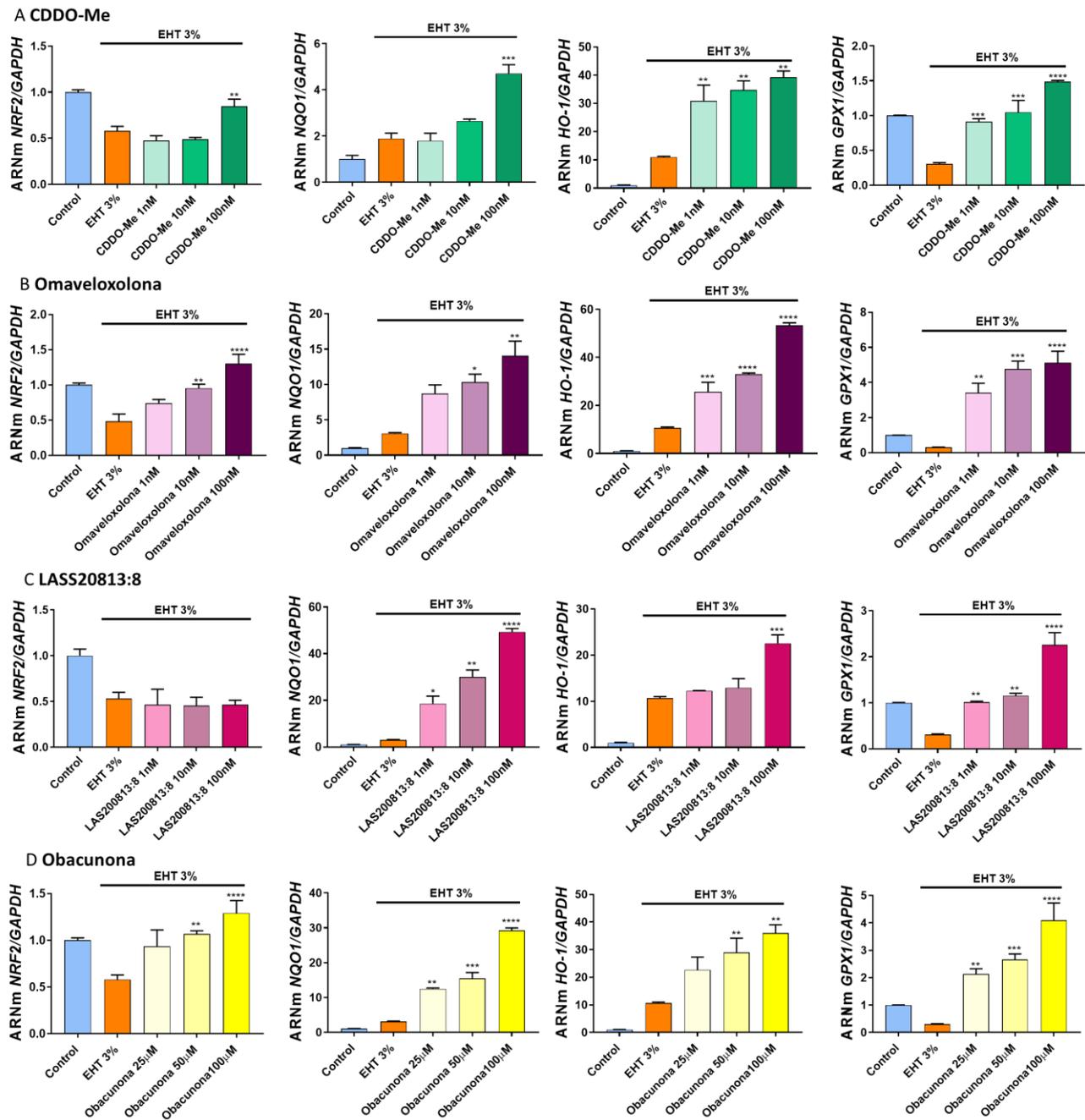


Figura 56. Los fármacos CDDO-Me, omapeloxolona, el péptido LAS200813:8 y el compuesto natural obacunona aumentan la expresión de los genes antioxidantes NQO1, HO-1 y GPX1 y del factor NRF2 en neutrófilos de sangre periférica procedentes de sujetos sanos. Los neutrófilos fueron tratados con CDDO-Me (1nM – 1µM) (A), omapeloxolona (1nM – 1µM) (B), el péptido LAS200813:8 (1nM – 100nM) (C) o obacunona (25µM – 100µM) (D) y estimulados con EHT 3% durante 24h. Mediante qPCR se midieron los niveles de expresión génica de NRF2 (factor nuclear eritroide 2), NQO1 (NADPH quinona oxidorreductasa 1), HO-1 (hemoxigenasa 1) y GPX1 (glutación peroxidasa 1). Los resultados se expresan como ratio entre la expresión del gen de estudio y la expresión génica del control endógeno GAPDH. Además, los resultados se presentan como la media \pm SEM relativizados respecto al condición control de al menos dos experimentos independientes ($p=2$), con cada condición por triplicado ($n=3$). Las comparaciones fueron analizadas mediante la prueba ANOVA de una vía seguido de un test post hoc de Bonferroni (*, $p<0,005$ respecto al grupo EHT 3%). Abreviaturas: EHT: extracto de humo de tabaco

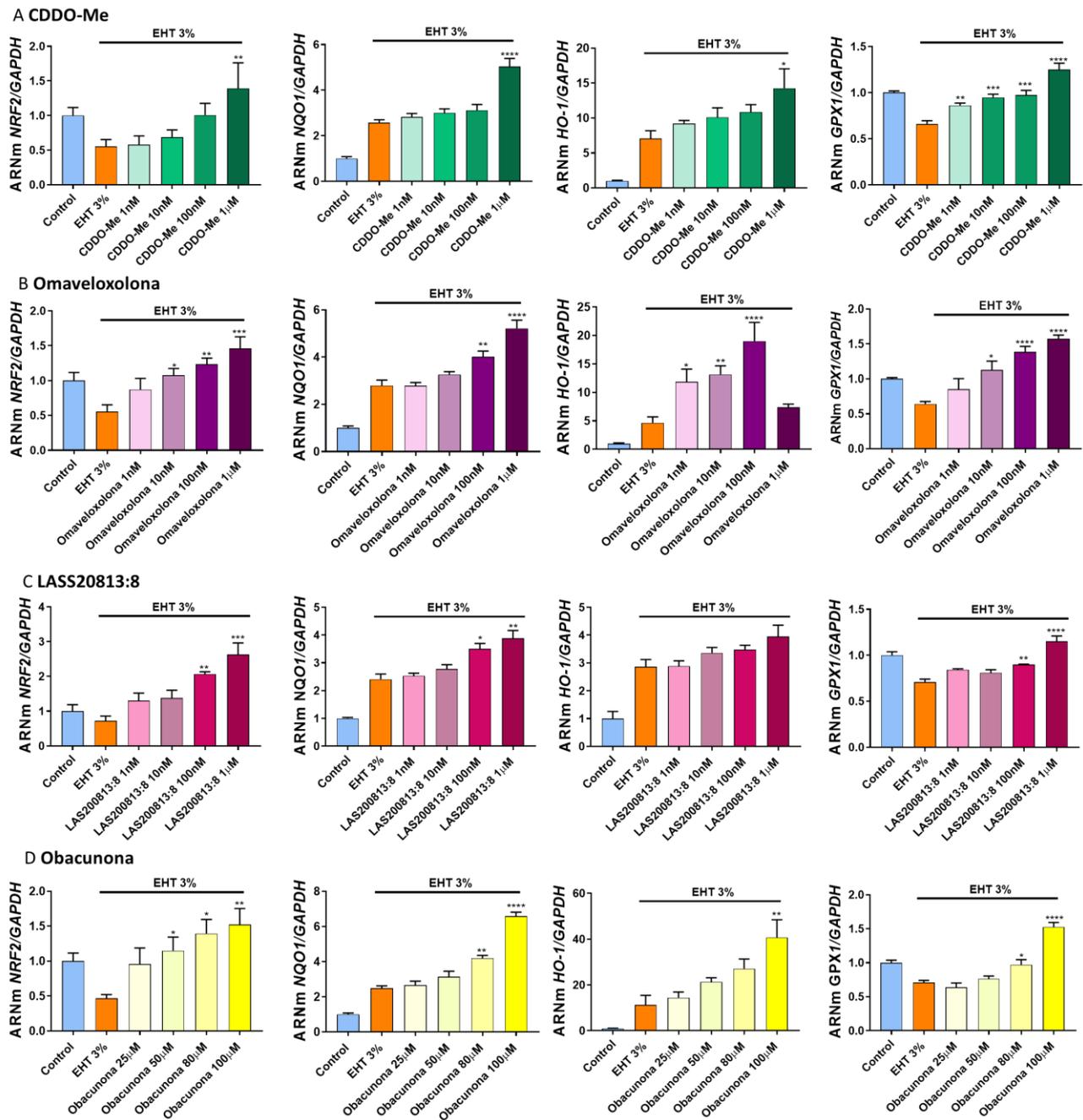


Figura 57. Los fármacos CDDO-Me, omaveloxolona, el péptido LAS200813:8 y el compuesto natural obacunona aumentan la expresión de los genes antioxidantes NQO1, HO-1 y GPX1 y del factor NRF2 en neutrófilos de sangre periférica procedentes de pacientes EPOC. Los neutrófilos fueron tratados con CDDO-Me (1nM – 1µM) (A), omaveloxolona (1nM – 1µM) (B), el péptido LAS200813:8 (1nM – 1µM) (C) o obacunona (25µM – 100µM) (D) y estimulados con EHT 3% durante 24h. Mediante qPCR se midieron los niveles de expresión génica de NRF2 (factor nuclear eritroide 2), NQO1 (NADPH quinona oxidoreductasa 1), HO-1 (hemoxigenasa 1) y GPX1 (glutatión peroxidasa 1). Los resultados se expresan como ratio entre la expresión del gen de estudio y la expresión génica del control endógeno GAPDH. Además, los resultados se presentan como la media ± SEM relativizados respecto al condición control de al menos dos experimentos independientes (p=2), con cada condición por triplicado (n=3). Las comparaciones fueron analizadas mediante la prueba ANOVA de una vía seguido de un test post hoc de Bonferroni (*, p<0,005 respecto al grupo EHT 3%). *Abreviaturas:* EHT: extracto de humo de tabaco

Igual que en el caso de las células epiteliales bronquiales primarias, se compararon los niveles de expresión génica de *HO-1* y *NQO1*, inducidos por los fármacos, entre neutrófilos de sujetos sanos y neutrófilos de pacientes EPOC. En este caso, a diferencia de las CEBH, se observó, que los fármacos tenían un mayor efecto en los neutrófilos procedentes de sujetos sanos (**Figura 58 y 59**).

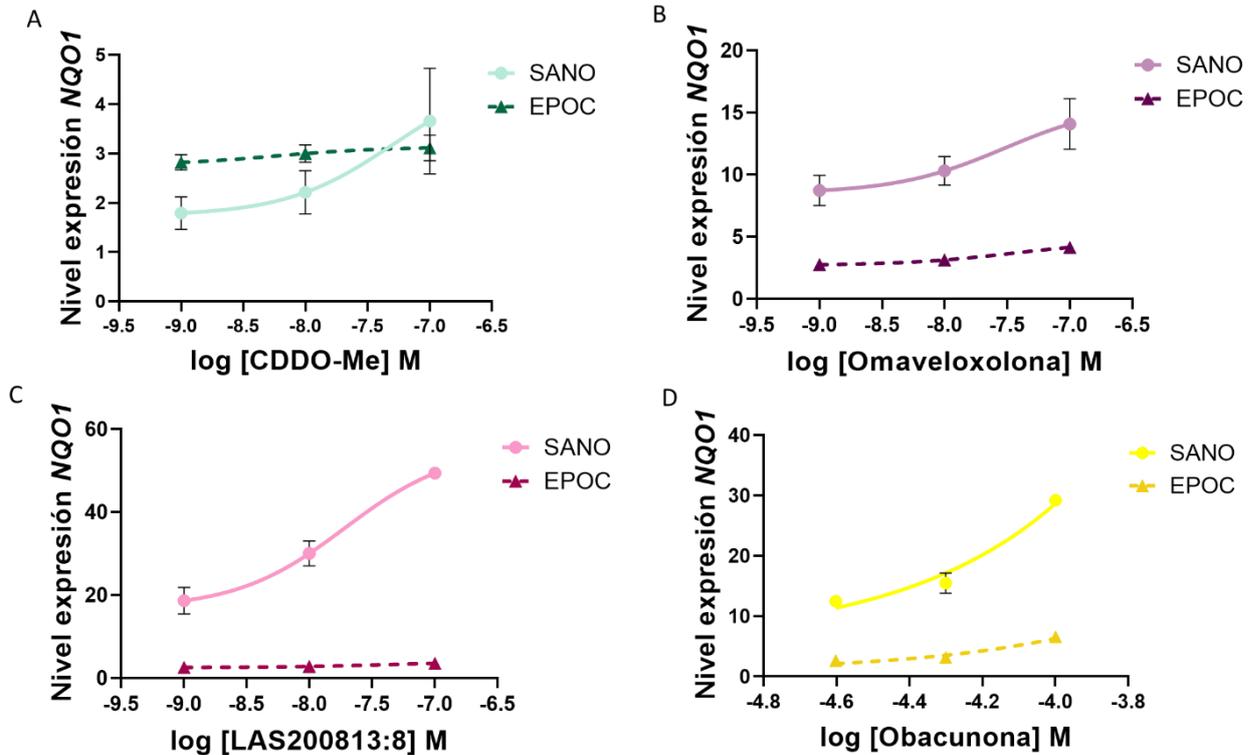


Figura 58. Comparación de los efectos en la inducción de la expresión del gen *NQO1* en neutrófilos procedentes de sujetos sanos y pacientes EPOC. Los fármacos tienen mayor efecto en neutrófilos de sujetos sanos. Se representan las regresiones lineales de niveles de expresión de *NQO1* versus concentración logarítmica de fármaco CDDO-Me (A), la omaveloxolona (B), el péptido LAS200813:8 (C) y la obacunona (D).

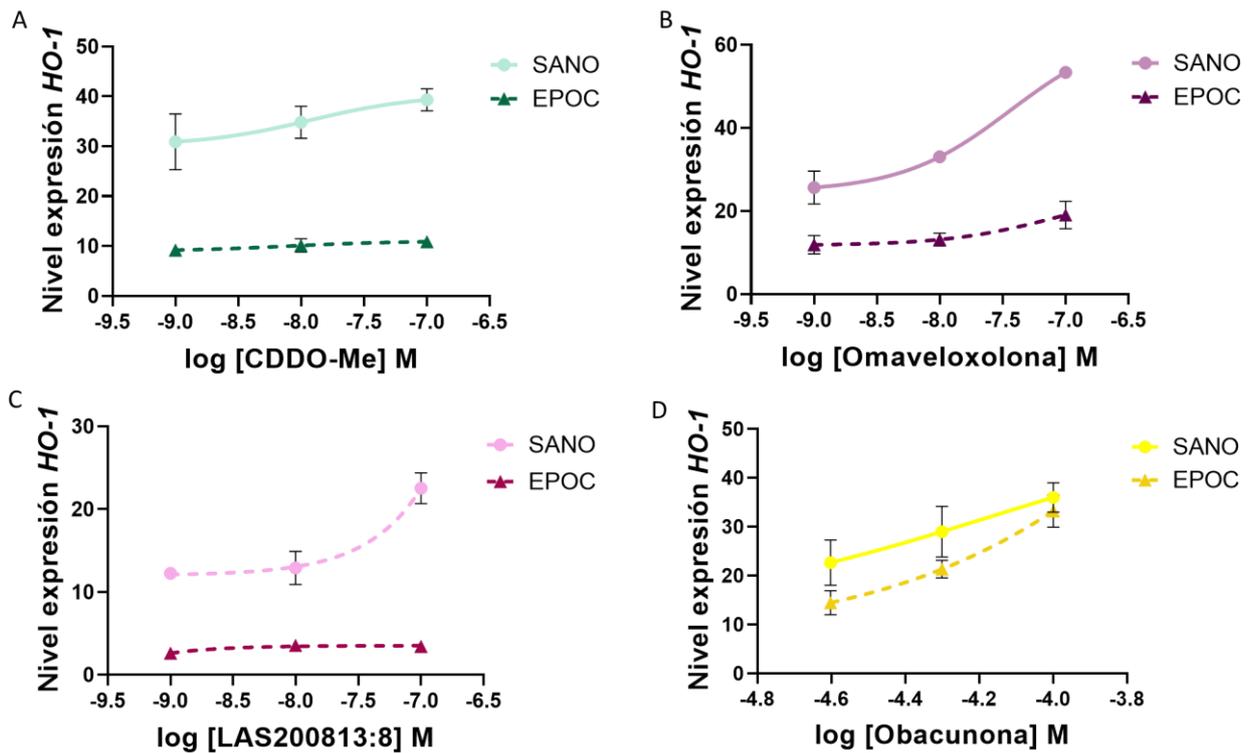


Figura 59. Comparación de los efectos en la inducción de la expresión del gen HO-1 en neutrófilos procedentes de sujetos sanos y pacientes EPOC. Los fármacos tienen mayor efecto en neutrófilos de sujetos sanos. Se representan las regresiones lineales de niveles de expresión de HO-1 versus concentración logarítmica de fármaco CDDO-Me (A), la omaveloxolona (B), el péptido LAS200813:8 (C) y la obacunona (D).

5. Expresión proteínas antioxidantes por fármacos activadores de NRF2.

Tras haber analizado el efecto de los fármacos activadores en la inducción de la expresión génica, se procedió al análisis de la expresión proteica de enzimas implicadas en la defensa antioxidante. De los genes estudiados, se seleccionaron para la determinación la expresión proteica, las enzimas antioxidantes HO-1 y NQO1, cuya expresión está regulada por NRF2, debido a que fueron las que mejores resultados mostraron en el análisis de la expresión génica.

La expresión proteica se estudió en células epiteliales bronquiales, tanto primarias como de línea. En este caso no se utilizaron neutrófilos, ya que debido a sus características, conseguir proteína suficiente para en análisis no fue posible.

5.1 Células epiteliales de línea BEAS-2B

El análisis de la expresión proteica en células epiteliales bronquiales se realizó en primer lugar en células de línea debido a su disponibilidad y rápido crecimiento.

Las BEAS-2B se sembraron y se trataron con los diferentes fármacos. Después de 1h del tratamiento, las células fueron estimuladas con EHT 3%. Tras 48h de incubación se aisló la proteína y se llevó a cabo la técnica *de western blot* para determinar los niveles de proteína.

Se observó en todos los casos, tal y como ocurría en la expresión génica, que la estimulación con EHT aumentaba per se los niveles de expresión proteica de las enzimas NQO1 y HO-1.

Asimismo, se demostró que las células tratadas con CDDO-Me a una concentración de 100nM mostraban unos niveles de expresión de NQO1 y HO-1 significativamente superiores respecto a la condición EHT (**Figura 60, A y E**). De la misma forma se observó que el tratamiento con omaveloxolona a 100nM aumentaba la expresión de NQO1 y HO-1 significativamente respecto a las células tratadas con EHT (**Figura 60, B y F**). Resultados muy similares se observaron en las células tratadas con el péptido LAS200813:8 a una concentración de 1 μ M (**Figura 60, C y G**) y con el compuesto natural obacunona a una concentración de 100 μ M (**Figura 60, D y H**). Los niveles de expresión entre ambas proteínas eran similares, aunque un tanto mayores en el caso de HO-1, especialmente en las células tratadas con CDDO-Me.

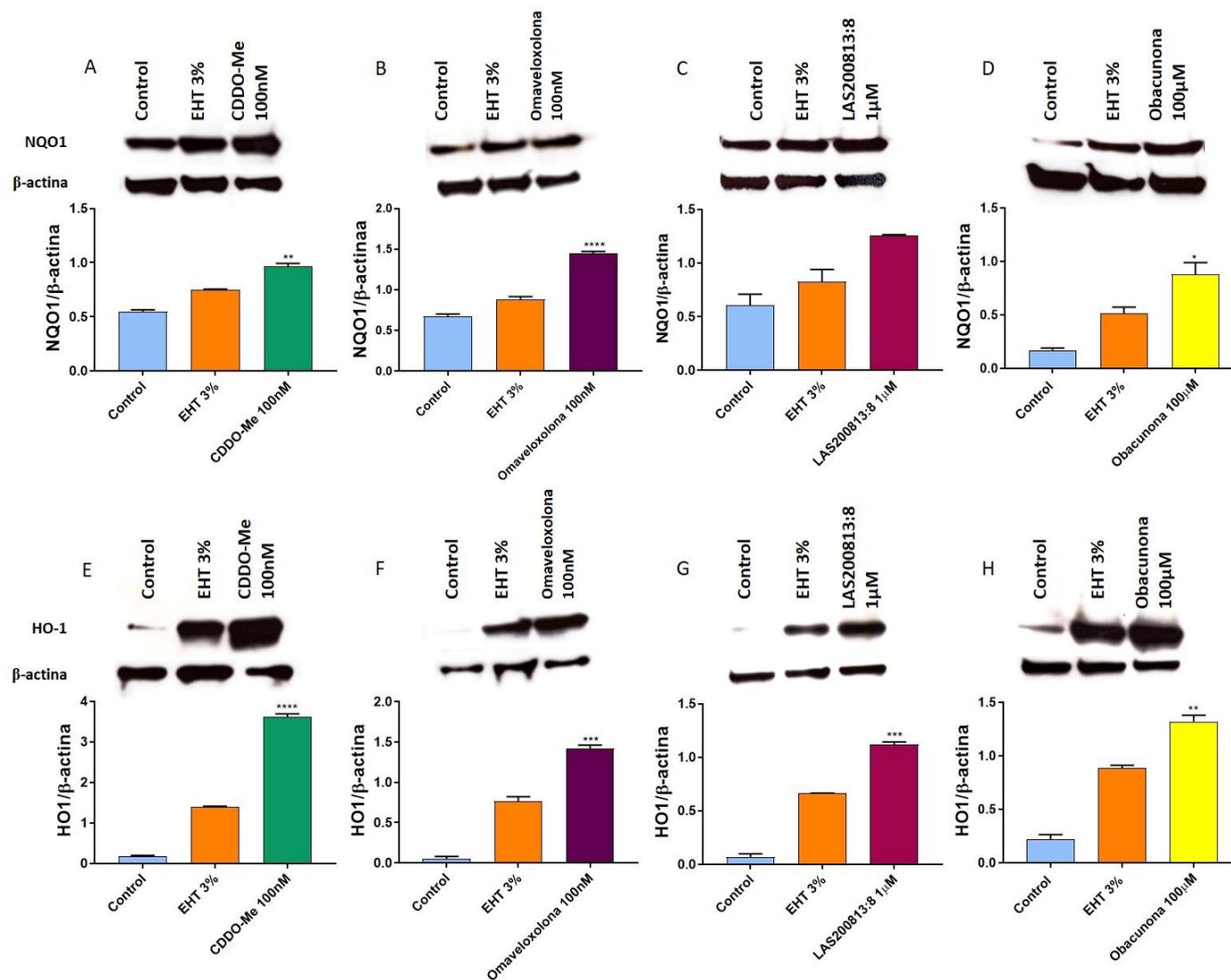


Figura 60. Los fármacos CDDO-Me, omaveloxolona, el péptido LAS200813:8 y el compuesto natural obacunona aumentan la expresión proteica de NQO1 y HO-1 en células epiteliales bronquiales de línea. Las BEAS-2B fueron tratadas con CDDO-Me (100nM) (A y E), omaveloxolona (100nM) (B y F), LAS200813:8 (1μM) (C y G) o obacunona (100μM) (D y H) y estimuladas con EHT 3% durante 48h. Mediante western blot se midieron los niveles de las proteínas NQO1 (NADPH quinona oxidoreductasa 1) (A, B, C y D) y HO-1 (hemoxigenasa 1) (E, F, G y H). Los resultados se expresan como ratio entre la expresión de la proteína de estudio y la expresión proteica del control endógeno β-actina, y se presentan como la media ± SEM de al menos dos experimentos independientes (p=2), con cada condición por triplicado (n=3). Sobre cada una de las gráficas se muestra una imagen representativa de western blot para la proteína en cuestión con el control endógeno β-actina. Las comparaciones fueron analizadas mediante la prueba ANOVA de una vía seguido de un test post hoc de Bonferroni (*, p<0,005 respecto al grupo EHT 3%). *Abreviaturas: EHT: extracto de humo de tabaco*

5.2 Células epiteliales primarias

Tras realizar el estudio de la expresión proteica en células de línea, se procedió a realizar el mismo estudio en células epiteliales bronquiales primarias procedente tanto de sujetos sanos como de pacientes EPOC. Para llevar a cabo este ensayo se siguió el mismo procedimiento que con las BEAS-2B.

Se observó con las células procedentes de sujetos sano resultados muy similares a los observados en las BEAS-2B. Los cuatro fármacos testados, CDDO-Me, omaveloxolona, LAS200813:8 (**Figura 61, A y C**) y obacunona (**Figura 61, B y D**), eran capaces de aumentar los niveles de expresión proteica de forma significativa respecto al grupo EHT. Asimismo, se observó que los niveles de expresión eran prácticamente equivalentes a los obtenidos con las BEAS-2B, por lo que, los niveles de expresión eran muy similares entre las dos proteínas estudiadas, NQO1 y HO-1, aunque, igual que ocurría en las BEAS-2B, los niveles de HO-1 era ligeramente mayores, especialmente cuando las células eran tratadas con CDDO-Me.

Resultados prácticamente equivalentes se encontraron en células epiteliales bronquiales procedentes de pacientes EPOC. De nuevo los cuatro fármacos testados, CDDO-Me, omaveloxolona, LAS200813:8 (**Figura 62, A y C**) y obacunona (**Figura 62, B y D**), incrementaban los niveles de expresión proteica de forma significativa respecto al grupo EHT. Los niveles de expresión obtenidos fueron muy similares a los de las células de línea y entre las dos proteínas, sin embargo los niveles eran ligeramente mayores para la enzima HO-1, especialmente en las células tratadas con CDDO-Me.

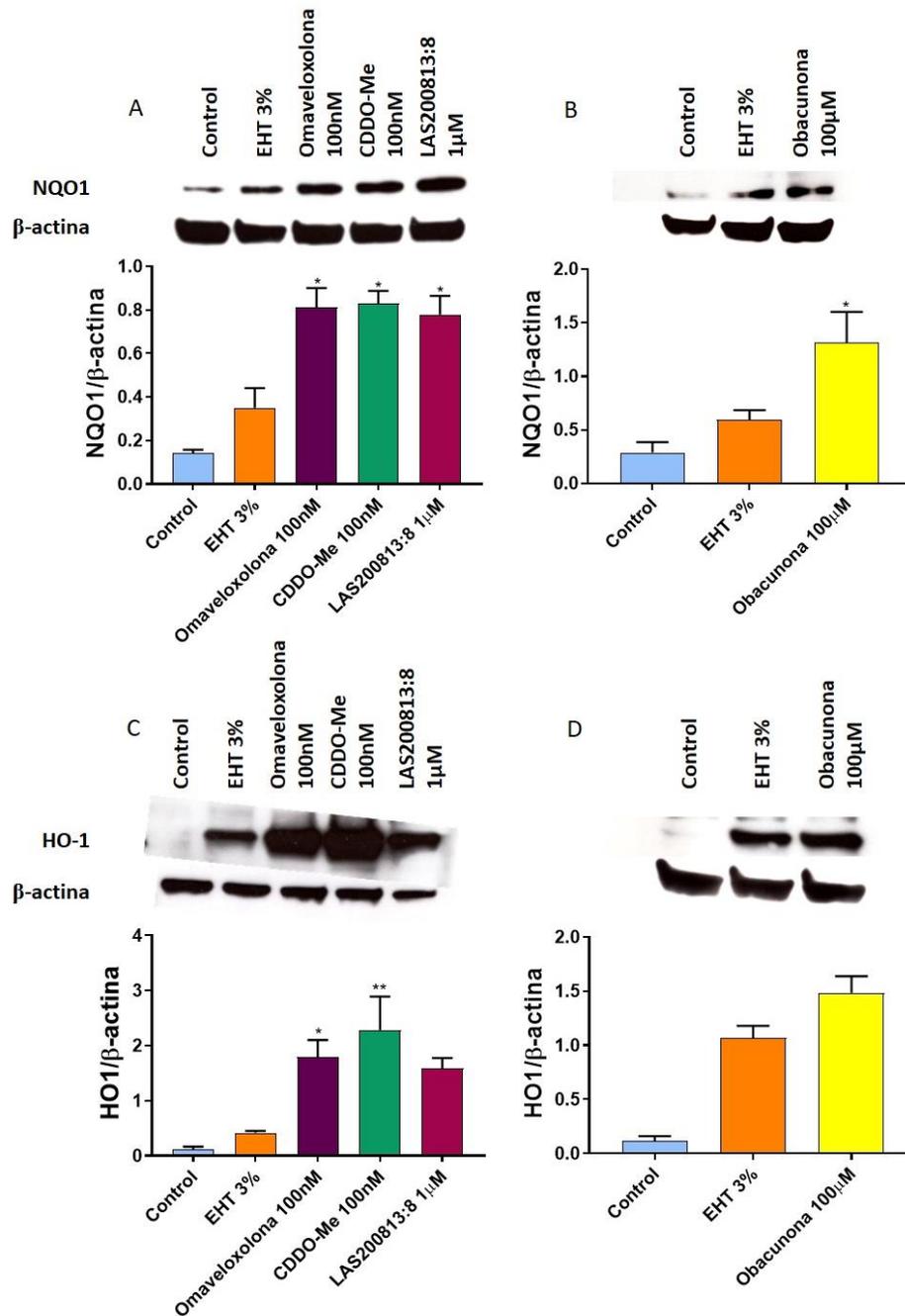


Figura 61. Los fármacos CDDO-Me, omaveloxolona, LAS200813:8 y obacunona aumentan la expresión proteica de NQO1 y HO-1 en células epiteliales bronquiales primarias procedentes de sujetos sano. Las CEBH fueron tratadas con omaveloxolona (100nM) (A y C), omaveloxolona (100nM) (A y C), LAS200813:8 (1µM) (A y C) o obacunona (100µM) (B y D) y estimuladas con EHT 3% durante 48h. Mediante western blot se midieron los niveles de las proteínas NQO1 (NADPH quinona oxidorreductasa 1) (A y B) y HO-1 (hemoxigenasa 1) (C y D). Los resultados se expresan como ratio entre la expresión de la proteína de estudio y la expresión proteica del control endógeno β-actina, y se presentan como la media ± SEM de al menos dos experimentos independientes (p=2), con cada condición por triplicado (n=3). Sobre cada una de las gráficas se muestra una imagen representativa de western blot para la proteína en cuestión con el control endógeno β-actina. Las comparaciones fueron analizadas mediante la prueba ANOVA de una vía seguido de un test post hoc de Bonferroni (*, p<0,005 respecto al grupo EHT 3%) *Abreviaturas: EHT: extracto de humo de tabaco*

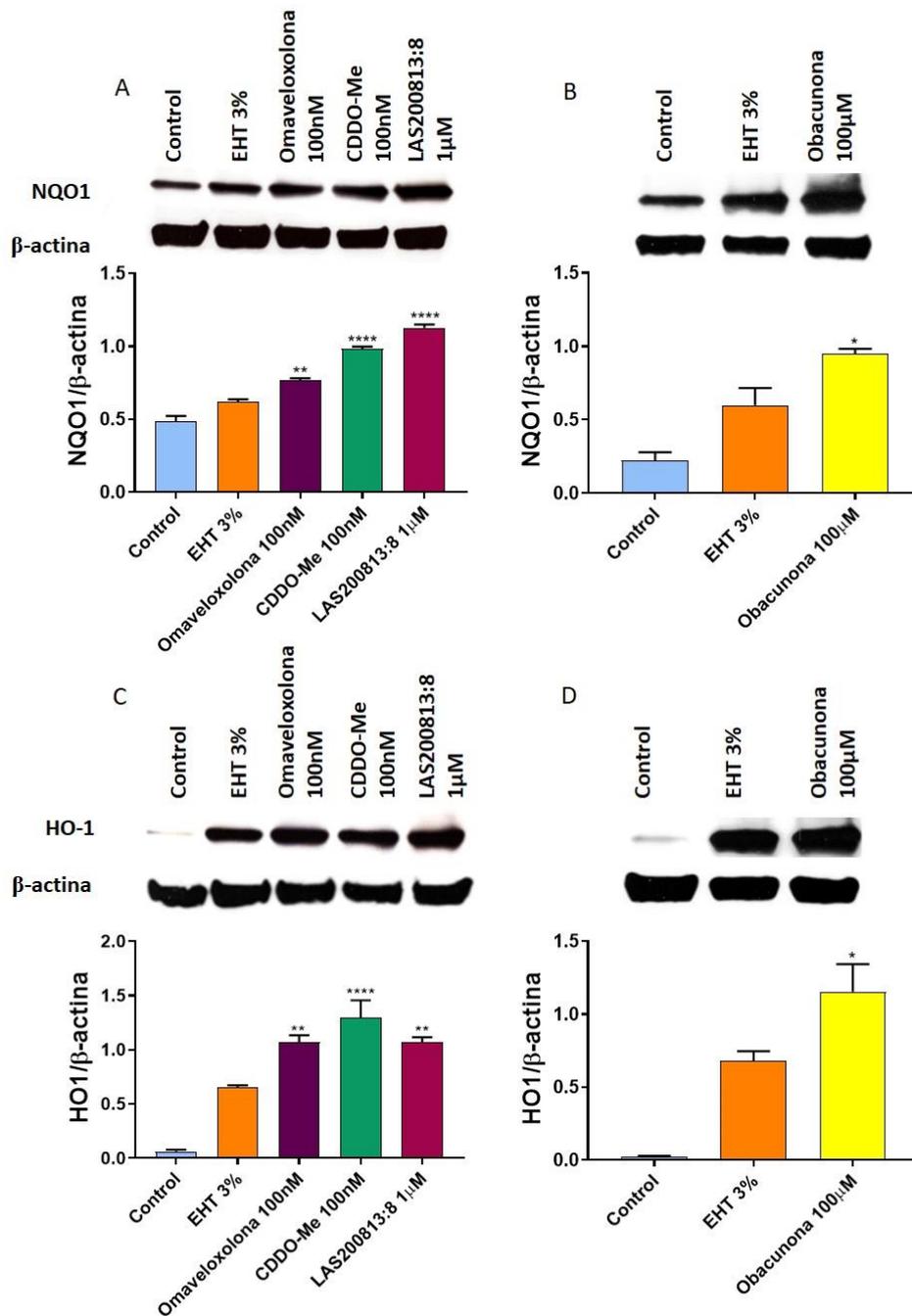


Figura 62. Los fármacos CDDO-Me, omaveloxolona, LAS200813:8 y obacunona aumentan la expresión proteica de NQO1 y HO-1 en células epiteliales bronquiales primarias procedentes de pacientes EPOC. Las CEBH fueron tratadas con omaveloxolona (100nM) (A y C), omaveloxolona (100nM) (A y C), LAS200813:8 (1µM) (A y C) o obacunona (100µM) (B y D) y estimuladas con EHT 3% durante 48h. Mediante western blot se midieron los niveles de las proteínas NQO1 (NADPH quinona oxidoreductasa 1) (A y B) y HO-1 (hemoxigenasa 1) (C y D). Los resultados se expresan como ratio entre la expresión de la proteína de estudio y la expresión proteica del control endógeno β-actina, y se presentan como la media ± SEM de al menos dos experimentos independientes (p=2), con cada condición por triplicado (n=3). Sobre cada una de las gráficas se muestra una imagen representativa de western blot para la proteína en cuestión con el control endógeno β-actina. Las comparaciones fueron analizadas mediante la prueba ANOVA de una vía seguido de un test post hoc de Bonferroni (*, p<0,005 respecto al grupo EHT 3%). *Abreviaturas:* EHT: extracto de humo de tabaco

6. Efecto antiinflamatorio de fármacos activadores de NRF2.

Además de determinar el potencial antioxidantes de los fármacos activadores de NRF2, se buscó determinar su potencial antiinflamatorio. Para ello se determinó la liberación de la interleucina IL-8 y de la metaloproteinasa MMP-9 de forma basal, tras la estimulación con tabaco y tras el tratamiento con los fármacos posterior a la estimulación con EHT.

Estos ensayos ser realizaron en neutrófilos procedentes de sujetos sanos y pacientes EPOC. Asimismo, se realizaron también en células epiteliales bronquiales de línea pero estos resultados no fueron concluyentes ni aportaron información relevante por lo que no se muestran en el presente documento.

6.1 Interleucina 8

Se observó que la liberación de interleucina IL-8 por los neutrófilos es significativamente superior en pacientes EPOC que en sujetos sanos. Además, tras la estimulación con EHT al 3%, los niveles de IL-8 aumentaban en proporciones similares tanto en sujetos sanos como en pacientes EPOC, aunque el aumento es ligeramente mayor en pacientes EPOC (**Figura 63**).

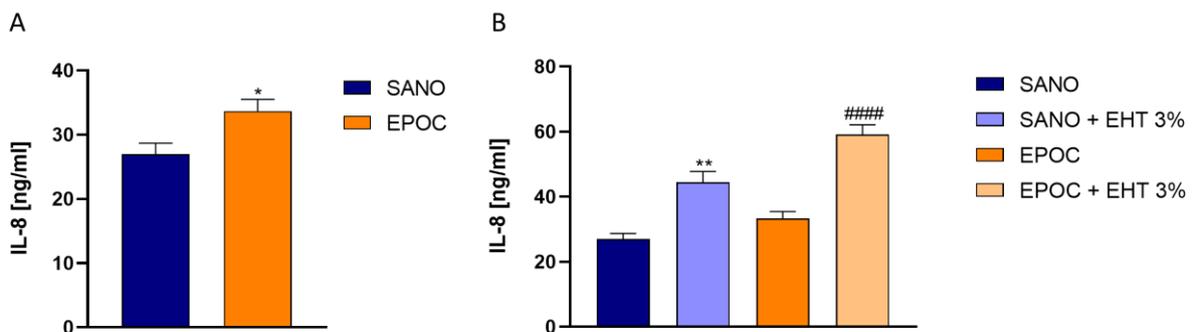


Figura 63. Liberación de interleucina IL-8 basal y tras la estimulación con EHT 3% en neutrófilos de sangre periférica de sujetos sanos y pacientes EPOC. A) Los niveles de IL-8 basales son mayores en pacientes EPOC que en sanos. **B)** La estimulación con EHT 3% aumenta los niveles de IL-8 y lo hace en una proporción similar tanto en sanos como en pacientes EPOC. Los resultados se expresan como la media \pm SEM de al menos tres experimentos independientes ($p=3$), con cada condición por triplicado ($n=3$). Las comparaciones fueron analizadas mediante test de Student o ANOVA de una vía seguido de un test post hoc de Bonferroni (*, # $p<0,005$. *respecto al grupo SANO; # respecto al grupo EPOC) *Abreviaturas: EHT: extracto de humo de tabaco; IL-8: interleucina 8*

Asimismo, se observó que la liberación de metaloproteinasa MMP-9 por los neutrófilos es significativamente mayor en pacientes EPOC que en sujetos sanos. Igual que con la IL-8, los

niveles de MMP-9 aumentaban tras la estimulación con tabaco y lo hacían en proporciones similares tanto en sujetos sanos como en pacientes EPOC (**Figura 64**).

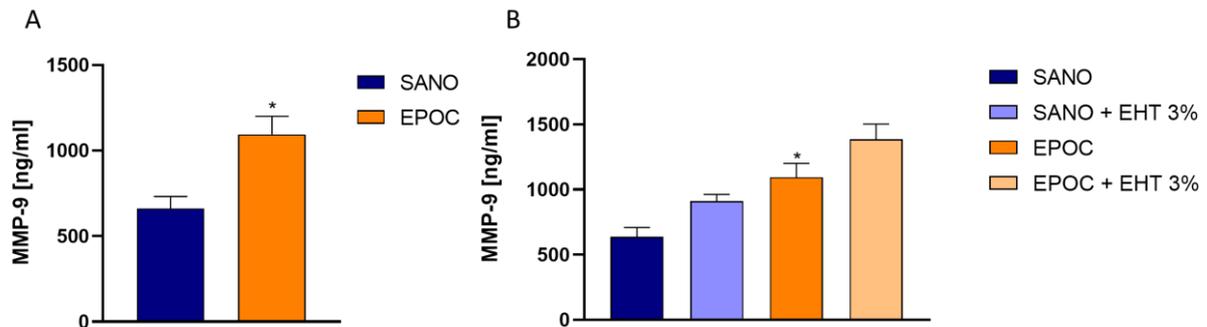


Figura 64. Liberación de metaloproteinasas MMP-9 basal y tras estimulación con EHT 3% en neutrófilos de sangre periférica de sujetos sanos y pacientes EPOC. A) Los niveles de MMP-9 basales son mayores en pacientes EPOC que en sanos. B) La estimulación con EHT 3% aumenta los niveles de MMP-9 y lo hace en una proporción similar tanto en sanos como en pacientes EPOC. Los resultados se expresan como la media \pm SEM de al menos tres experimentos independientes ($p=3$), con cada condición por triplicado ($n=3$). Las comparaciones fueron analizadas mediante test de Student o ANOVA de una vía seguido de un test post hoc de Bonferroni (*, # $p<0,005$. *respecto al grupo SANO; # respecto al grupo EPOC) Abreviaturas: EHT: extracto de humo de tabaco; MMP-9: metaloproteinasas 9

Para poder determinar el potencial antiinflamatorio de los fármacos activadores de NRF2, se analizó la liberación de IL-8 en neutrófilos de sangre periférica procedentes de sujetos sanos y pacientes EPOC. Debido a las características de los neutrófilos y a su corta vida, los experimentos se realizaron el mismo día de la obtención de la sangre periférica. Una vez aislados, los neutrófilos fueron sembrados, tratados con los diferentes fármacos y finalmente estimulados con EHT al 3%. Tras 24h de incubación se recogió el sobrenadante para analizar los niveles de IL-8 mediante la técnica de ELISA.

Se observó en todos los casos, que la estimulación con EHT al 3% generaba un aumento de la liberación de IL-8 respecto a la condición control, tanto en neutrófilos procedentes de sujetos sanos como de pacientes EPOC. Los neutrófilos tratados con CDDO-Me mostraron que el fármaco era capaz de prevenir el incremento de IL-8, y esta inhibición era mayor conforme aumentaba la concentración de fármaco. Sin embargo, para alcanzar niveles equivalentes al control, se necesitó la concentración más elevada, $1\mu\text{M}$, que es relativamente alta tratándose de un fármaco electrofílico. Esto ocurría tanto en neutrófilos de sujetos sanos (**Figura 65 A**) y de pacientes EPOC (**Figura 65 E**). Resultados similares se encontraron en los neutrófilos tratados con omaveloxolona. De nuevo, tanto en neutrófilos procedentes de sujetos sanos (**Figura 65, B**)

y de pacientes EPOC (**Figura 65, F**), el fármaco era capaz de prevenir la liberación de IL-8 generada por la estimulación con EHT 3%. En este caso, también, la disminución en los niveles de IL-8 eran inversamente proporcionales a la concentración de fármaco, pero solo llegando a niveles IL-8 similares al control con la concentración más elevada de omaveloxolona, que igual que en el caso de la CDDO-Me es relativamente alta.

Los neutrófilos de sujetos sanos (**Figura 65, C**) como de pacientes EPOC (**Figura 65, G**) tratados con el compuesto peptídico LAS200813:8, mostraron que el fármaco prevenía la liberación IL-8 generada por la estimulación con EHT al 3%. Igual que en los otros casos, a mayor concentración, menores niveles de IL-8. Para alcanzar niveles equivalentes a los del control, se necesitó una concentración relativamente elevada.

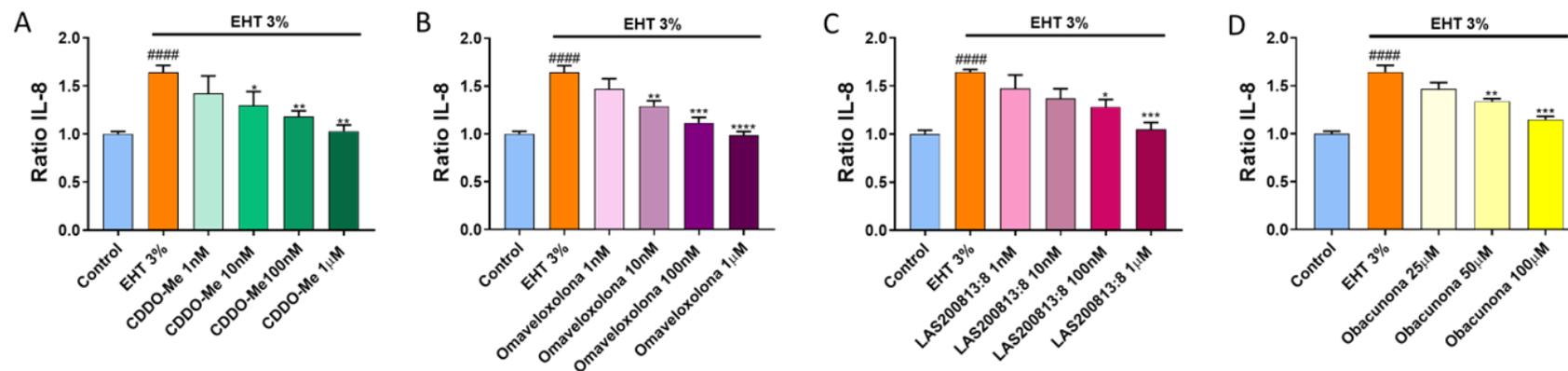
Por último, se observó que el compuesto natural obacunona también prevenía la liberación de IL-8 generada por el EHT 3% en neutrófilos procedentes de sujetos sanos (**Figura 65, D**) y de pacientes EPOC (**Figura 65, H**). Y aunque la inhibición de la liberación de IL-8 era mayor conforme aumentaba la concentración de fármaco, el efecto era menor que el resto de los fármacos, cosa que no ocurría en el resto de los ensayos, donde la obacunona era uno de los fármacos con mayores efectos.

6.2 Metaloproteinasa 9

Además del análisis de la liberación de IL-8 para determinar el potencial antiinflamatorio de los fármacos activadores de NRF2, también se estudió la liberación de la metaloproteinasa MMP-9 en neutrófilos de sangre periférica procedentes tanto de sujetos sanos como de pacientes EPOC. Se siguió el mismo procedimiento empleado que para la medición de la IL-8.

Igual que en el caso de la IL-8, la estimulación con EHT al 3% generaba un aumento de la liberación de MMP-9 respecto a la condición control. Aunque el aumento de la liberación respecto al control era menor en comparación a la IL-8. Se observó que los fármacos CDDO-Me (**Figura 66, A y E**), omaveloxolona (**Figura 66, B y F**), el péptido LAS200813:8 (**Figura 66, C y G**) y el compuesto natural obacunona (**Figura 66 D y H**) eran capaces de inhibir la liberación de MMP-9, tanto en neutrófilos procedentes de sujetos sanos como de pacientes EPOC. Sin embargo, se observó, también, que se requerían mayores concentraciones de fármaco para conseguir diferencias significativas en neutrófilos procedentes de sujetos sanos que en neutrófilos procedentes de pacientes EPOC. Por lo que, los fármacos presentaban mayores efectos en las células procedentes de los pacientes EPOC.

SUJETOS SANOS



PACIENTES EPOC

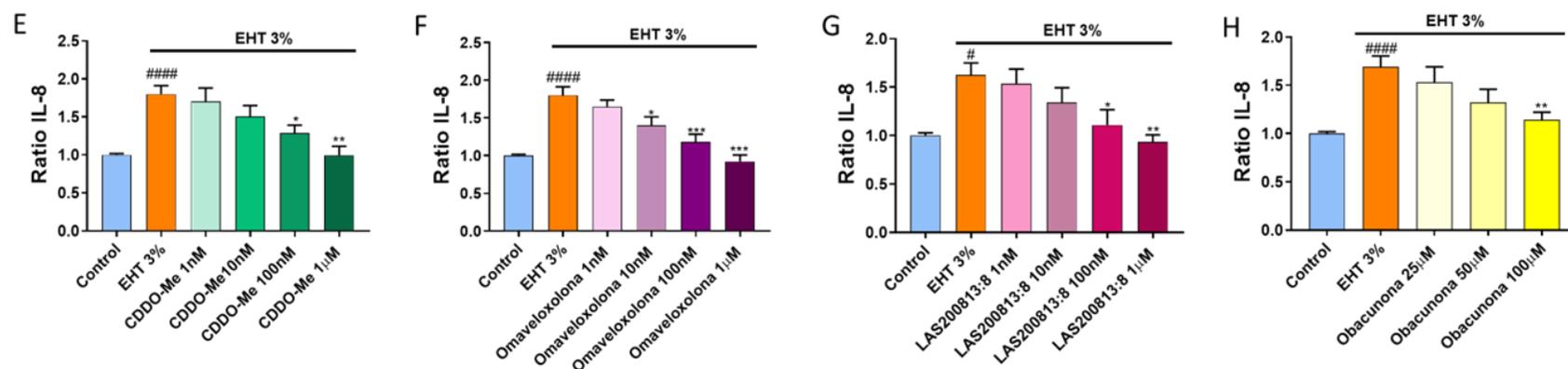
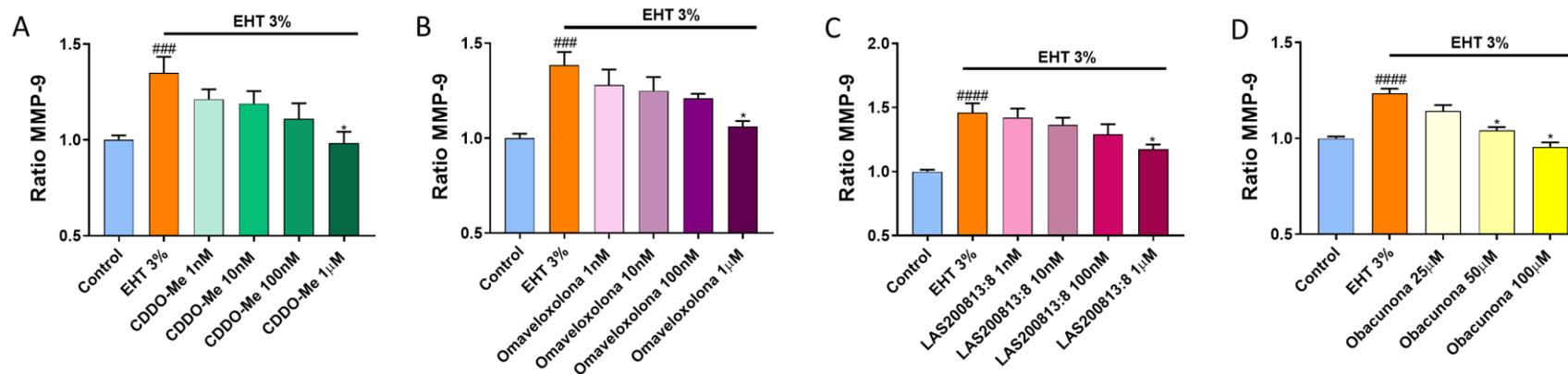


Figura 65. Los fármacos CDDO-Me, omapixeloxolona, LAS200813:8 y obacunona disminuyen la liberación de interleucina IL-8 en neutrófilos de sangre periférica de sujetos sanos y pacientes EPOC. Los neutrófilos fueron tratados con CDDO-Me (1nM – 1μM) (A y E), omapixeloxolona (1nM – 1μM) (B y F), LAS200813:8 (1nM – 1μM) (C y G) o obacunona (25μM – 100μM) (D y H) y estimulados con EHT 3% durante 24h. Tras el período de incubación se determinaron los niveles de IL-8 mediante técnica de ELISA. Los resultados se expresan como el ratio de IL-8 respecto al control y se presentan como la media ± SEM de al menos tres experimentos independientes (p=3), con cada condición por triplicado (n=3). Las comparaciones fueron analizadas mediante la prueba ANOVA de una vía seguido de un test post hoc de Bonferroni (*, p<0,005 respecto al grupo EHT 3%, #, respecto al grupo control). *Abreviaturas: EHT: extracto de humo de tabaco; IL-8: interleucina*

SUJETOS SANOS



PACIENTES EPOC

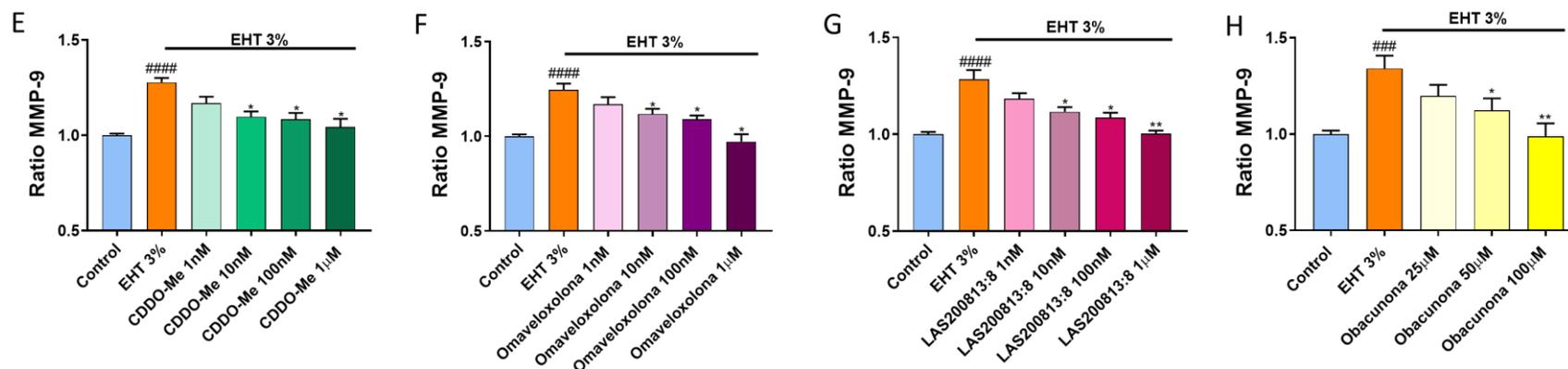


Figura 66. Los fármacos CDDO-Me, omaveloxolona, LAS200813:8 y obacunona disminuyen la liberación de proteasa MMP-9 en neutrófilos de sangre periférica de sujetos sanos y pacientes EPOC. Los neutrófilos fueron tratados con CDDO-Me (1nM – 1µM) (A y E), omaveloxolona (1nM – 1µM) (B y F), LAS200813:8 (1nM – 1µM) (C y G) o obacunona (25µM – 100µM) (D y H) y estimulados con EHT 3% durante 24h. Tras el período de incubación se determinaron los niveles de MMP-9 mediante técnica de ELISA. Los resultados se expresan como el ratio de MMP-9 respecto al control y se presentan como la media ± SEM de al menos tres experimentos independientes (p=3), con cada condición por triplicado (n=3). Las comparaciones fueron analizadas mediante la prueba ANOVA de una vía seguido de un test post hoc de Bonferroni (*, p<0,005 respecto al grupo EHT 3%, # respecto al grupo control). *Abreviaturas: EHT: extracto de humo de tabaco; MMP-P: metaloproteína 9.*

7. Inhibición de la muerte celular por los fármacos activadores NRF2

Una vez determinados el potencial antioxidante y antiinflamatorio, se procedió a determinar la capacidad de los fármacos activadores en la inhibición de la muerte celular. Para ello, se analizó la viabilidad celular mediante MTT y la apoptosis mediante citometría de flujo.

Las células epiteliales bronquiales de línea fueron tratadas con los diferentes fármacos y estimuladas con EHT al 5% durante 6h. Tras el tiempo transcurrido, se determinó la viabilidad celular mediante MTT. Se observó que el estímulo con tabaco reducía la viabilidad en un 50% y que los fármacos eran capaces de prevenir la muerte celular, especialmente a las mayores concentraciones empleadas (datos no mostrados).

Asimismo, para determinar el potencial antiapoptótico de los fármacos, las células epiteliales bronquiales primarias y de línea, las células fueron tratadas con los diferentes fármacos durante 24h, tras las que se estimularon con EHT al 8.5% durante 24h más. Tras este tiempo se procedió a la determinación de las células apoptóticas por citometría de flujo mediante el kit de Annexina e yoduro de propidio. Además, se determinó la CI50 para cada uno de los casos (**Tabla 22**).

7.1 Células epiteliales bronquiales de línea y primarias

En todas las células ensayadas se observó que la estimulación con EHT producía un aumento significativo del porcentaje de células apoptóticas, representado por un aumento en el ratio de apoptosis respecto al control. Sin embargo, este aumento era mayor en las células de línea. Asimismo, se comprobó que los fármacos eran capaces de inhibir de forma significativa el proceso de apoptosis en todos los tipos celulares ensayados y que, además, esta inhibición era dosis dependiente.

En el caso de las BEAS-2B ningún fármaco fue capaz de llegar a niveles del control, pero seguramente esto es debido al gran aumento en los niveles de apoptosis tras la estimulación con EHT. En este tipo celular, la CDDO-Me obtuvo un CI50 de 7,36nM, la omaveloxolona de 32nM, el péptido LAS200813:8 de 57nM y la obacunona de 72μM (**Figura 67**). Todos ellos presentaron perfiles similares, pero en el caso del péptido y la obacunona, se necesitaron concentraciones más elevadas para conseguir efectos significativos, cosa que difería con el resto de ensayos, donde la obacunona solía ser el fármaco de mayor efecto.

Por otro lado, en el caso de las células epiteliales bronquiales primarias, tanto procedentes de sujetos sanos como de pacientes EPOC, la estimulación con EHT generaba un aumento de la

apoptosis, pero no tan pronunciado como en el caso de las BEAS-2B. Esto se debe, seguramente, a que al tratarse de células primarias su manejo de per se ya genera muerte celular. En este caso, sin embargo, los fármacos fueron capaces de inhibir el proceso de apoptosis llegando incluso a niveles equivalentes a los de los controles. Así pues, en las células procedentes de sujetos sanos la IC50 de la CDDO-Me fue de 8,8nM; el de la omaveloxolona de 4,4nM; el del péptido LAS200813:8 de 58nM; y el de la obacunona de 49μM (**Figura 68**). A diferencia de las BEAS-2B, en las células de sujetos sanos, la obacunona era el fármaco con mayor efecto, ya que conseguía alcanzar niveles por debajo de los controles. Sin embargo, siempre, teniendo en cuenta que las concentraciones utilizadas son mucho mayores que en el resto de fármacos al tratarse de un compuesto natural.

Por último, en el caso de las células procedentes de pacientes EPOC, la CDDO-Me presentó una CI50 de 16nM, muy similar al de la omaveloxolona que fue de 17nM. El péptido LAS200813:8 mostró, en este caso, una CI50 de 9nM, menor que en los otros tipos celulares. Y por último, el compuesto natural obacunona tuvo una CI50 de 52μM, similar al obtenido en células sanas, pero menor comparado a las BEAS-2B (**Figura 69**). En estas células, tanto la CDDO-Me como la obacunona lograban alcanzar niveles de apoptosis menores a los de los controles, sin embargo en el caso de la CDDO-Me la CI50 era mayor que en las otras células. De nuevo, en el caso de la obacunona, las concentraciones empleadas para conseguir estos efectos eran mucho mayores debido a su origen natural.

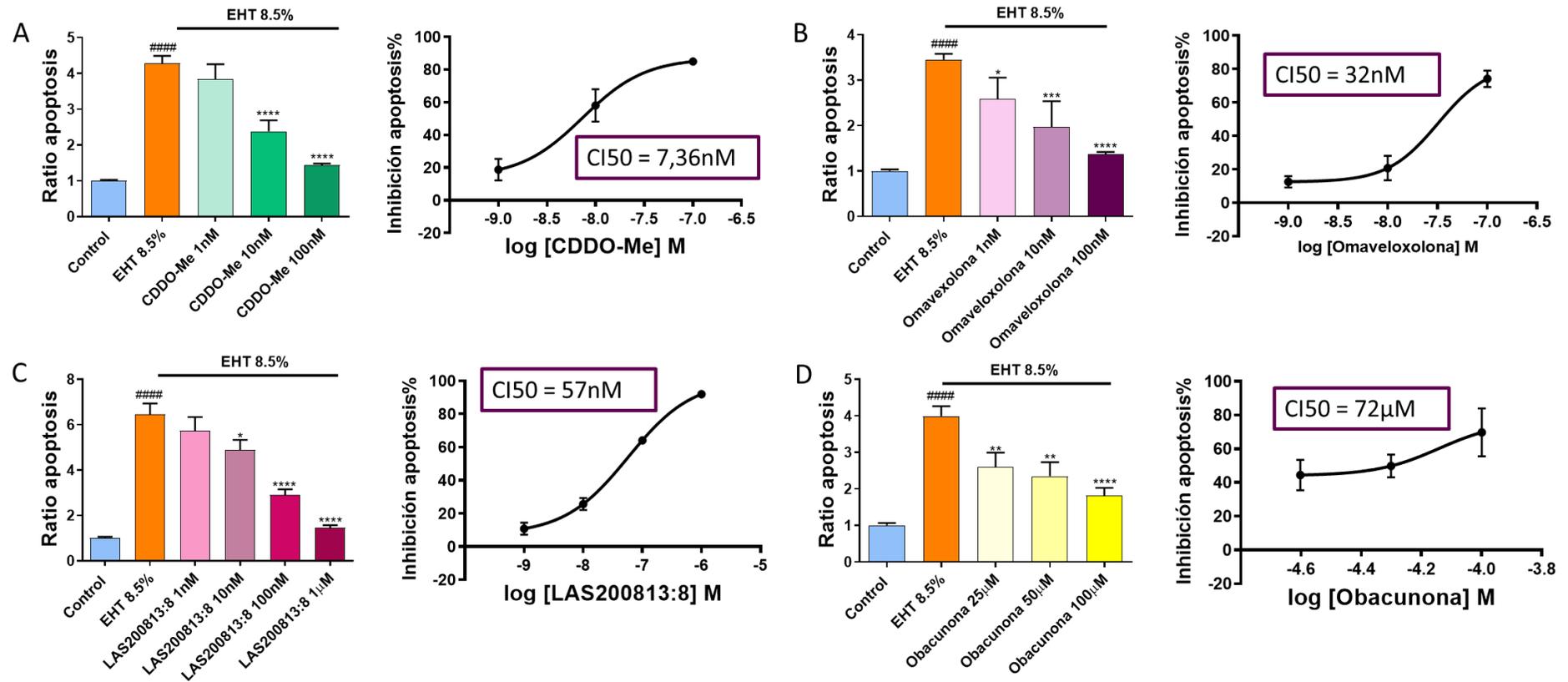


Figura 67. El tratamiento con los compuestos CDDO-Me, omaveloxolona, el péptido LAS200813:8 y obacunona es capaz de inhibir el proceso de apoptosis generado por la estimulación con EHT 8.5% en BEAS-2B. Las BEAS-2B se trataron con los compuestos CDDO-Me (1nM a 100nM) (A), omaveloxolona (1nM a 100nM) (B), péptido LAS2008:13 (1nM a 1µM) (C), y obacunona (25µM a 100µM) (D) durante 24h y se estimularon posteriormente con EHT 8.5% durante 24h más. Tras el período de incubación se determinó el porcentaje de células apoptóticas o necróticas por citometría de flujo. Se calculó la CI50. Los resultados de la izquierda expresan el ratio del nivel de apoptosis respecto al control y se presentan como la media \pm SEM. Los resultados de la derecha representan la regresión no-lineal para el cálculo de la CI50. Se realizaron al menos dos experimentos independientes ($p=2$), con cada condición por triplicado ($n=3$). Las comparaciones fueron analizadas mediante la prueba ANOVA de una vía seguido de un test post hoc de Bonferroni (*, # $p<0,005$. # respecto al grupo Control; * respecto al grupo EHT 8.5%). *Abreviaturas:* CI50: concentración inhibidora 50; EHT: extracto de humo de tabaco.

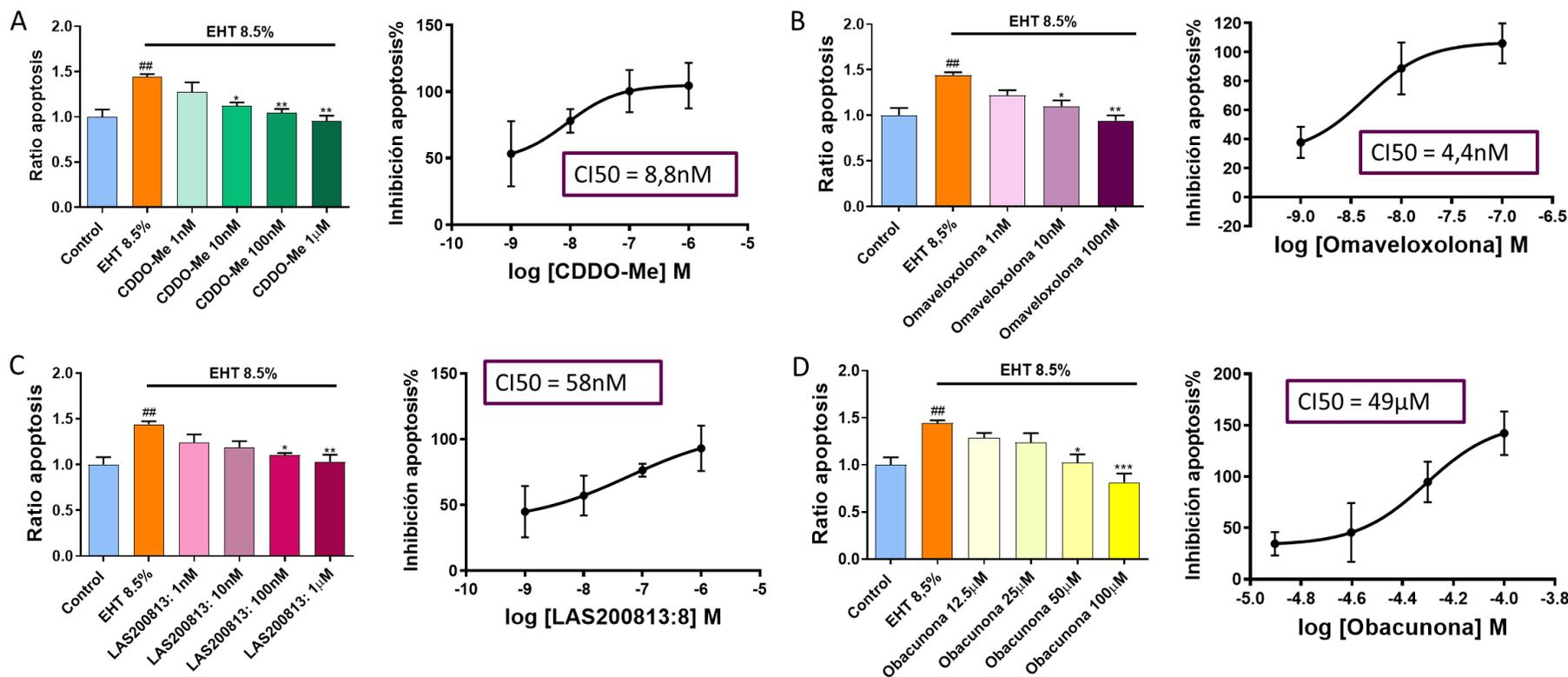


Figura 68. El tratamiento con los compuestos CDDO-Me, omaveloxolona, el péptido LAS200813:8 y obacunona es capaz de inhibir el proceso de apoptosis generado por la estimulación con EHT 8.5% en células epiteliales bronquiales procedentes de sujetos sanos. Las CEBH se trataron con los compuestos CDDO-Me (1nM a 1µM) (A), omaveloxolona (1nM a 100nM) (B), péptido LAS2008:13 (1nM a 1µM) (C), y obacunona (12,5µM a 100µM) (D) durante 24h y se estimularon posteriormente con EHT 8.5% durante 24h más. Tras el período de incubación se determinó el porcentaje de células apoptóticas o necróticas por citometría de flujo. Se calculó la CI50. Los resultados de la izquierda expresan el ratio del nivel de apoptosis respecto al control y se presentan como la media ± SEM. Los resultados de la derecha representan la regresión no-lineal para el cálculo de la CI50. Se realizaron al menos dos experimentos independientes (p=2), con cada condición por triplicado (n=3). Las comparaciones fueron analizadas mediante la prueba ANOVA de una vía seguido de un test post hoc de Bonferroni (*, # p<0,005. # respecto al grupo Control; # respecto al grupo EHT 8.5%). Abreviaturas: CI50: concentración inhibitoria 50; EHT: extracto de humo de tabaco.

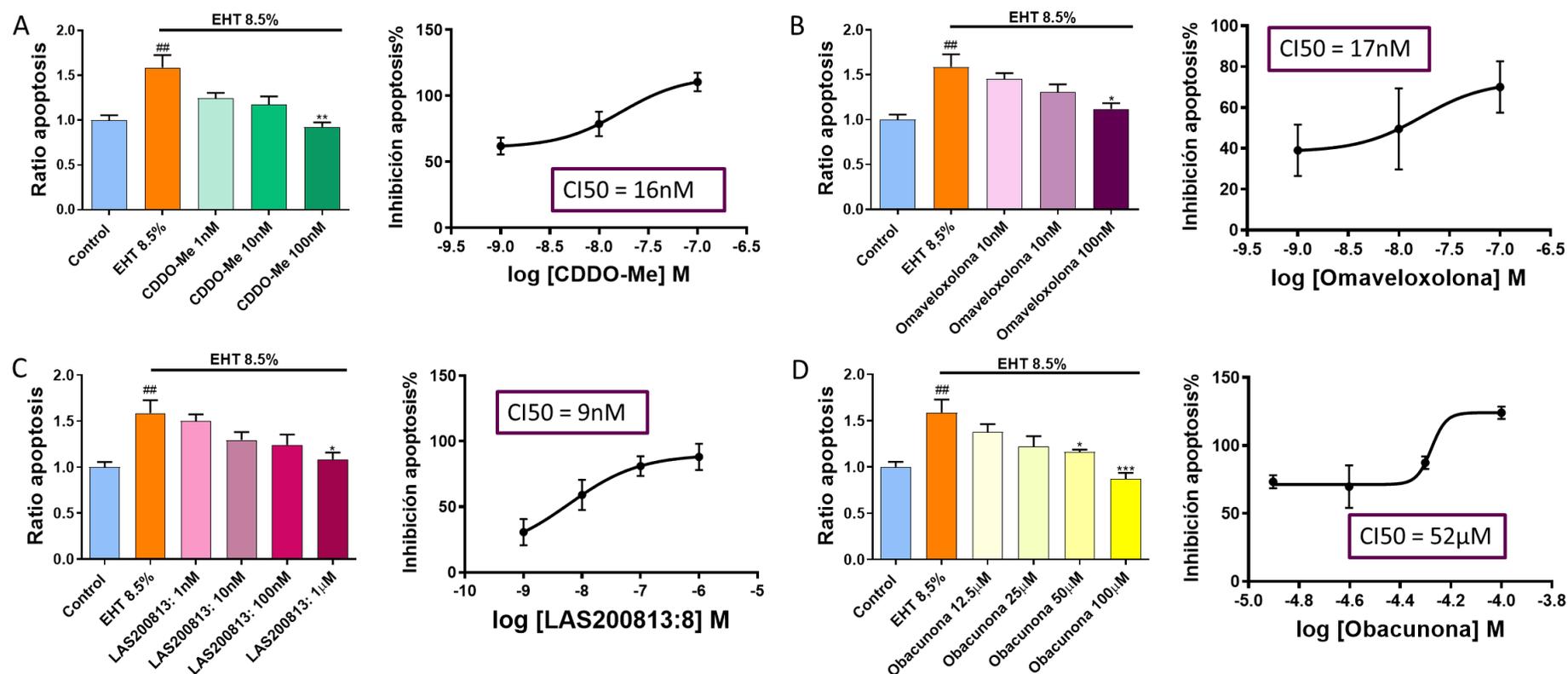


Figura 69. El tratamiento con los compuestos CDDO-Me, omaveloxolona, el péptido LAS200813:8 y obacunona es capaz de inhibir el proceso de apoptosis generado por la estimulación con EHT 8.5% en células epiteliales bronquiales procedentes de pacientes EPOC. Las CEBH se trataron con los compuestos CDDO-Me (1nM a 100nM) (A), omaveloxolona (1nM a 100nM) (B), péptido LAS2008:13 (1nM a 1μM) (C), y obacunona (12,5μM a 100μM) (D) durante 24h y se estimularon posteriormente con EHT 8.5% durante 24h más. Tras el período de incubación se determinó el porcentaje de células apoptóticas o necróticas por citometría de flujo. Se calculó la CI50. Los resultados de la izquierda expresan el ratio del nivel de apoptosis respecto al control y se presentan como la media \pm SEM. Los resultados de la derecha representan la regresión no-lineal para el cálculo de la CI50. Se realizaron al menos dos experimentos independientes ($p=2$), con cada condición por triplicado ($n=3$). Las comparaciones fueron analizadas mediante la prueba ANOVA de una vía seguido de un test post hoc de Bonferroni (*, # $p<0,005$. # respecto al grupo Control; # respecto al grupo EHT 8.5%). *Abreviaturas:* CI50: concentración inhibitoria 50; EHT: extracto de humo de tabaco.

Tabla 22. CI50 en los niveles de apoptosis de los fármacos activadores de NRF2, los electrofílicos CDDO-Me y omaveloxolona, el péptido LAS200813:8 y el compuesto natural obacunona en epiteliales de línea y primarias.

	Fármaco	CI50 BEAS-2B	CI50 Primarias SANO	CI50 Primarias EPOC
ELECTROFÍLICOS	CDDO-Me	7,36nM	8,8nM	16nM
	Omaveloxolona	32nM	4,4nM	17nM
PÉPTIDO	LAS200813:8	57nM	58nM	9nM
NATURAL	Obacunona	72µM	49µM	52µM

8. Translocación al núcleo de NRF2

Para confirmar la translocación al núcleo del factor NRF2 derivada del tratamiento con los activadores, se estudió la expresión y localización de NRF2 en células epiteliales bronquiales, tanto de línea como primarias procedentes de sujetos sanos y pacientes EPOC. Para ello las células fueron tratadas con los diferentes fármacos e incubadas 24h, tras este tiempo se realizaron ensayos de inmunofluorescencia. Para este estudio las células no fueron tratadas con tabaco porque se buscaba estudiar el efecto per se de los fármacos en la translocación hacia el núcleo de NRF2, sin verse condicionada por el efecto del tabaco, que como se ha visto genera ya de por sí una activación de NRF2.

Se observó, tal como se puede ver en las imágenes de las **Figuras 70, 71 y 72**, que los fármacos activadores generaban la translocación de NRF2 al núcleo. La expresión de NRF2 se encuentra principalmente en el citoplasma de la célula, pero tras la estimulación con los diferentes fármacos, se puede ver que también hay expresión en el núcleo, y que la expresión en general es más intensa, lo que indica no solo una translocación al núcleo de NRF2, sino también un aumento de la expresión.

8.1 Células epiteliales bronquiales de línea y primarias

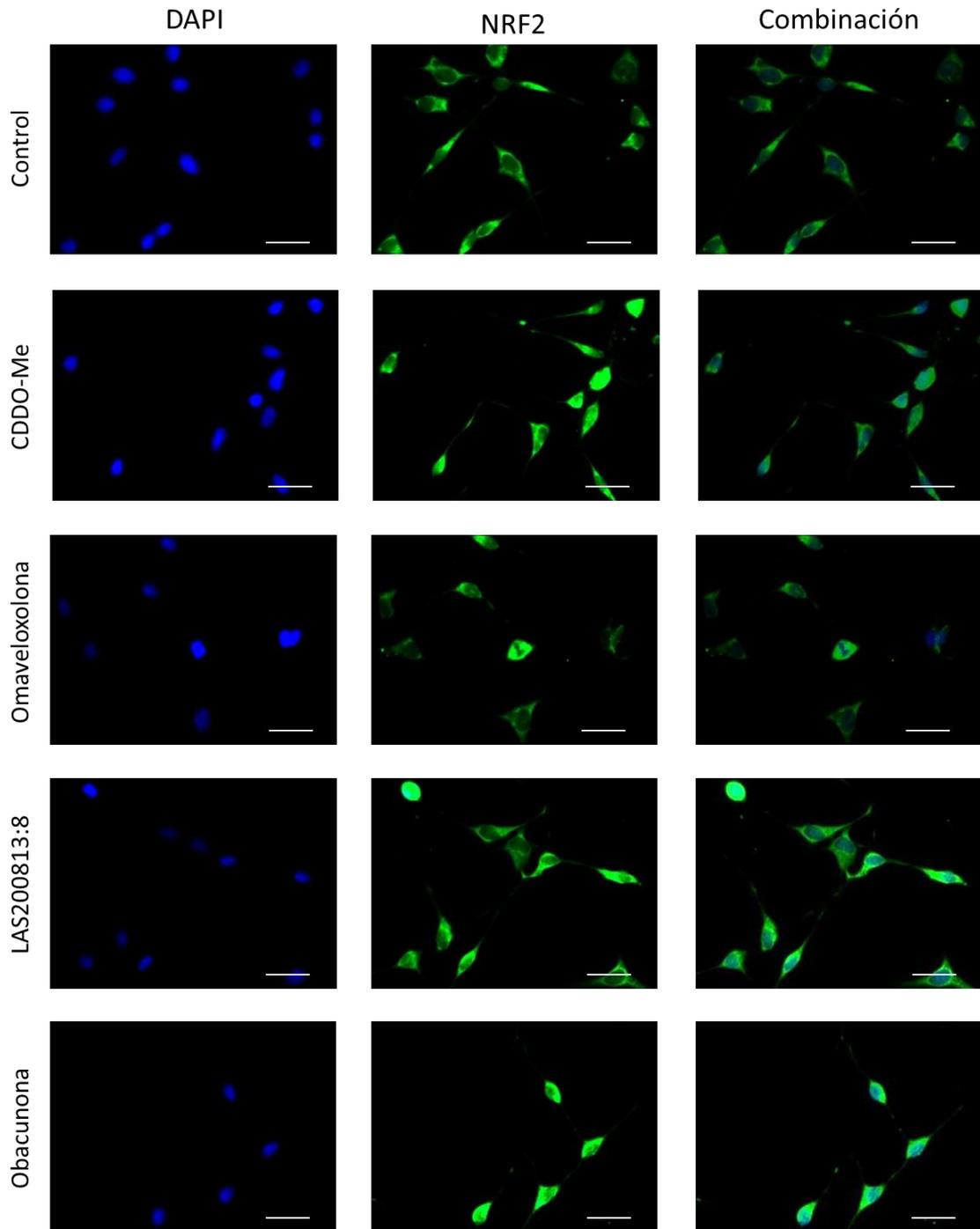


Figura 70. El tratamiento con los compuestos CDDO-Me, omaveloxolona, el péptido LAS200813:8 y obacunona genera la translocación de NRF2 al núcleo en células epiteliales bronquiales de línea.. Las BEAS-2B se trataron con los compuestos CDDO-Me (100nM), omaveloxolona (100nM), péptido LAS2008:13 (1 μ M) y obacunona (100 μ M) (D) y se incubaron 24h. Tras el período de incubación se realizaron los ensayos de inmunofluorescencia para estudiar la expresión de NRF2 (factor nuclear eritroide 2). Se realizaron al menos dos experimentos independientes ($p=2$), con cada condición por duplicado ($n=2$). La escala representan 100 μ M.

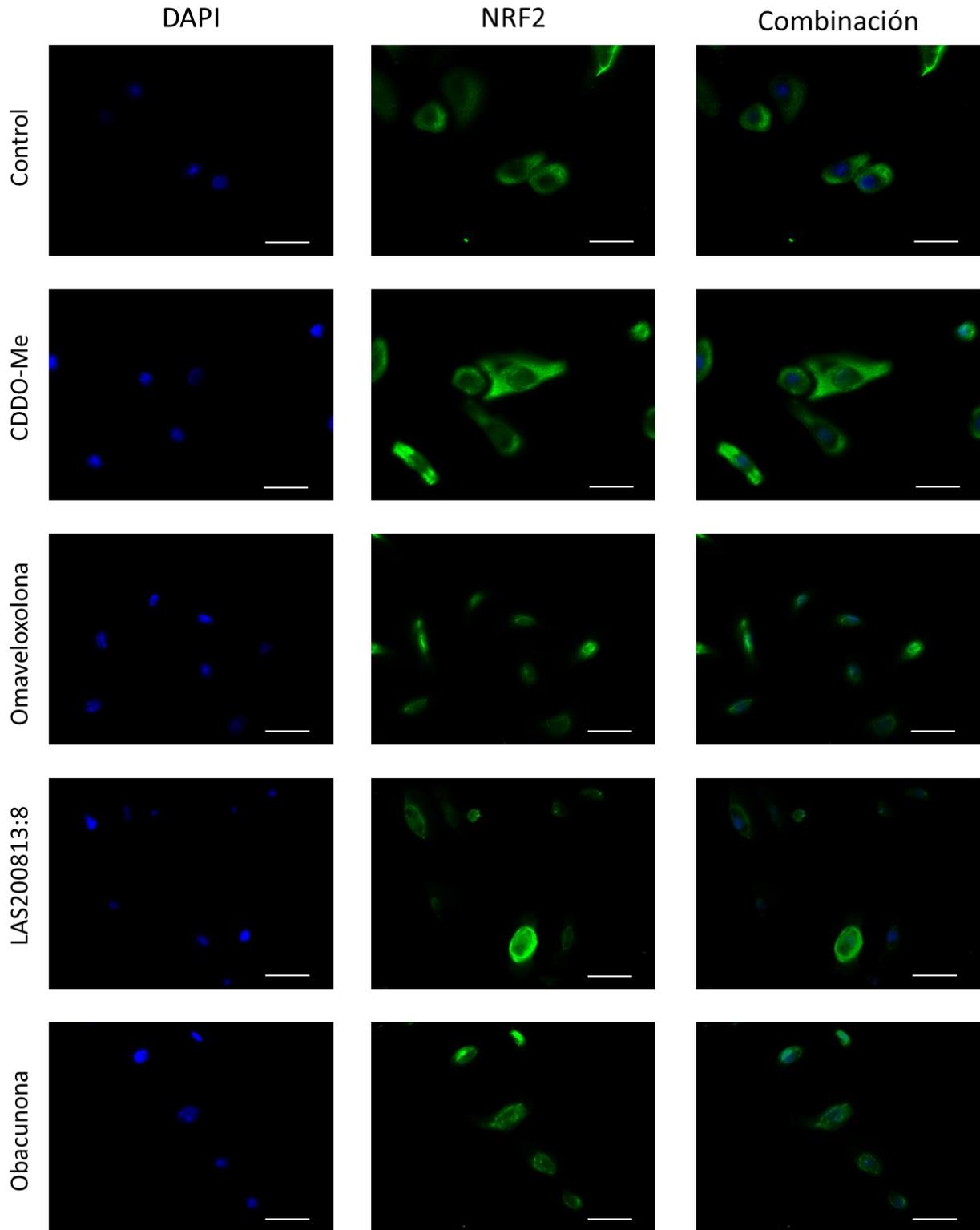


Figura 71. El tratamiento con los compuestos CDDO-Me, omaveloxolona, el péptido LAS200813:8 y obacunona genera la translocación de NRF2 al núcleo en células epiteliales bronquiales procedentes de sujetos sanos. Las CEBH se trataron con los compuestos CDDO-Me (100nM), omaveloxolona (100nM), péptido LAS2008:13 (1 μ M) y obacunona (100 μ M) (D) y se incubaron 24h. Tras el período de incubación se realizaron los ensayos de inmunofluorescencia para estudiar la expresión de NRF2 (factor nuclear eritroide 2). Se realizaron al menos dos experimentos independientes ($p=2$), con cada condición por duplicado ($n=2$). La escala representan 100 μ M.

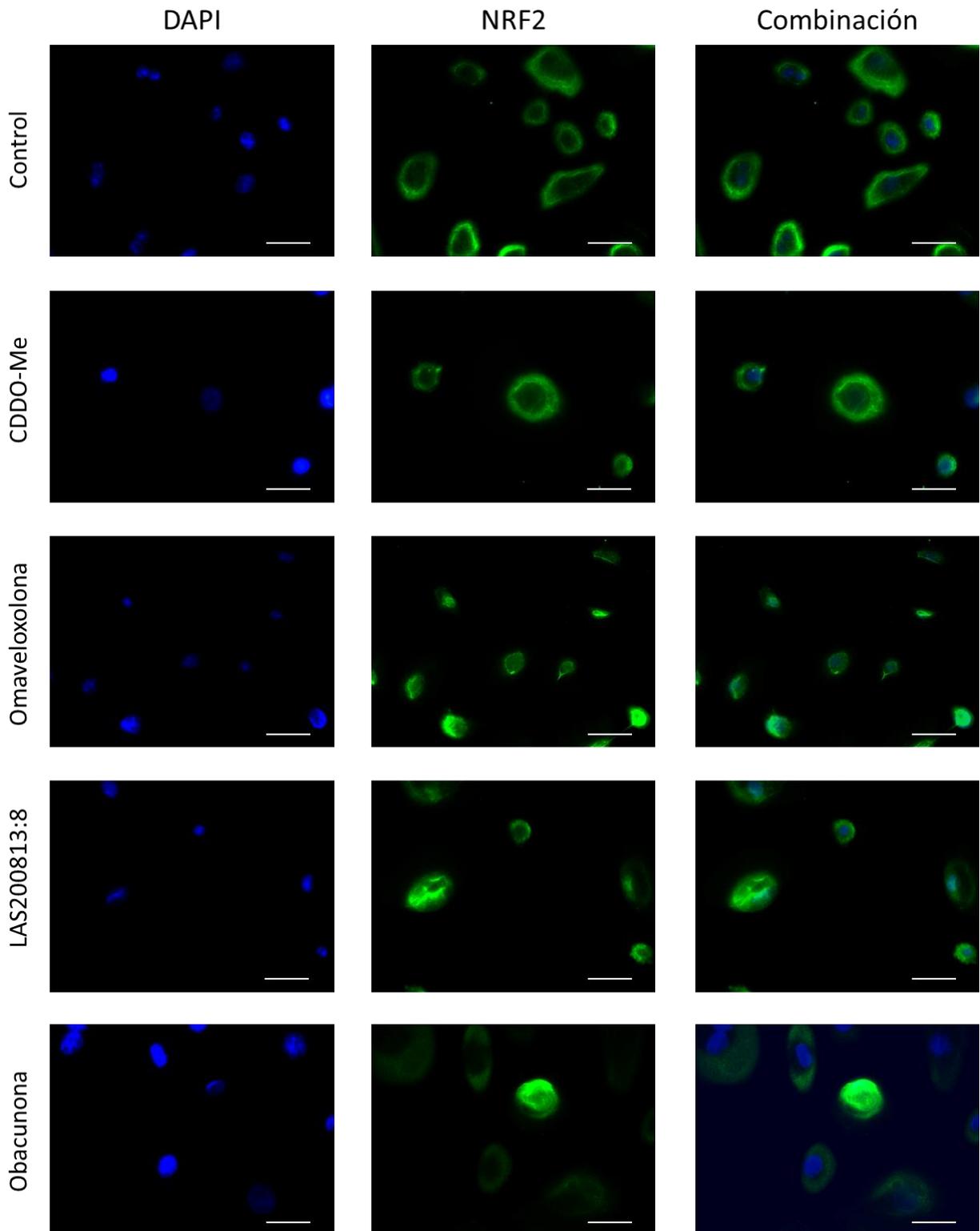


Figura 72. El tratamiento con los compuestos CDDO-Me, omaveloxolona, el péptido LAS200813:8 y obacunona genera la translocación de NRF2 al núcleo en células epiteliales bronquiales procedentes de pacientes EPOC. Las CEBH se trataron con los compuestos CDDO-Me (100nM), omaveloxolona (100nM), péptido LAS2008:13 (1 μ M) y obacunona (100 μ M) (D) y se incubaron 24h. Tras el período de incubación se realizaron los ensayos de inmunofluorescencia para estudiar la expresión de NRF2 (factor nuclear eritroide 2). Se realizaron al menos dos experimentos independientes (p=2), con cada condición por duplicado (n=2). La escala representan 100 μ M.

9. Modelo murino de inflamación pulmonar aguda inducido por instilación intratraqueal de LPS

Una vez conocido los efectos de los activadores de NRF2 estudiados en esta tesis en modelos *in vitro*, se decidió determinar el potencial antiinflamatorio y antioxidantes de estos fármacos *in vivo*. Para ello, se utilizó un modelo murino de inflamación pulmonar aguda por instilación intratraqueal de LPS, que simula los episodios de exacerbación comunes en la EPOC.

9.1 Validación del modelo murino de inflamación pulmonar aguda

El modelo *in vivo* de inducción de inflamación pulmonar por LPS, es un modelo ampliamente estandarizado que ha sido descrito en multitud de publicaciones científicas, tanto en ratón como en otros roedores como rata y hámster^{295,296,466-473}, lo que avala la metodología empleada en esta tesis.

Para este modelo, a los ratones se les administró los diferentes activadores de NRF2 y roflumilast como control, ya que se conoce por estudios publicados previamente su acción antiinflamatoria⁴⁷⁴, 48h, 24h y 1h antes de la instilación de LPS. A las 48h tras la primera administración de los fármacos, a los ratones se les realizó la instilación intratraqueal de LPS (5mg/kg) para exacerbar la respuesta inflamatoria pulmonar. Tras 24h de la instilación de LPS se procedió a la eutanasia de todos los ratones para la evaluación de distintos parámetros moleculares.

A pesar de ser un modelo sobradamente estandarizado y validado, para cada ensayo se comprobó que se alcanzaba el estado de inflamación pulmonar en los ratones instilados con LPS y que existían diferencias respecto al grupo control. Se tomaron como referencia indicadores como la pérdida de peso corporal o por lo menos el no aumento, el aumento de la proporción del peso pulmón/cuerpo, el aumento de células extravasadas en LBA, el aumento de neutrófilos en el LBA y el aumento de zonas y células inflamatorias en el pulmón (**Figura 73**).

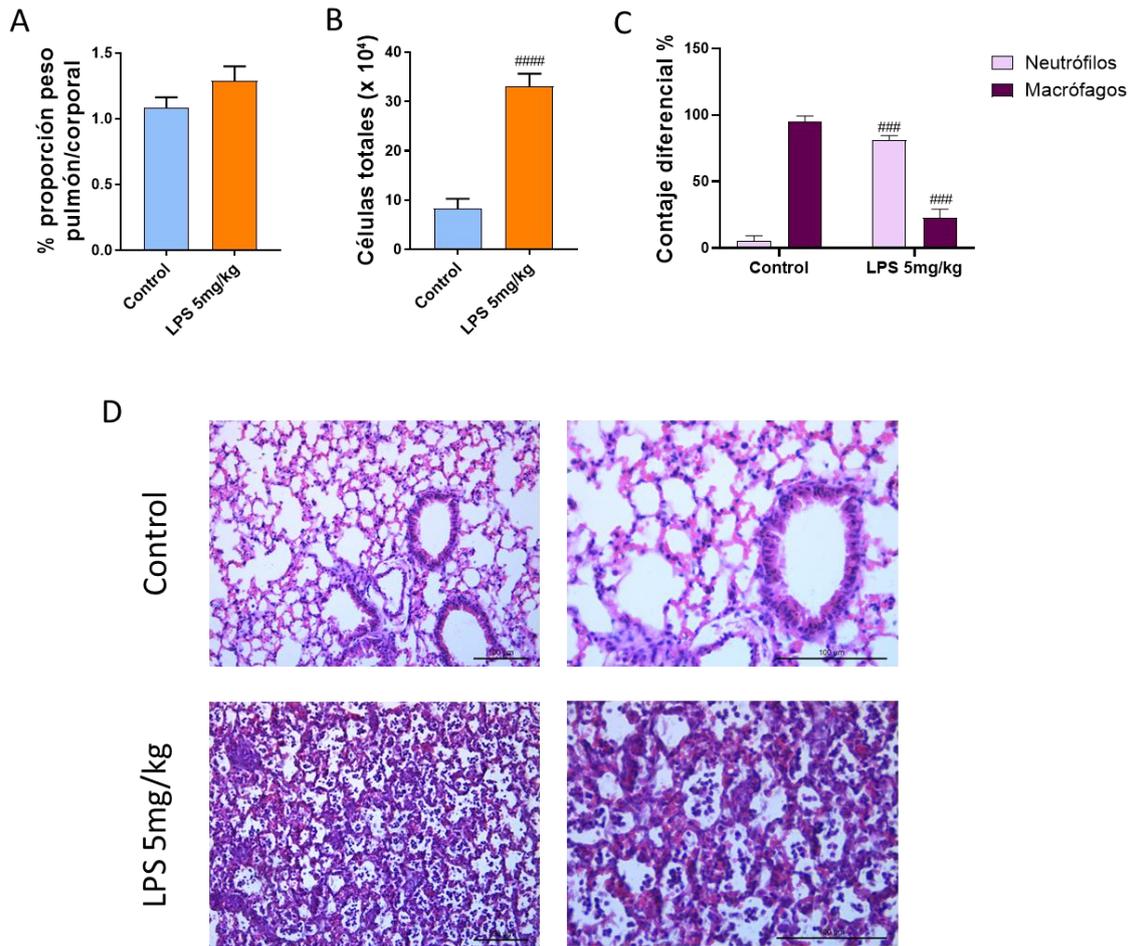


Figura 73. Indicadores de la inflamación pulmonar como validación del modelo murino de inflamación pulmonar aguda. Proporción en el peso pulmonar respecto al del cuerpo (A). Recuento de células inflamatorias totales (B) y diferenciadas por tipo celular (C) en lavado broncoalveolar. Histología pulmonar (D). La instilación con LPS aumenta los indicadores de inflamación y genera un perfil histológico típico de inflamación. resultados se presentan como la media \pm SEM. Las comparaciones fueron analizadas mediante la prueba t de Student (# $p < 0,005$ respecto al grupo control) Abreviaturas: LPS: lipopolisacárido

9.2 Células totales y diferenciadas en LBA

Tras la eutanasia de los ratones se realizó el LBA y una alícuota se empeló para el conteo de células inflamatorias totales extravasadas y la distribución de células inflamatorias de cada ratón. El conteo celular total se realizó *in situ* mediante la cámara de Bürker, el conteo diferencial por otro lado se realizó, tal como se ha explicado en el apartado de métodos, a partir de un citospin y la posterior tinción panóptica.

Se observó, que los fármacos eran capaces de prevenir la extravasación de células inflamatorias al pulmón. Tal como se observa en la **Figura 74**, el número de células totales era menor en los

ratones administrados con fármaco, respecto a los ratones del grupo LPS. A pesar de que no se alcanzaron niveles equivalentes al grupo control, las diferencias fueron significativas. Además, se observó que los ratones tratados con los activadores de NRF2 mostraban mejores resultados que aquellos tratados con roflumilast, nuestro control antiinflamatorio.

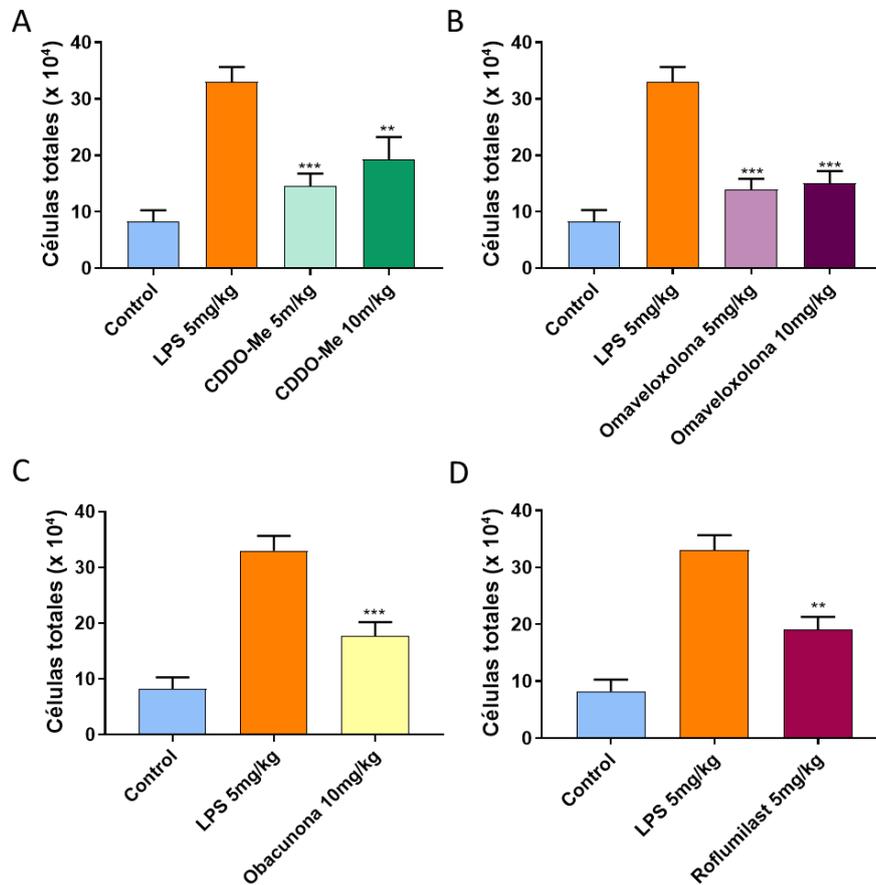


Figura 74. Recuento de células inflamatorias totales en lavado broncoalveolar. El lavado broncoalveolar se aisló durante la necropsia de todos los grupos del modelo murino, a partir del pellet se realizó el conteo de células totales. Los fármacos CDDO-Me (A), omaveloxolona (B) y obacunona (C) son capaces de prevenir el aumento de células inflamatorias en el lavado broncoalveolar generado por la instilación por LPS, incluso en mayor medida que el fármaco antiinflamatorio roflumilast (D). Los resultados se presentan como la media \pm SEM. Las comparaciones fueron analizadas mediante la prueba ANOVA de una vía seguido de un test post hoc de Bonferroni o t de Student (* $p < 0,005$ * respecto al grupo LPS 5mg/kg) *Abreviaturas: LPS: lipopolisacárido*

Asimismo, cuando analizamos el recuento por tipo celular, observamos que la instilación con LPS generaba un aumento muy significativo de los neutrófilos en proporción a los macrófagos en el LBA comparado con los controles. Lo que corresponde a una exacerbación de la inflamación pulmonar. Los fármacos testados mostraron la capacidad de disminuir el número de neutrófilos y aumentar, proporcionalmente, el número de macrófagos respecto al grupo de LPS, a niveles similares o incluso superiores que el fármaco utilizado como control, roflumilast.

Así pues, mientras que con el grupo LPS se obtuvieron porcentajes de 81% de neutrófilos, los fármacos obtuvieron porcentajes menores: CDDO-Me 5mg/kg, 76,5% y 10mg/kg, 55,6%; omaveloxolona 5mg/kg, 60,% y 10mg/kg, 67,8%; obacunona, 51,4% y finalmente, roflumilast, 74,8% (**Figura 75**). Sin embargo, no todos los fármacos mostraron los mismos resultados, se pudo observar como el fármaco que mostraba mejores resultado era la obacunona.

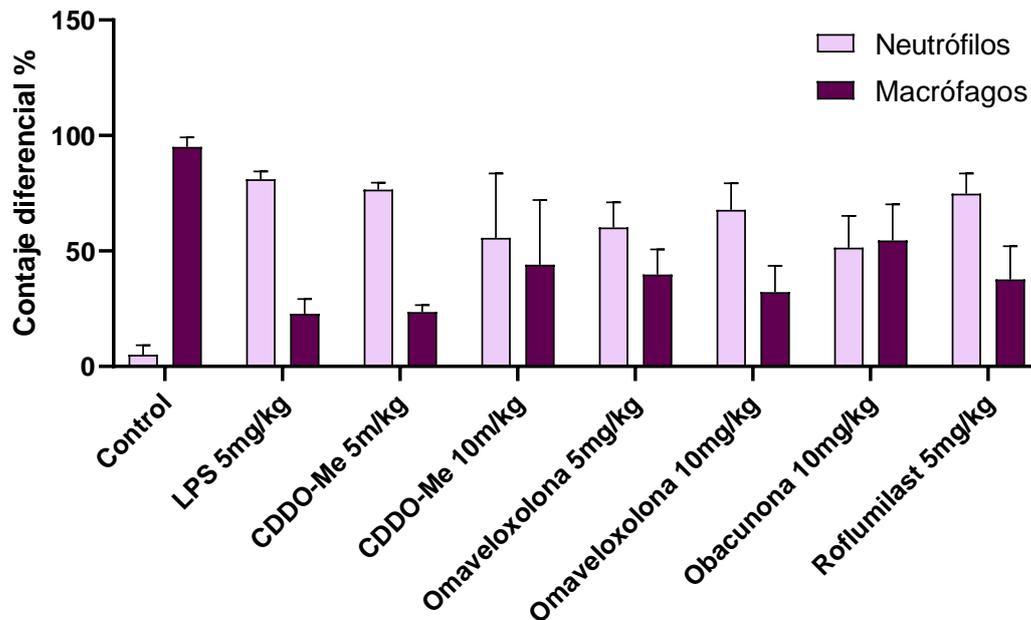


Figura 75. Recuento de células inflamatorias por tipo, macrófagos y neutrófilo. El lavado broncoalveolar se aisló durante la necropsia de todos los grupos del modelo murino, a partir del pellet se realizó el conteo diferencial de células. Los fármacos CDDO-Me, omaveloxolona y obacunona son capaces de prevenir el aumento en la proporción de neutrófilos frente a macrófagos en el lavado broncoalveolar generado por la instilación por LPS, incluso en mayor medida que el fármaco antiinflamatorio roflumilast. Los resultados se presentan como la media \pm SEM. Abreviaturas: LPS: lipopolisacárido

9.3 Marcadores inflamatorios en el LBA y en parénquima pulmonar en el modelo murino de inflamación pulmonar aguda

Para continuar con el análisis del potencial antiinflamatorio de los fármacos activadores de NRF2 *in vivo*, se cuantificaron mediante ELISA las concentración de los marcadores inflamatorios CXCL15, TNF- α , IL-6 e IL-1 β en el LBA, además se estudió mediante RT-qPCR la expresión de los marcadores inflamatorios en el parénquima pulmonar.

En el caso del marcador inflamatorio IL-6, la instilación con LPS produjo un aumento considerable de la concentración en el LBA. Los fármacos disminuían la liberación de este

marcador, sin embargo, en muy pocos casos esta disminución era significativa, incluyendo el caso de fármaco control roflumilast. Aun así, la disminución producida por los fármacos era mayor que el fármaco roflumilast, con un potencial antiinflamatorio conocido ampliamente. Cabe destacar que la obacunona sí que produjo un descenso de la concentración de IL-6 significativo. También se debe destacar que en este caso, la omaveloxolona no seguía un perfil dosis dependiente, como sí lo hacía el fármaco CDDO-Me (**Figura 76**). En cuanto a la expresión génica de este marcador, la administración de LPS produjo un claro aumento de la expresión de *IL-6* respecto al control. Aquí, los fármacos sí que produjeron un descenso significativo de la expresión del marcador, llegando incluso, en el caso de la CDDO-Me de mayor concentración, a niveles inferiores del control. De nuevo, aquí, la omaveloxolona no seguía un perfil dosis-respuesta (**Figura 77**).

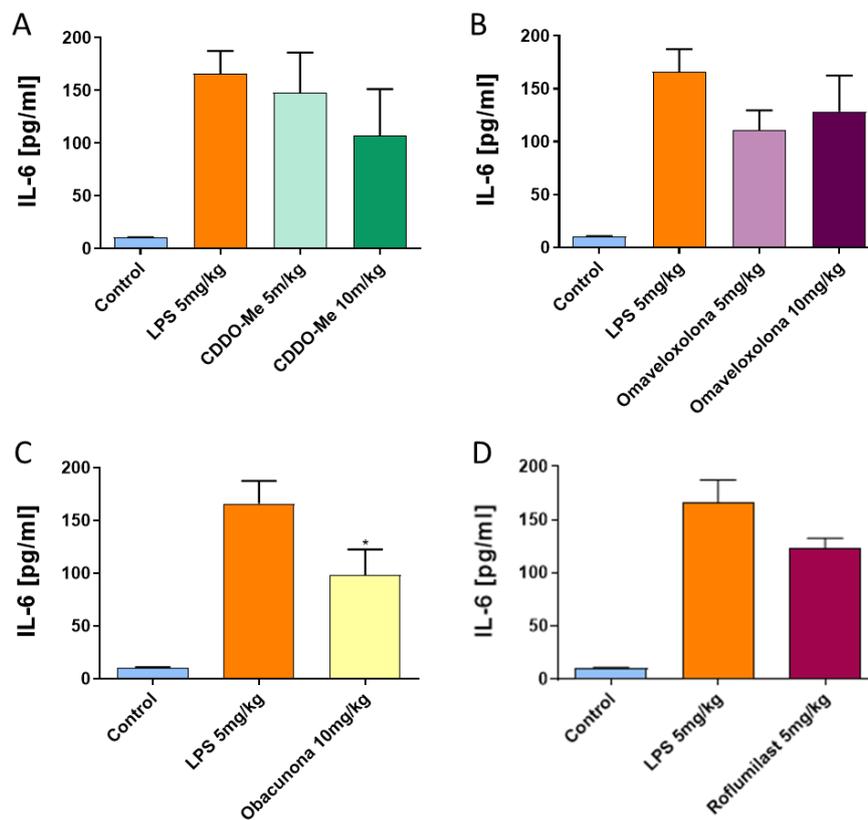


Figura 76. Liberación del marcador inflamatorio IL-6 en LBA del modelo murino de inflamación pulmonar aguda. El lavado broncoalveolar se aisló durante la necropsia de todos los grupos del modelo murino. Mediante la técnica de ELISA se determinó la concentración del marcador inflamatorio en todos los grupos. Se muestran los resultados de los fármacos activadores de NRF2, CDDO-Me (**A**), omaveloxolona (**B**) y obacunona (**C**) y del fármaco control, roflumilast (**D**). Los resultados se presentan como la media \pm SEM. Las comparaciones fueron analizadas mediante la prueba ANOVA de una vía seguido de un test post hoc de Bonferroni (* $p < 0,005$ * respecto al grupo LPS 5mg/kg). *Abreviaturas: LPS: lipopolisacárido*

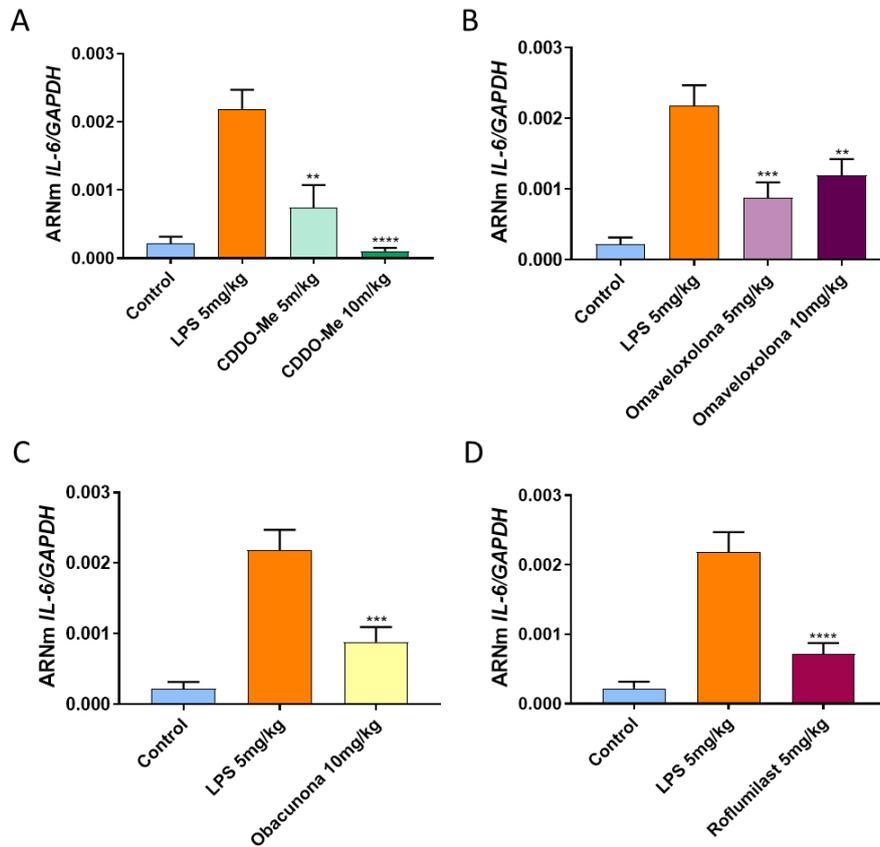


Figura 77. Expresión génica del marcador inflamatorio IL-6 en parénquima pulmonar del modelo murino de inflamación pulmonar aguda. El parénquima pulmonar se aisló tras la necropsia de todos los grupos del modelo murino. Mediante la técnica de RT-qPCR se determinó la expresión del marcador inflamatorio en todos los grupos. Se muestran los resultados de los fármacos activadores de NRF2, CDDO-Me (A), omaveloxolona (B) y obacunona (C) y del fármaco control, roflumilast (D). Los resultados se presentan como la media \pm SEM. Las comparaciones fueron analizadas mediante la prueba ANOVA de una vía seguido de un test post hoc de Bonferroni (* $p < 0,005$ * respecto al grupo LPS 5mg/kg). *Abreviaturas:* LPS: lipopolisacárido

En el caso del marcador CXCL15, el homólogo en ratón de IL-8, la instilación con LPS también produjo un aumento de la concentración de aproximadamente el doble respecto al control. Pero el aumento de la concentración era mucho menor que en el resto de los marcadores estudiados. Los fármacos eran capaces de disminuir la concentración de CXCL15, sin embargo, esta reducción solo fue significativa para dos de los fármacos, entre los que no se incluye roflumilast, nuestro fármaco control. Los fármacos que mostraron una disminución significativa fueron la obacunona y la omaveloxolona a la concentración más baja. Igual que el caso de la IL-6, la omaveloxolona no seguía un perfil dosis dependiente (Figura 78). El estudio de la expresión génica de CXCL15 mostró también un aumento en la expresión respecto al control, sin embargo, este aumento no fue tan significativo como en el resto de marcadores inflamatorios, como hemos podido observar con IL-6. Se observó que los fármacos sí que reducían el nivel de

expresión del marcador, sin embargo, solo en el caso de la obacunona y de la omaveloxolona a la menor concentración, esta reducción era significativa (**Figura 79**).

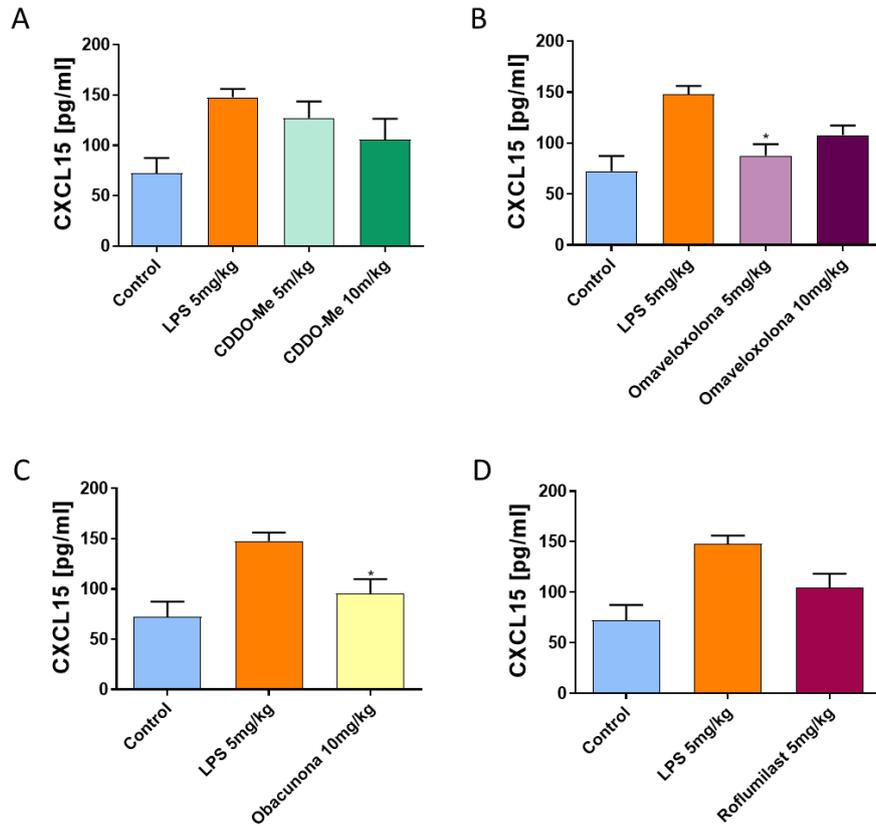


Figura 78. Liberación del marcador inflamatorio CXCL15 en LBA del modelo murino de inflamación pulmonar aguda. El lavado broncoalveolar se aisló durante la necropsia de todos los grupos del modelo murino. Mediante la técnica de ELISA se determinó la concentración del marcador inflamatorio en todos los grupos. Se muestran los resultados de los fármacos activadores de NRF2, CDDO-Me (**A**), omaveloxolona (**B**) y obacunona (**C**) y del fármaco control, roflumilast (**D**). Los resultados se presentan como la media \pm SEM. Las comparaciones fueron analizadas mediante la prueba ANOVA de una vía seguido de un test post hoc de Bonferroni (* $p < 0,005$ * respecto al grupo LPS 5mg/kg) *Abreviaturas: LPS: lipopolisacárido*

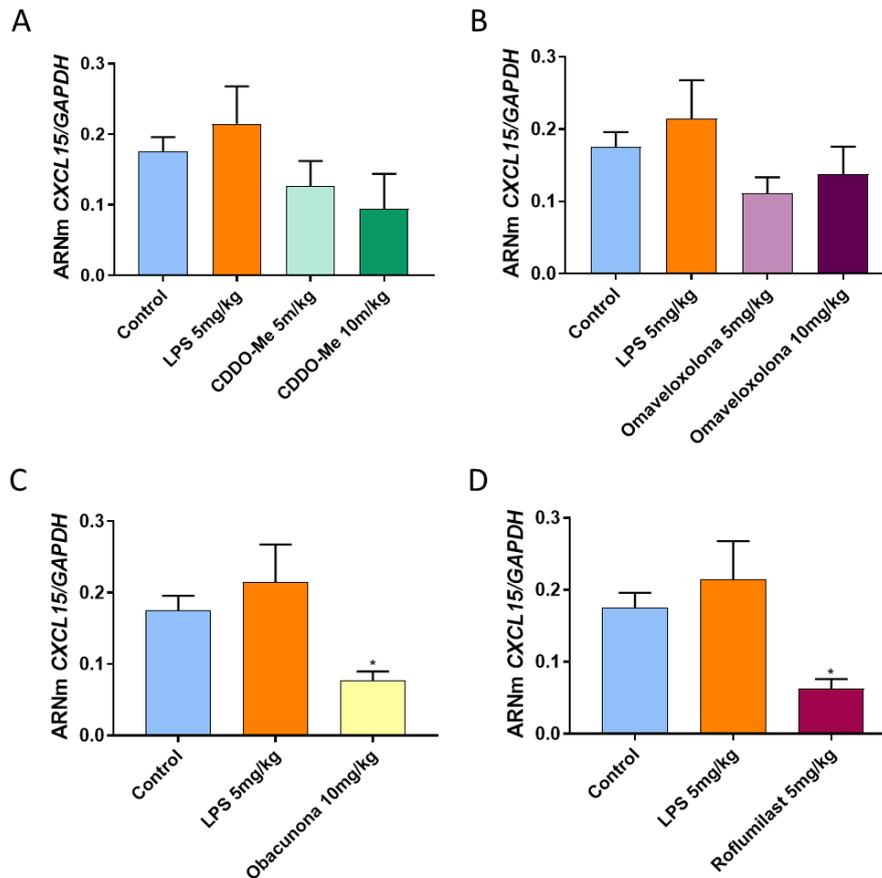


Figura 79. Expresión génica del marcador inflamatorio CXCL15 en parénquima pulmonar del modelo murino de inflamación pulmonar aguda. El parénquima pulmonar se aisló tras la necropsia de todos los grupos del modelo murino. Mediante la técnica de RT-qPCR se determinó la expresión del marcador inflamatorio en todos los grupos. Se muestran los resultados de los fármacos activadores de NRF2, CDDO-Me (A), omaveloxolona (B) y obacunona (C) y del fármaco control, roflumilast (D). Los resultados se presentan como la media \pm SEM. Las comparaciones fueron analizadas mediante la prueba ANOVA de una vía seguido de un test post hoc de Bonferroni (* $p < 0,005$ * respecto al grupo LPS 5mg/kg). *Abreviaturas:* LPS: lipopolisacárido

En una línea similar a IL-6, los análisis de la liberación del marcador TNF- α , mostraron que la instilación con LPS generaba un claro y significativo aumento de la liberación de este marcador en el LBA. Los fármacos testados mostraron tener la capacidad de prevenir la liberación de TNF- α y la gran mayoría de ellos, de forma significativa. La omaveloxolona, en este caso, tampoco seguía un perfil dosis dependiente (Figura 80). En este caso, los estudios de expresión génica mostraron que el LPS generaba un aumento en la expresión de TNF- α en el parénquima pulmonar, además, como en el caso de IL-6, este aumento era mucho mayor que en el caso de IL-8. Los resultados mostraron que los fármacos eran capaces de prevenir el aumento de la expresión de TNF- α , sin embargo, el efecto era menor que en otros marcadores, ya que solo en

los casos de la CDDO-Me y la omaveloxolona (ambas a la mayor concentración) las diferencias fueron significativas. Sorprendentemente, en este caso, la omaveloxolona sí que seguía un perfil dosis dependiente, en el que a mayor concentración, mayor efecto (**Figura 81**).

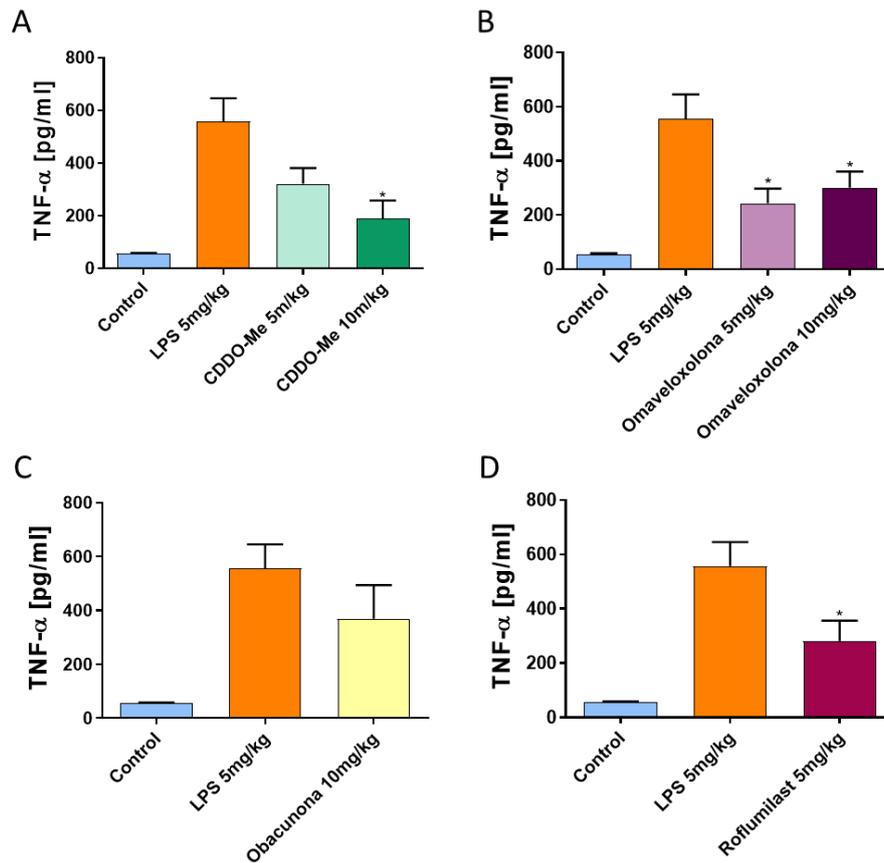


Figura 80. Liberación del marcador inflamatorio TNF- α en LBA del modelo murino de inflamación pulmonar aguda. El lavado broncoalveolar se aisló durante la necropsia de todos los grupos del modelo murino. Mediante la técnica de ELISA se determinó la concentración del marcador inflamatorio en todos los grupos. Se muestran los resultados de los fármacos activadores de NRF2, CDDO-Me (**A**), omaveloxolona (**B**) y obacunona (**C**) y del fármaco control, roflumilast (**D**). Los resultados se presentan como la media \pm SEM. Las comparaciones fueron analizadas mediante la prueba ANOVA de una vía seguido de un test post hoc de Bonferroni (* $p < 0,005$ * respecto al grupo LPS 5mg/kg) *Abreviaturas: LPS: lipopolisacárido*

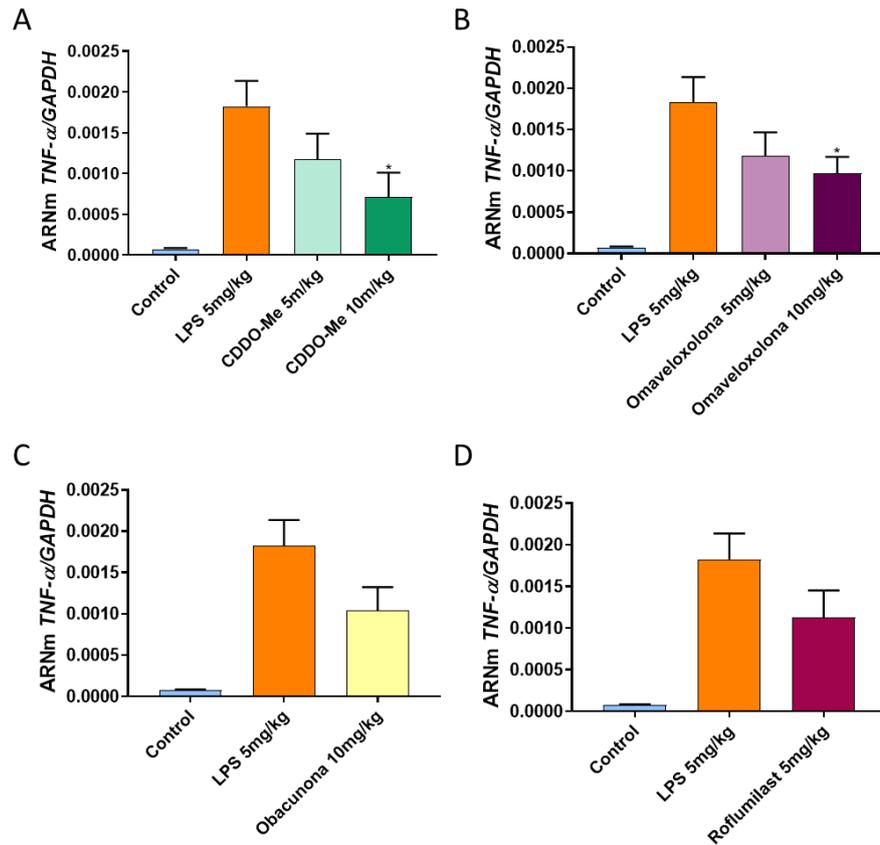


Figura 81. Expresión génica del marcador inflamatorio TNF- α en parénquima pulmonar del modelo murino de inflamación pulmonar aguda. El parénquima pulmonar se aisló tras la necropsia de todos los grupos del modelo murino. Mediante la técnica de RT-qPCR se determinó la expresión del marcador inflamatorio en todos los grupos. Se muestran los resultados de los fármacos activadores de NRF2, CDDO-Me (A), omaveloxolona (B) y obacunona (C) y del fármaco control, roflumilast (D). Los resultados se presentan como la media \pm SEM. Las comparaciones fueron analizadas mediante la prueba ANOVA de una vía seguido de un test post hoc de Bonferroni (* $p < 0,005$ * respecto al grupo LPS 5mg/kg) Abreviaturas: LPS: lipopolisacárido

Por último, se estudió la liberación del marcador inflamatorio IL-1 β por ELISA en el LBA, no así su expresión génica. Estos resultados mostraron que, tal como ocurría en el resto de los marcadores, la instilación con LPS generaba un aumento de la liberación de esta interleucina. Los fármacos activadores eran capaces de disminuir la concentración del marcador, sin embargo, solo en el caso de la obacunona, las diferencias eran significativas, llegando a tener mayor efecto que el fármaco control roflumilast (Figura 82).

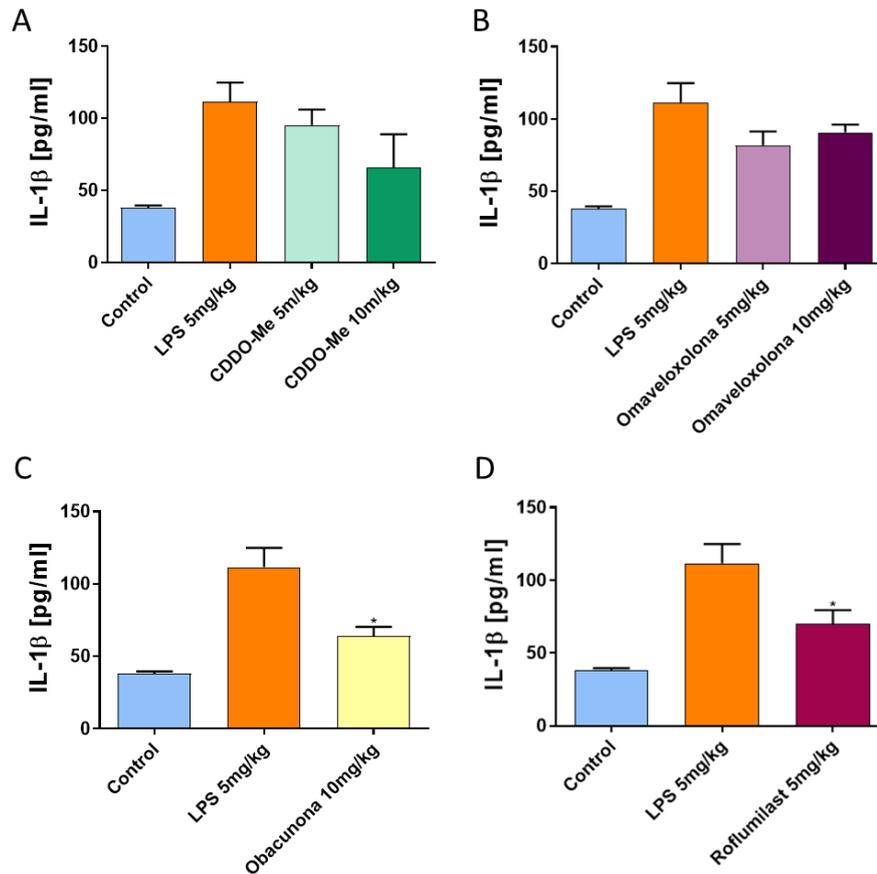


Figura 82. Liberación del marcador inflamatorio IL-1 β en LBA del modelo murino de inflamación pulmonar aguda. El lavado broncoalveolar se aisló durante la necropsia de todos los grupos del modelo murino. Mediante la técnica de ELISA se determinó la concentración del marcador inflamatorio en todos los grupos. Se muestran los resultados de los fármacos activadores de NRF2, CDDO-Me (A), omaveloxolona (B) y obacunona (C) y del fármaco control, roflumilast (D). Los resultados se presentan como la media \pm SEM. Las comparaciones fueron analizadas mediante la prueba ANOVA de una vía seguido de un test post hoc de Bonferroni (* $p < 0,005$ * respecto al grupo LPS 5mg/kg). Abreviaturas: LPS: lipopolisacárido

9.4 Cambios histológicos generados en el modelo murino de inflamación pulmonar aguda

Se estudiaron, asimismo, los cambios histológicos generados en el tejido pulmonar en todos los grupos. Para ello se obtuvieron secciones del parénquima pulmonar incluido en parafina de 5 μ m de espesor y se realizaron tinciones de hematoxilina-eosina que permitieran observar todas las estructuras del tejido. Los cambios producidos se examinaron morfológicamente y el grado de daño pulmonar se calificó en una escala de 0 a 4 (0, ausente y parece normal; 1, ligero; 2, moderado; 3, fuerte; 4, intenso)

La tinción de hematoxilina-eosina del grupo control nos permite identificar un parénquima pulmonar sano, vías respiratorias sin deteriorar y vasos sanguíneos de lumen y espesor habitual; es decir, una distribución y una arquitectura pulmonar propia de un sujeto sano en ausencia de enfermedad. Los ratones expuestos únicamente a LPS, mostraron una marcada inflamación del parénquima, con infiltración de células inflamatorias en el espacio aéreo alveolar, con engrosamiento de la pared alveolar y hemorragia. El tratamiento con los fármacos activadores de NRF2 alivió notablemente los cambios histopatológicos inducidos por el LPS, tal como se puede observar en la **Figura 83, A**. Si observamos las imágenes, se puede ver que los ratones tratados con obacunona y omaveloxolona a la mayor concentración, mostraron cambios histológicos menores, con una estructura muy similar a la encontrada en los ratones control. Además, la calificación del daño pulmonar mostró que esta estaba significativamente incrementada después de la instilación con LPS en comparación con el grupo control, y que los grupos de los fármacos mostraban índices de daño pulmonar significativamente menores. (**Figura 83, B**).

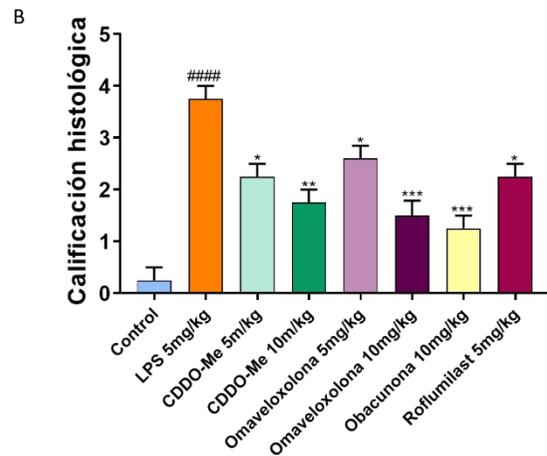
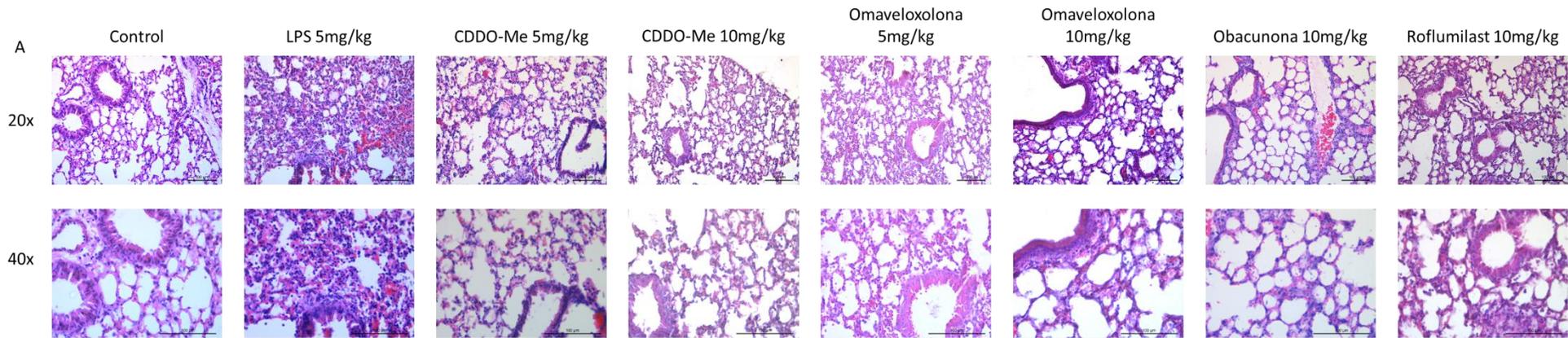


Figura 83. Los fármacos activadores de NRF2 mejoran los cambios histológicos en el parénquima pulmonar en el modelo murino de daño pulmonar agudo producidos por LPS. Imágenes representativas de la tinción con hematoxilina-eosina de los grupos experimentales (A), en las que se observa una marcada inflamación el grupo de LPS, y una reducción de esta inflamación en los grupos de los fármacos. Calificación de la severidad del daño pulmonar (B). Los resultados se presentan como la media \pm SEM. Las comparaciones fueron analizadas mediante la prueba ANOVA de una vía seguido de un test post hoc de Bonferroni (* $p < 0,005$ * respecto al grupo LPS 5mg/kg, # respecto al grupo Control) Abreviaturas: LPS: lipopolisacárido

9.5 Efecto antioxidante en el modelo de inflamación pulmonar aguda

Estudiado el efecto antiinflamatorio de los fármacos, se estudió su efecto antioxidante mediante el análisis de la expresión génica y proteica de las enzimas o factores implicados en la defensa antioxidante, tal como se hizo en los estudios *in vitro*. Para ello se realizaron ensayos de RT-qPCR y de western blot a partir del parénquima pulmonar de cada ratón.

En primer lugar se estudió la expresión génica del factor NRF2 para comprobar, tal como se había hecho en el *in vitro*, si los fármacos activaban no solo la función de NRF2, sino también su expresión. Se observó, que la instilación con LPS generaba un descenso de la expresión de *NRF2*. Además, los fármacos activadores de NRF2 eran capaces de prevenir este descenso en la expresión, tal como se puede observar en la **Figura 84**. En el caso de los fármacos activadores de NRF2, excepto en el caso de la CDDO-Me a la menor concentración, las diferencias con el grupo LPS fueron significativas. Sin embargo, en el caso del roflumilast, no se observó un aumento significativo de la expresión de *NRF2*, algo esperable ya que no se trata de un activador de NRF2.

Asimismo, tal como se había hecho en los ensayos *in vitro*, se estudió tanto la expresión génica como la expresión proteica de las enzimas antioxidantes por excelencia, HO-1 y NQO1. Se observó, en el caso de la enzima HO-1 que la instilación con LPS provocaba, tal como ocurría en el *in vitro*, un aumento de la expresión génica y de la expresión proteica. En cuanto a la expresión génica, observamos que todos los fármacos activadores de NRF2 aumentaban a niveles significativos la expresión de *HO-1*, sin embargo, tal como cabría esperar, el roflumilast no aumentaba estos niveles, al no tratarse de un fármaco activador de NRF2 (**Figura 85**).

En cuanto a la expresión proteica, se observaron resultados que concordaban con los obtenidos en la expresión génica. Los fármacos eran capaces de aumentar de forma significativa la expresión de HO-1 respecto al grupo LPS, de la misma forma y complementario a la expresión génica, el fármaco roflumilast no era capaz de aumentar de forma significativa la expresión de HO-1 (**Figura 86**).

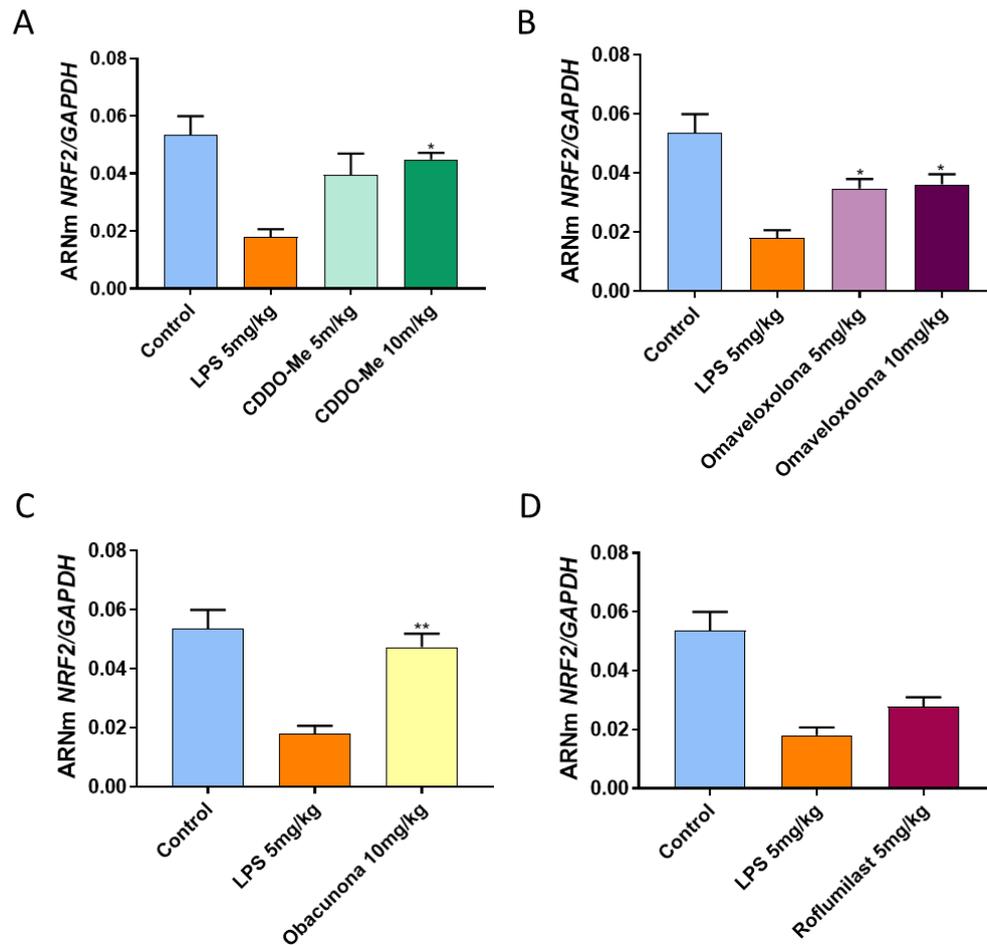


Figura 84. Expresión génica de NRF2 en parénquima pulmonar aislado del modelo murino de inflamación pulmonar aguda. El parénquima pulmonar se aisló tras la necropsia de todos los grupos del modelo murino. Mediante la técnica de RT-qPCR se determinó la expresión del gen con la sonda correspondiente en todos los grupos. Se muestran los resultados de los fármacos activadores de NRF2, CDDO-Me (**A**), omaveloxolona (**B**) y obacunona (**C**) y del fármaco control, roflumilast (**D**). La instilación con LPS disminuye la expresión de NRF2 y los fármacos activadores son capaces de prevenir esta situación. Los resultados se presentan como la media \pm SEM. Las comparaciones fueron analizadas mediante la prueba ANOVA de una vía seguido de un test post hoc de Bonferroni (* $p < 0,005$ * respecto al grupo LPS 5mg/kg). Abreviaturas: LPS: lipopolisacárido

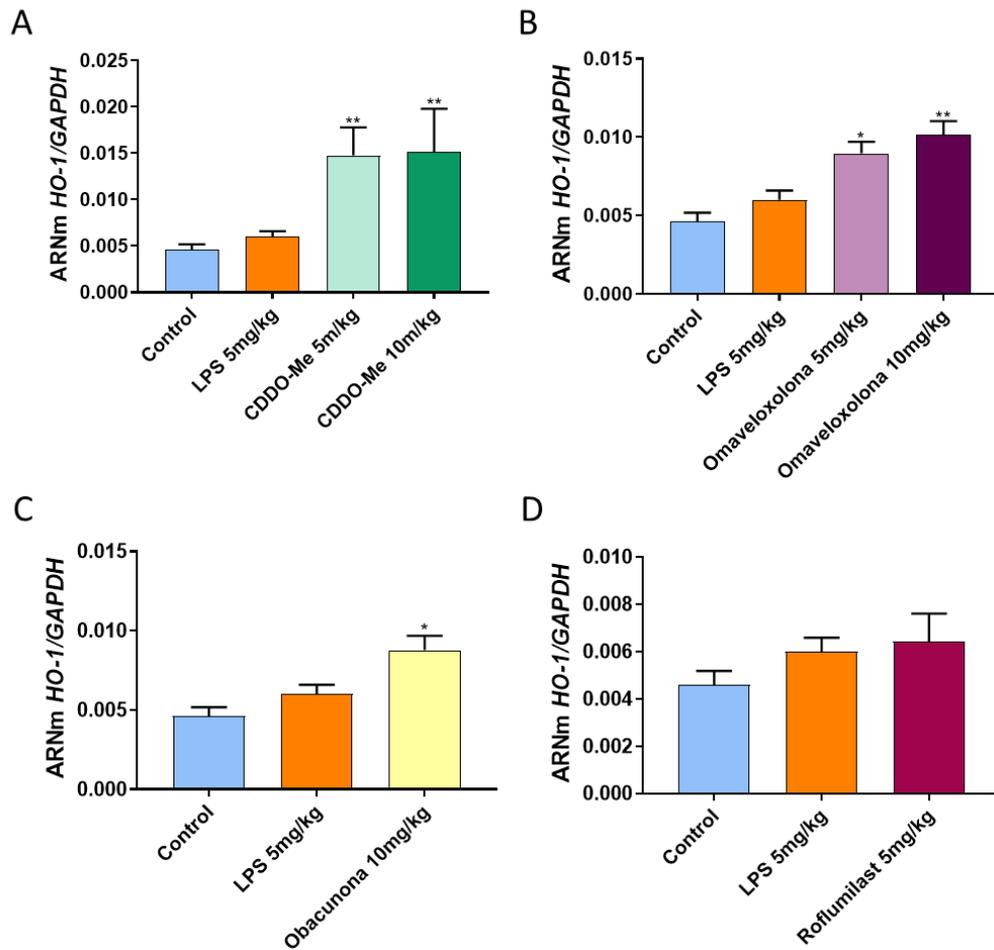


Figura 85. Expresión génica de HO-1 en parénquima pulmonar aislado del modelo murino de inflamación pulmonar aguda. El parénquima pulmonar se aisló tras la necropsia de todos los grupos del modelo murino. Mediante la técnica de RT-qPCR se determinó la expresión del gen con la sonda correspondiente en todos los grupos. Se muestran los resultados de los fármacos activadores de NRF2, CDDO-Me (A), omaveloxolona (B) y obacunona (C) y del fármaco control, roflumilast (D). La instilación con LPS aumenta ligeramente la expresión de HO-1 y los fármacos activadores son capaces de aumentar de forma más significativa su expresión. Los resultados se presentan como la media \pm SEM. Las comparaciones fueron analizadas mediante la prueba ANOVA de una vía seguido de un test post hoc de Bonferroni (* $p < 0,005$ * respecto al grupo LPS 5mg/kg). Abreviaturas: LPS: lipopolisacárido

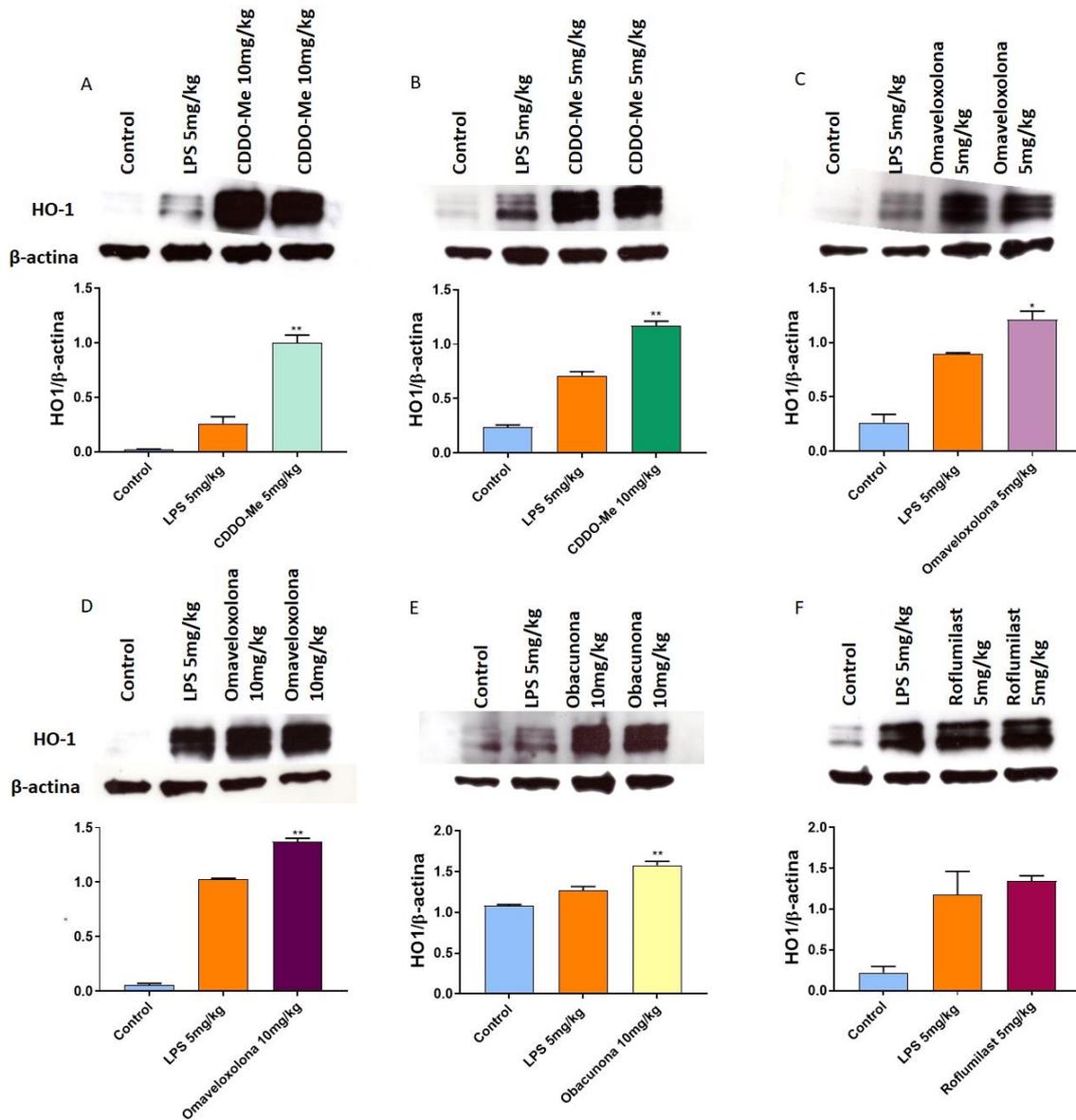


Figura 86. Expresión proteica de HO-1 en parénquima pulmonar aislado del modelo murino de inflamación pulmonar aguda. El parénquima pulmonar se aisló tras la necropsia de todos los grupos del modelo murino. Mediante la técnica de western blot se determinó la expresión de la proteína con el anticuerpo correspondiente en todos los grupos. Se muestran los resultados de los fármacos activadores de NRF2, CDDO-Me (A y B), omaveloxolona (C y D) y obacunona (E) y del fármaco control, roflumilast (F). La instilación con LPS aumenta la expresión de HO-1 y los fármacos activadores son capaces de aumentar de forma significativa su expresión. Los resultados se presentan como la media \pm SEM. Las comparaciones fueron analizadas mediante la prueba ANOVA de una vía seguido de un test post hoc de Bonferroni (* $p < 0,005$ * respecto al grupo LPS 5mg/kg) Abreviaturas: LPS: lipopolisacárido

Tal como se ha comentado, también se estudió la expresión génica y proteica de la enzima NQO1. Se observó que tanto en la expresión génica como la proteica, la estimulación con LPS generaba una disminución de los niveles de NQO1. Esto difería con lo observado en la otra

proteína antioxidante estudiada, HO-1, y con lo observado en los ensayos *in vitro*. Como se puede observar en las **Figuras 87 y 88**, los fármacos activadores eran capaces de prevenir la disminución de los niveles de expresión de NQO1 e, incluso, incrementar significativamente la expresión a niveles superiores al del grupo control. Por el contrario, se observó que en el grupo tratado con roflumilast, este no conseguía prevenir los efectos generados por el LPS.

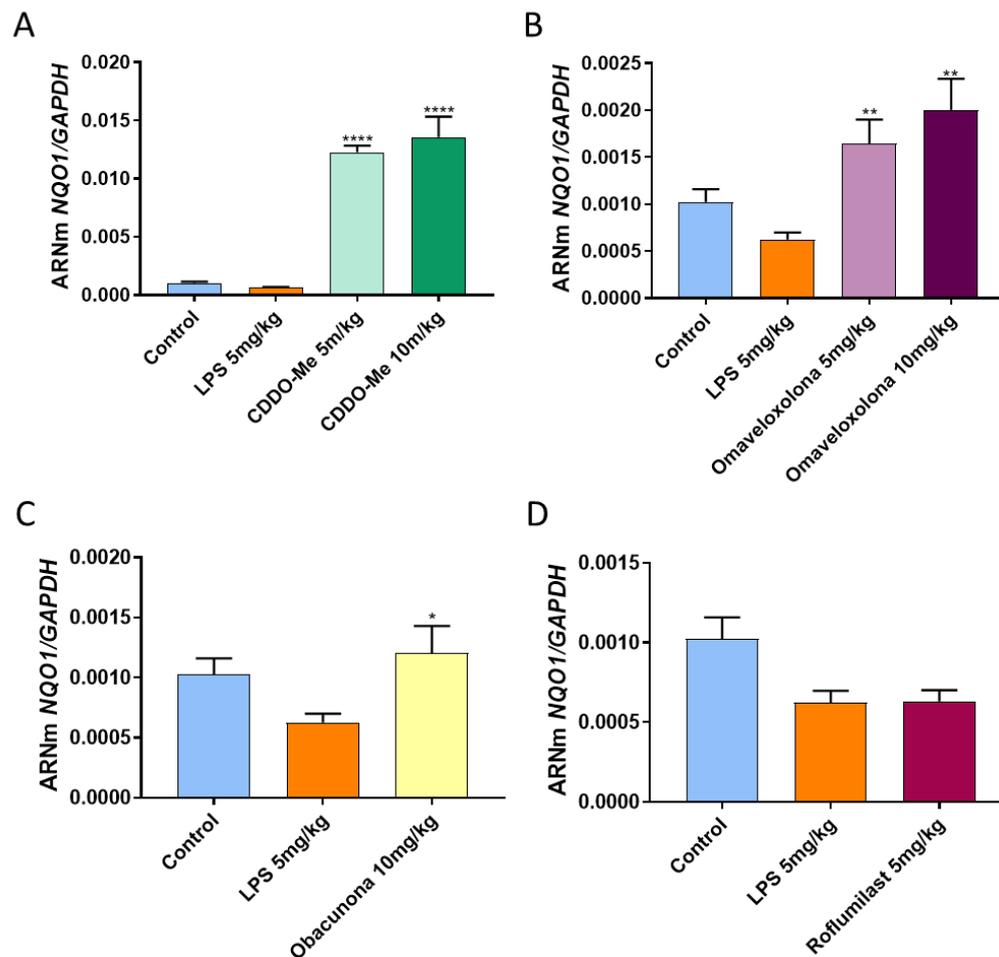


Figura 87. Expresión génica de NQO1 en parénquima pulmonar aislado del modelo murino de inflamación pulmonar aguda. El parénquima pulmonar se aisló tras la necropsia de todos los grupos del modelo murino. Mediante la técnica de RT-qPCR se determinó la expresión del gen con la sonda correspondiente en todos los grupos. Se muestran los resultados de los fármacos activadores de NRF2, CDDO-Me (**A**), omaveloxolona (**B**) y obacunona (**C**) y del fármaco control, roflumilast (**D**). La instilación con LPS disminuye la expresión de NQO1 y los fármacos activadores son capaces de prevenir esta situación. Los resultados se presentan como la media \pm SEM. Las comparaciones fueron analizadas mediante la prueba ANOVA de una vía seguido de un test post hoc de Bonferroni (* $p < 0,005$ * respecto al grupo LPS 5mg/kg) Abreviaturas: LPS: lipopolisacárido

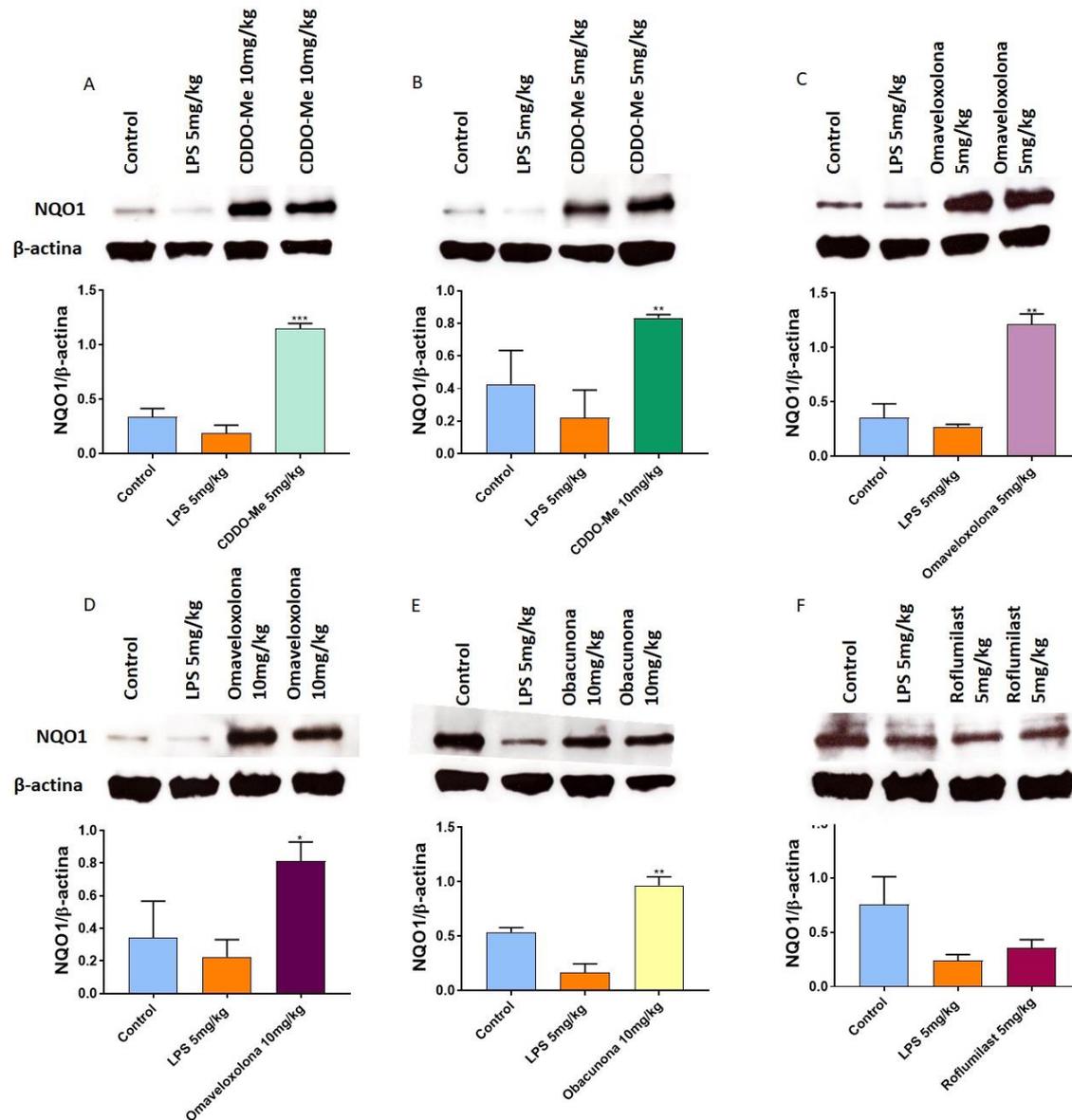


Figura 88. Expresión proteica de NQO1 en parénquima pulmonar aislado del modelo murino de inflamación pulmonar aguda. El parénquima pulmonar se aisló tras la necropsia de todos los grupos del modelo murino. Mediante la técnica de western blot se determinó la expresión de la proteína con el anticuerpo correspondiente en todos los grupos. Se muestran los resultados de los fármacos activadores de NRF2, CDDO-Me (**A y B**), omaveloxolona (**C y D**) y obacunona (**E**) y del fármaco control, roflumilast (**F**). La instilación con LPS disminuye la expresión de NQO1 y los fármacos activadores son capaces de prevenir esta situación y aumentar de forma significativa su expresión. Los resultados se presentan como la media \pm SEM. Las comparaciones fueron analizadas mediante la prueba ANOVA de una vía seguido de un test post hoc de Bonferroni (* $p < 0,005$ * respecto al grupo LPS 5mg/kg) Abreviaturas: LPS: lipopolisacárido

Finalmente, se decidió estudiar la expresión, en este caso solo génica, de la iNOS, ya que su expresión está regulada por factor NF- κ B (diana final también de la CDDO-Me) y también se ha visto que puede estar mediada por NRF2^{334,347,380}. Se observó, que la instilación con LPS

generaba un aumento muy significativo de la expresión de *iNOS* y que la acción de los fármacos era capaz de prevenir esta situación, alcanzándose niveles de expresión por debajo del control. En este caso, además, el roflumilast también era capaz de prevenir el aumento de la expresión de este gen (Figura 89).

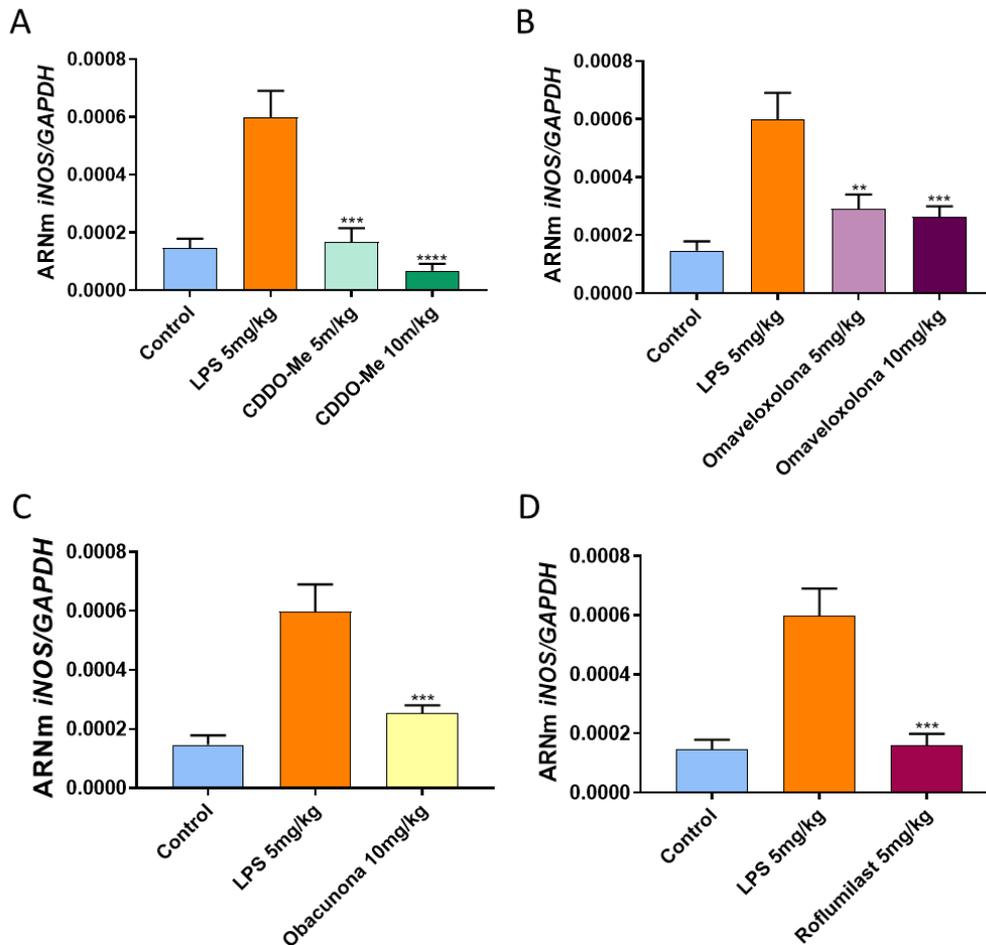


Figura 89. Expresión génica de *iNOS* en parénquima pulmonar aislado del modelo murino de inflamación pulmonar aguda. El parénquima pulmonar se aisló tras la necropsia de todos los grupos del modelo murino. Mediante la técnica de RT-qPCR se determinó la expresión del gen con la sonda correspondiente en todos los grupos. Se muestran los resultados de los fármacos activadores de NRF2, CDDO-Me (A), omaveloxolona (B) y obacunona (C) y del fármaco control, roflumilast (D). La instilación con LPS aumenta la expresión de *iNOS* y los fármacos activadores son capaces de prevenir esta situación y disminuir de forma más significativa su expresión. Los resultados se presentan como la media \pm SEM. Las comparaciones fueron analizadas mediante la prueba ANOVA de una vía seguido de un test post hoc de Bonferroni (* $p < 0,005$ * respecto al grupo LPS 5mg/kg) Abreviaturas: LPS: lipopolisacárido

10. Modelo murino de exacerbación generado por la combinación de lps y humo de tabaco

Finalmente, tras estudiar los efectos de los activadores de NRF2 en el modelo de inflamación pulmonar aguda, se estudió el efecto de los fármacos en el modelo murino de exacerbación de la EPOC generado por la combinación de instilación intratraqueal de LPS y la exposición corta a humo de tabaco. Este modelo nos permite ir un paso más allá de los resultados obtenidos *in vitro* e *in vivo* con el modelo de inflamación pulmonar, ya que permite seguir la evolución de la inflamación y el estrés oxidativo generado por la exposición a humo de tabaco y, además, estudiar la capacidad de reversión de los fármacos, ya que únicamente se había estudiado su capacidad preventiva.

10.1 Validación del modelo murino inducido por la combinación de instilación intratraqueal de LPS y exposición a humo de tabaco

El modelo experimental de exacerbación de la EPOC es un modelo estandarizado que ha sido detallado en numerosos trabajos científicos y que se ha utilizado previamente en nuestro laboratorio ^{298,458,475-477}, lo que avala la metodología empleada.

Para este modelo, los ratones se pretrataron con LPS (4mg/kg) mediante instilación intratraqueal. A las 24 horas de la instilación de LPS, a los ratones se les administró los diferentes activadores de NRF2 y fueron expuestos a humo de tabaco. Durante 4 días consecutivos los ratones fueron tratados con los fármacos y tras un período de 1h se les expuso al humo de tabaco. Tras 24h de la última exposición a humo de tabaco, se procedió a la eutanasia de todos los ratones.

A pesar de ser un modelo ya previamente estandarizado y utilizado en nuestro laboratorio con anterioridad, se comprobó que se alcanzaba el estado de inflamación pulmonar en los ratones instilados con LPS y expuestos a humo de tabaco y que existían diferencias respecto al grupo control. Se tomaron como referencia la pérdida de peso corporal o por lo menos el no aumento, el aumento de la proporción del peso pulmón/cuerpo, el aumento de células extravasadas en LBA, el aumento de neutrófilos en el LBA y el aumento de zonas y células inflamatorias en el pulmón (**Figura 90**). En este caso, además, algunos indicadores de inflamación son mayores que en el caso del modelo de inflamación pulmonar aguda. Así por ejemplo en la proporción de peso

pulmón/corporal, la diferencia es mayor respecto al control que en el modelo de inflamación pulmonar aguda, así como ocurre en el número de células totales, cuyo número es bastante mayor que en el modelo murino de inflamación aguda. Por otro lado, el número de neutrófilos es menor que el modelo de dosis única de LPS. Si atendemos a la histología, en este caso, se puede apreciar como una falta casi total de espacios alveolares, con efectos superiores a la dosis única de LPS.

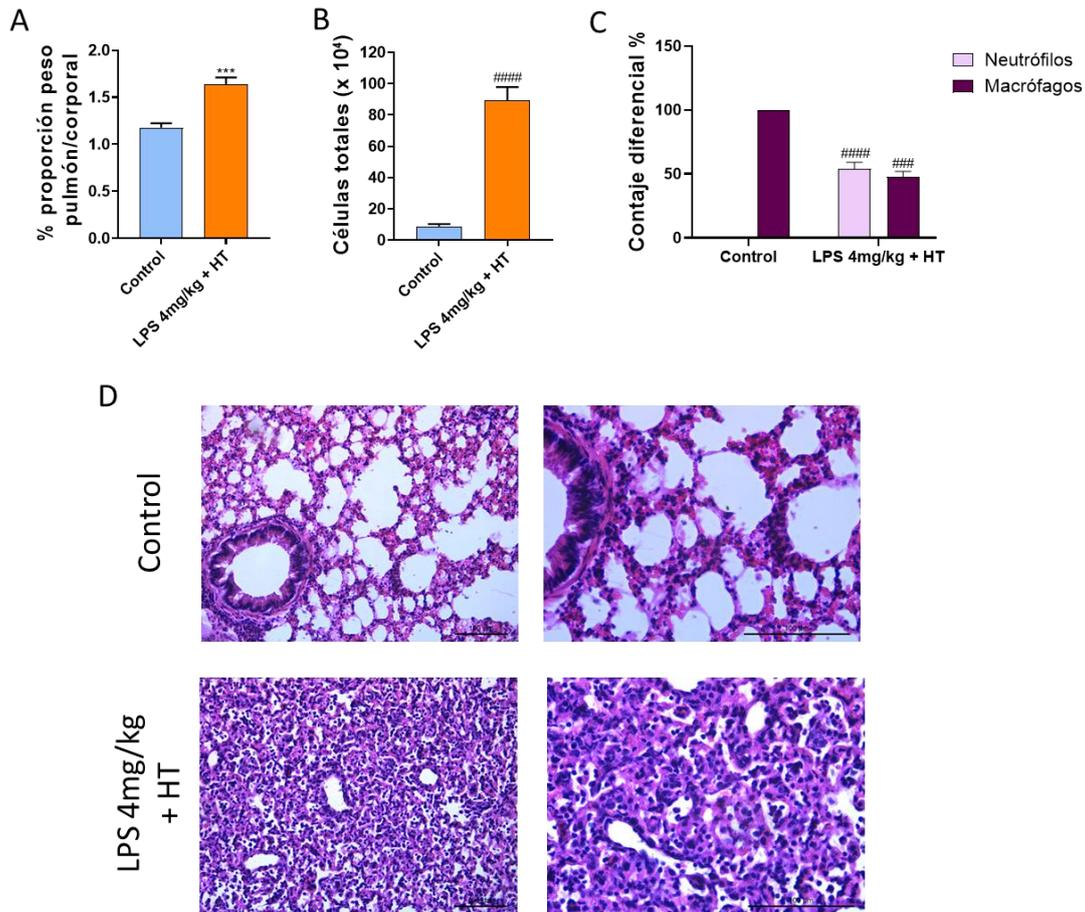


Figura 90. Indicadores de la inflamación pulmonar como validación del modelo murino exacerbación de la EPOC generado por LPS y humo de tabaco (HT). Proporción en el peso pulmonar respecto al del cuerpo (A). Recuento de células inflamatorias totales (B) y diferenciadas por tipo celular (C) en lavado broncoalveolar. Histología pulmonar (D). La instilación con LPS y HT aumentan los indicadores de inflamación y generan un perfil histológico típico de inflamación. Los resultados se presentan como la media \pm SEM. Las comparaciones fueron analizadas mediante la prueba t de Student (# $p < 0,005$ respecto al grupo control) Abreviaturas: HT: humo de tabaco, LPS: lipopolisacárido, HT: humo de tabaco

10.2 Células totales y diferenciadas en LBA

Tras la eutanasia se realizó el LBA y una alícuota se empleó tanto para el conteo total de células extravasadas y para el conteo según tipo celular. Se observó, que los fármacos eran capaces de reducir el número de células inflamatorias totales extravasadas, revirtiendo así la infiltración generada por el pretratamiento con LPS y la sucesiva estimulación con humo de tabaco (**Figura 91**). A pesar de no alcanzarse niveles similares a los del grupo control, la disminución de células era significativa en todos los casos a excepción de la CDDO-Me. Los resultados entre los fármacos omaveloxolona y obacunona fueron muy similares. Sin embargo, aquí, el número total de células extravasadas en el grupo LPS+HT era mucho mayor que en el modelo de dosis única de LPS, donde con todos los fármacos se obtenían diferencias significativas.

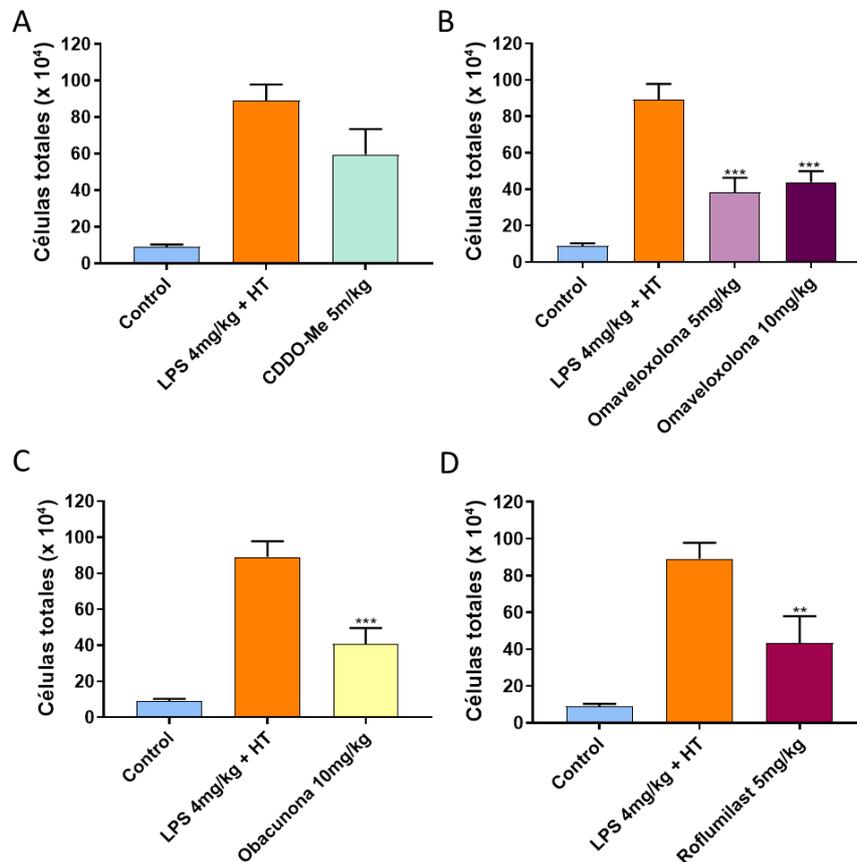


Figura 91. Recuento de células inflamatorias totales en lavado broncoalveolar. El lavado broncoalveolar se aisló durante la necropsia de todos los grupos del modelo murino, a partir del pellet se realizó el conteo de células totales. Los fármacos CDDO-Me (**A**), omaveloxolona (**B**) y obacunona (**C**) son capaces de reducir el aumento de células inflamatorias en el lavado broncoalveolar generado por la instilación por LPS y la sucesiva exposición al humo de tabaco, también así lo hace el fármaco control roflumilast (**D**). Los resultados se presentan como la media \pm SEM. Las comparaciones fueron analizadas mediante la prueba ANOVA de una vía seguido de un test post hoc de Bonferroni o t de Student (* $p < 0,005$ * respecto al grupo LPS 4mg/kg + HT). Abreviaturas: HT: humo de tabaco; LPS: lipopolisacárido

Cuando analizamos el recuento por tipo celular, pudimos observar que la instilación con LPS la exposición al humo de tabaco generaba un aumento de los neutrófilos hasta un 54%, respecto a los macrófagos que disminuyeron de un 100% a un 46%. Asimismo, los fármacos activadores de NRF2 reducían el porcentaje de neutrófilos y aumentaban el porcentaje de macrófagos, revirtiendo así los efectos generados por el LPS y el humo de tabaco, aunque sin llegar al porcentaje del grupo control con un 100% de macrófagos. Así pues, con la CDDO-Se se obtuvo un porcentaje de 38.75%; con la omaveloxolona a 5mg/kg un 33,25% y a 10mg/kg un 44%; con la obacunona un porcentaje de 46% y, finalmente, con roflumilast a un 36,75% (**Figura 92**).

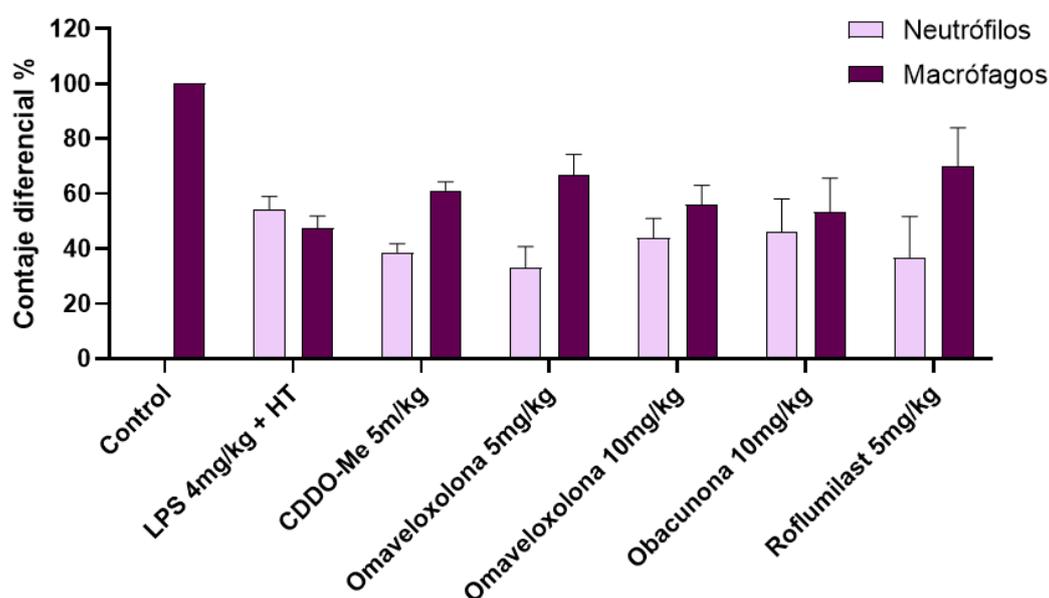


Figura 92. Recuento de células inflamatorias por tipo, macrófagos y neutrófilo. El lavado broncoalveolar se aisló durante la necropsia de todos los grupos del modelo murino, a partir del pellet se realizó el conteo diferencial de células. Los fármacos CDDO-Me, omaveloxolona y obacunona son capaces de revertir el aumento en la proporción de neutrófilos frente a macrófagos en el lavado broncoalveolar generado por la instilación por LPS y la exposición a humo de tabaco, incluso en mayor medida que el fármaco antiinflamatorio roflumilast. Los resultados se presentan como la media \pm SEM. *Abreviaturas: HT: humo de tabaco; LPS: lipopolisacárido*

10.3 Marcadores inflamatorios en el LBA y en parénquima pulmonar en modelo murino de exacerbación

Para continuar con el análisis del potencial antiinflamatorio se cuantificaron mediante ELISA las concentraciones de los marcadores inflamatorios CXCL15, TNF- α , IL-6 e IL-1 β en el LBA, además se estudió mediante RT-qPCR su expresión génica.

Se observó que la instilación con LPS y la sucesiva exposición a humo de tabaco generaba un aumento en la liberación del marcador IL-6, a niveles mucho mayores que en el modelo de inflamación pulmonar aguda. Esto tiene sentido ya que la exposición a humo de tabaco genera también inflamación y, además, las instilación con LPS era previa al tratamiento con los fármacos. Los fármacos se vio que eran capaces de revertir este aumento en la liberación de IL-6 y, en la mayoría de los casos, de forma significativa. A niveles similares a los encontrados con el fármacos roflumilast, de naturaleza antiinflamatoria (**Figura 93**). Respecto a la expresión génica, la instilación de LPS y la exposición a humo de tabaco también produjeron un aumento de la expresión de *IL-6* y, de nuevo, los fármacos mostraron la capacidad de revertir este aumento, llegando en algunos casos a niveles del control (**Figura 94**).

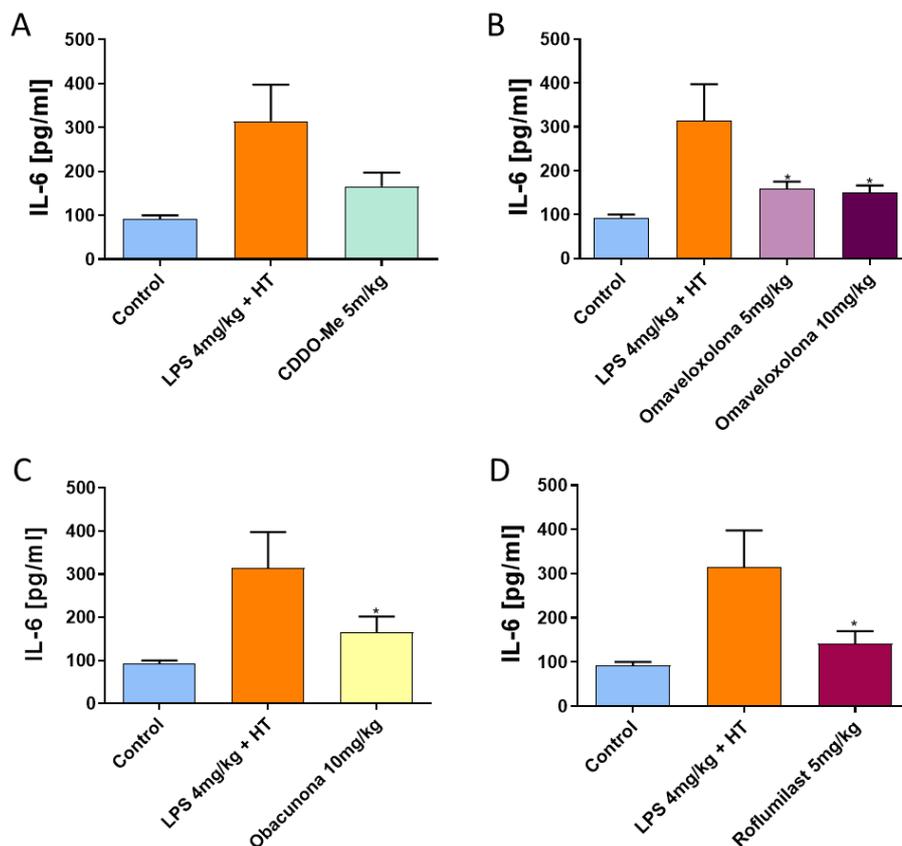


Figura 93. Liberación del marcador inflamatorio IL-6 en LBA del modelo murino de exacerbación de la EPOC. El lavado broncoalveolar se aisló durante la necropsia de todos los grupos del modelo murino. Mediante la técnica de ELISA se determinó la concentración del marcador inflamatorio en todos los grupos. Se muestran los resultados de los fármacos activadores de NRF2, CDDO-Me (A), omaveloxolona (B) y obacunona (C) y del fármaco control, roflumilast (D). Los resultados se presentan como la media \pm SEM. Las comparaciones fueron analizadas mediante la prueba ANOVA de una vía seguido de un test post hoc de Bonferroni (* $p < 0,005$ * respecto al grupo LPS 4mg/kg + HT). Abreviaturas: HT: humo de tabaco; LPS: lipopolisacárido

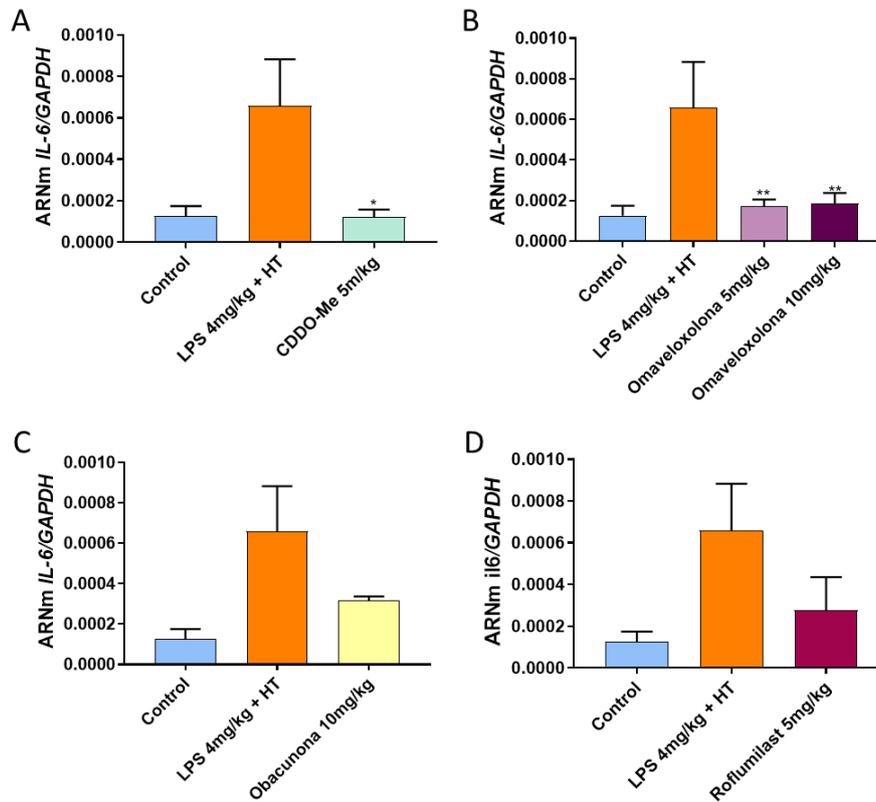


Figura 94. Expresión génica del marcador inflamatorio IL-6 en parénquima pulmonar del modelo murino de exacerbación de la EPOC. El parénquima pulmonar se aisló tras la necropsia de todos los grupos del modelo murino. Mediante la técnica de RT-qPCR se determinó la expresión del marcador inflamatorio en todos los grupos. Se muestran los resultados de los fármacos activadores de NRF2, CDDO-Me (A), omaveloxolona (B) y obacunona (C) y del fármaco control, roflumilast (D). Los resultados se presentan como la media \pm SEM. Las comparaciones fueron analizadas mediante la prueba ANOVA de una vía seguido de un test post hoc de Bonferroni (* $p < 0,005$ * respecto al grupo LPS 4mg/kg + HT) Abreviaturas: HT: humo de tabaco; LPS: lipopolisacárido

Para el marcador CXCL15, observamos que la administración de los estímulos generaba un aumento en la liberación en el LBA, sin embargo, los niveles eran inferiores que los encontrados en el modelo de inflamación aguda. Además, en este caso observamos que a pesar de que los fármacos activadores de NRF2 mostraban cierta tendencia a revertir este aumento en la liberación de CXCL15, no se llegaron en ningún caso a disminuciones significativas, ni tan siquiera en el caso del fármaco control, roflumilast. Tampoco en el modelo de dosis única de LPS se obtuvieron resultados realmente sustanciales (Figura 95). En cuanto a la expresión génica, también se observó un aumento de la expresión el grupo LPS+HT, sin embargo, de nuevo, el aumento no fue tan significativo como en el resto de marcadores inflamatorios. Los fármacos mostraron la capacidad de revertir este aumento de la expresión de CXCL15, y además, de forma significativa (Figura 96).

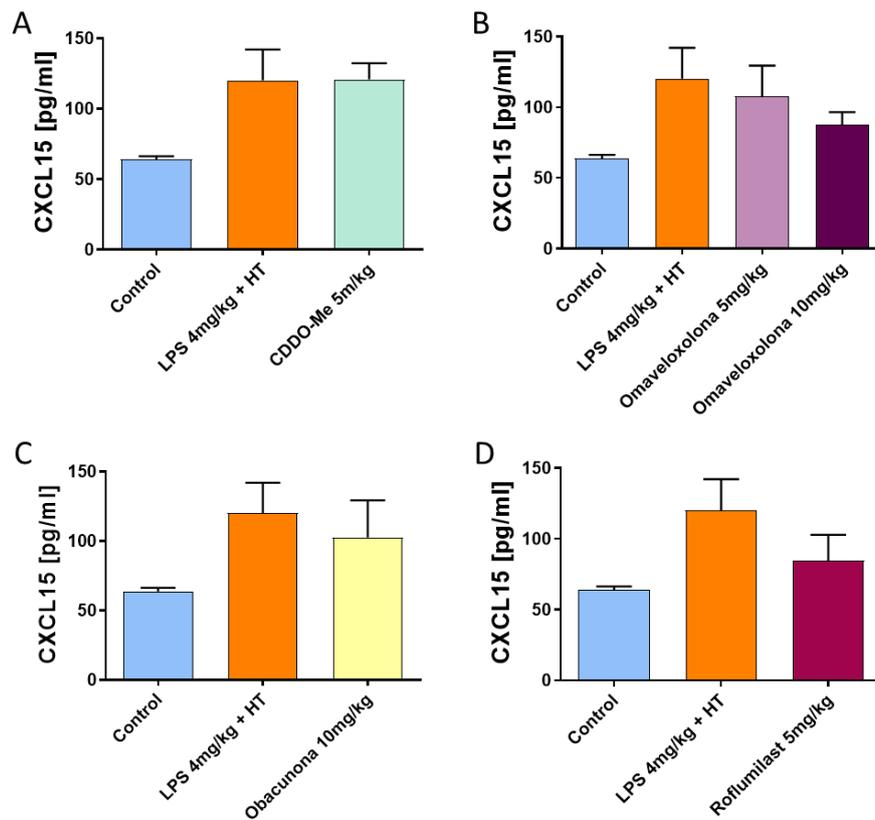


Figura 95. Liberación del marcador inflamatorio CXCL15 en LBA del modelo murino exacerbación de la EPOC. El lavado broncoalveolar se aisló durante la necropsia de todos los grupos del modelo murino. Mediante la técnica de ELISA se determinó la concentración del marcador inflamatorio en todos los grupos. Se muestran los resultados de los fármacos activadores de NRF2, CDDO-Me (A), omaveloxolona (B) y obacunona (C) y del fármaco control, roflumilast (D). Los resultados se presentan como la media \pm SEM. Las comparaciones fueron analizadas mediante la prueba ANOVA de una vía seguido de un test post hoc de Bonferroni (* $p < 0,005$ * respecto al grupo LPS 4mg/kg + HT) Abreviaturas: HT: humo de tabaco; LPS: lipopolisacárido

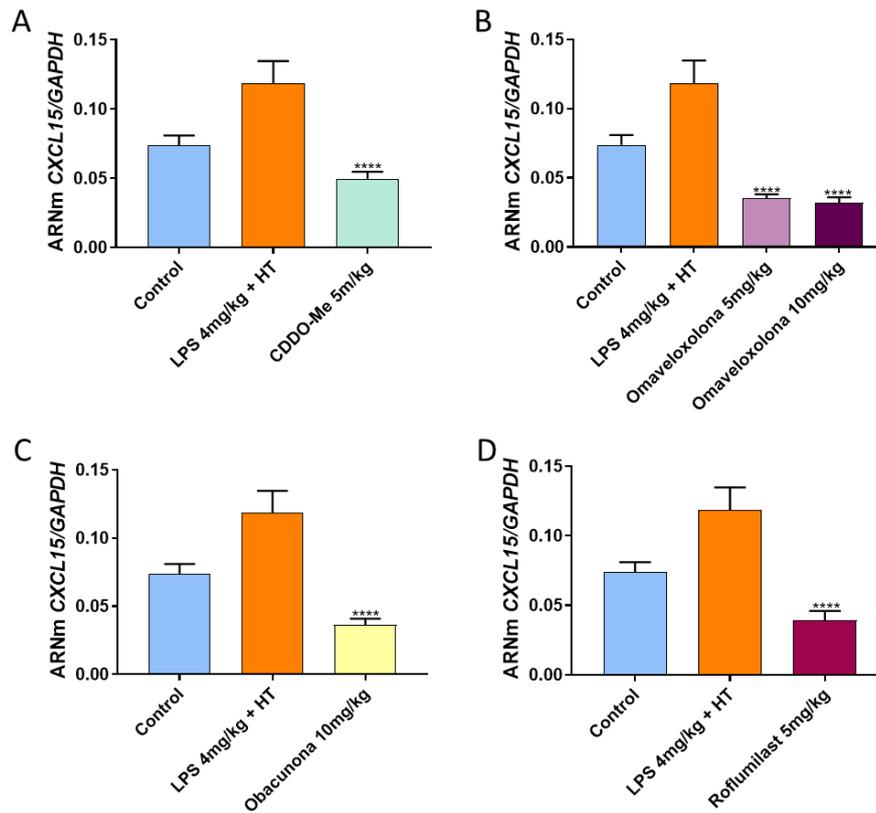


Figura 96. Expresión génica del marcador inflamatorio CXCL15 en parénquima pulmonar del modelo murino de exacerbación de la EPOC. El parénquima pulmonar se aisló tras la necropsia de todos los grupos del modelo murino. Mediante la técnica de RT-qPCR se determinó la expresión del marcador inflamatorio en todos los grupos. Se muestran los resultados de los fármacos activadores de NRF2, CDDO-Me (A), omaveloxolona (B) y obacunona (C) y del fármaco control, roflumilast (D). Los resultados se presentan como la media \pm SEM. Las comparaciones fueron analizadas mediante la prueba ANOVA de una vía seguido de un test post hoc de Bonferroni (* $p < 0,005$ * respecto al grupo LPS 4mg/kg + HT) Abreviaturas: HT: humo de tabaco; LPS: lipopolisacárido

Asimismo, estudiamos la liberación del marcador TNF- α y los resultados mostraron que la instilación con LPS y la exposición con HT generaban un aumento en la concentración en el LBA. Los fármacos mostraron, como en el caso del marcador CXCL15, una tendencia a revertir este aumento, pero la disminución no fue, en ningún caso, significativa, incluyendo el caso del fármaco control roflumilast (Figura 97). Para este marcador, los estudios de expresión génica mostraron que la administración de los estímulos ya mencionados generaba un aumento en la expresión de TNF- α . Los grupos tratados con los fármacos mostraron una disminución en los niveles de expresión de este marcador, siendo, en la mayoría de los casos, significativa (Figura 98).

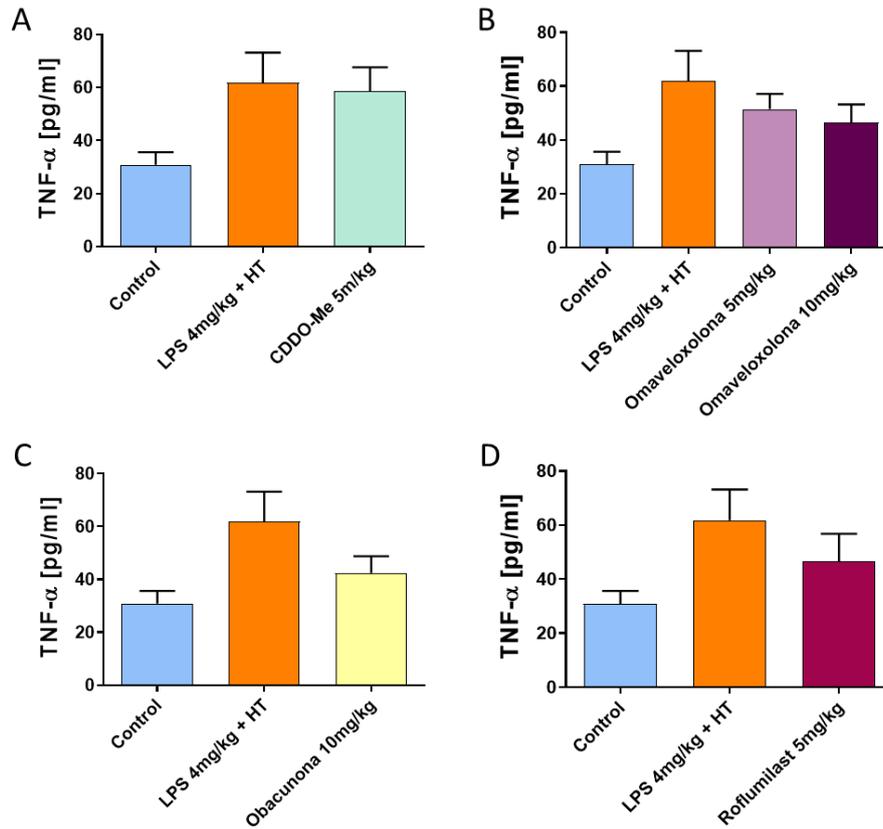


Figura 97. Liberación del marcador inflamatorio TNF- α en LBA del modelo murino de exacerbación de la EPOC. El lavado broncoalveolar se aisló durante la necropsia de todos los grupos del modelo murino. Mediante la técnica de ELISA se determinó la concentración del marcador inflamatorio en todos los grupos. Se muestran los resultados de los fármacos activadores de NRF2, CDDO-Me (A), omaveloxolona (B) y obacunona (C) y del fármaco control, roflumilast (D). Los resultados se presentan como la media \pm SEM. Las comparaciones fueron analizadas mediante la prueba ANOVA de una vía seguido de un test post hoc de Bonferroni (* $p < 0,005$ * respecto al grupo LPS 4mg/kg + HT) Abreviaturas: HT: humo de tabaco; LPS: lipopolisacárido

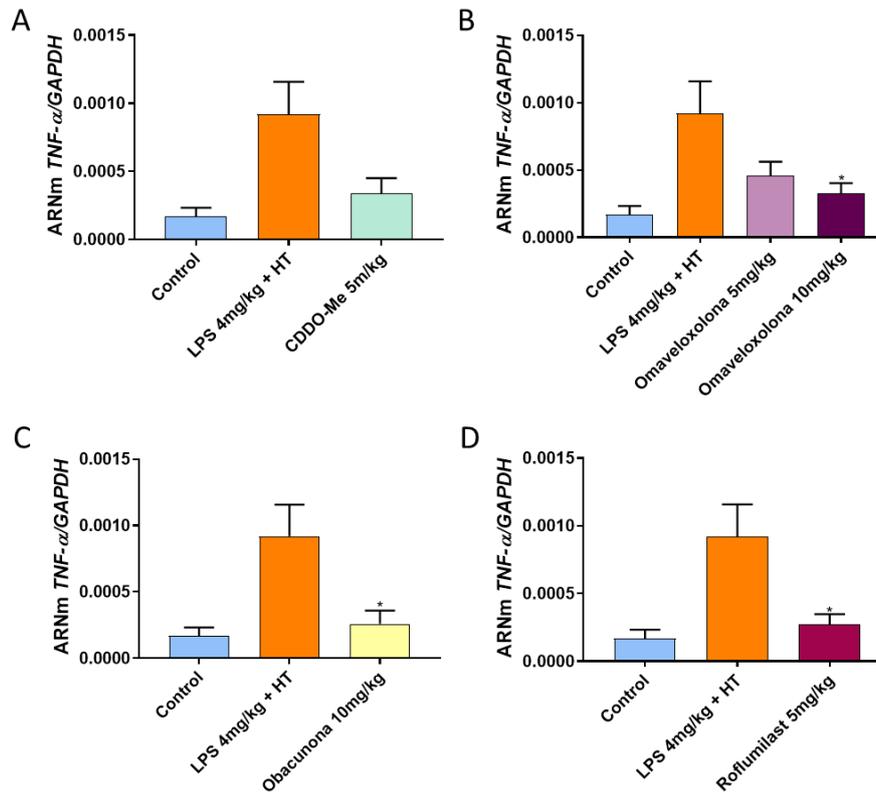


Figura 98. Expresión génica del marcador inflamatorio TNF- α en parénquima pulmonar del modelo murino de exacerbación de la EPOC. El parénquima pulmonar se aisló tras la necropsia de todos los grupos del modelo murino. Mediante la técnica de RT-qPCR se determinó la expresión del marcador inflamatorio en todos los grupos. Se muestran los resultados de los fármacos activadores de NRF2, CDDO-Me (A), omaveloxolona (B) y obacunona (C) y del fármaco control, roflumilast (D). Los resultados se presentan como la media \pm SEM. Las comparaciones fueron analizadas mediante la prueba ANOVA de una vía seguido de un test post hoc de Bonferroni (* $p < 0,005$ * respecto al grupo LPS 4mg/kg + HT). Abreviaturas: HT: humo de tabaco; LPS: lipopolisacárido

Finalmente, se analizó la concentración del marcador inflamatorio IL-1 β en el LBA y los resultados mostraron que, igual que en el resto de marcadores, el LPS y el humo de tabaco generaban un aumento de la liberación de esta interleucina en el LBA. Y aunque los fármacos mostraron, igual que en el caso de CXCL15 y TNF- α , tendencia a revertir esta liberación, las diferencias respecto al grupo LPS+HT no llegaron a ser significativas (Figura 99).

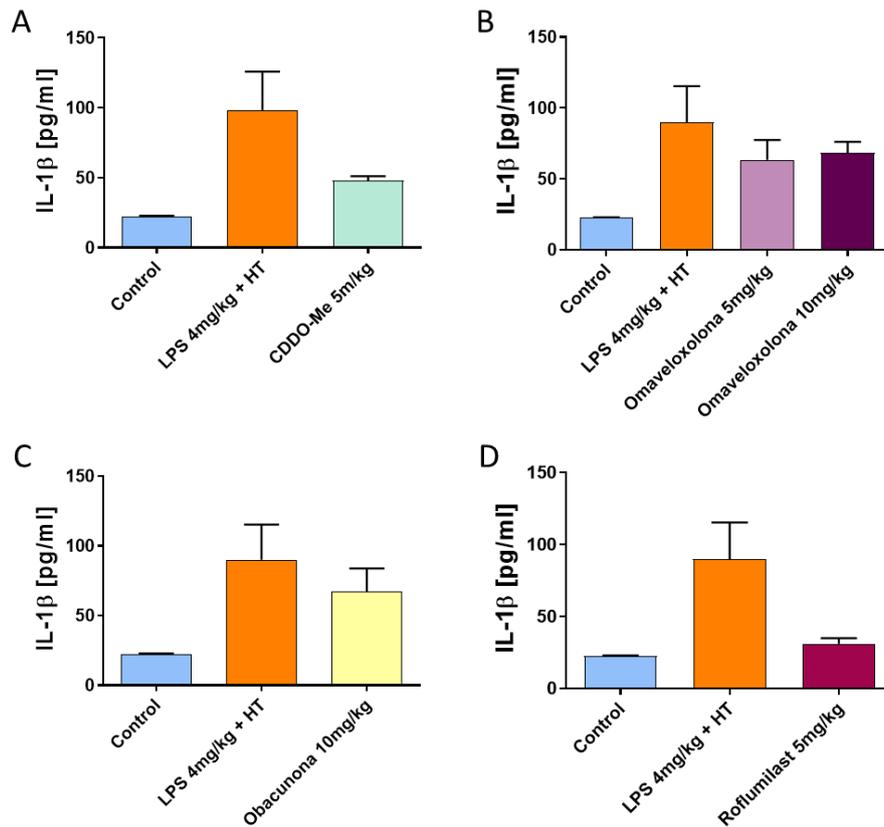


Figura 99. Liberación del marcador inflamatorio IL-1 β en LBA del modelo murino de exacerbación de la EPOC. El lavado broncoalveolar se aisló durante la necropsia de todos los grupos del modelo murino. Mediante la técnica de ELISA se determinó la concentración del marcador inflamatorio en todos los grupos. Se muestran los resultados de los fármacos activadores de NRF2, CDDO-Me (A), omaveloxolona (B) y obacunona (C) y del fármaco control, roflumilast (D). Los resultados se presentan como la media \pm SEM. Las comparaciones fueron analizadas mediante la prueba ANOVA de una vía seguido de un test post hoc de Bonferroni (* $p < 0,005$ * respecto al grupo LPS 4mg/kg + HT) Abreviaturas: HT: humo de tabaco; LPS: lipopolisacárido

10.4 Cambios histológicos generados en el modelo murino de exacerbación

Se estudiaron, asimismo, los efectos de los fármacos en la histología pulmonar, tal como se explicado para el modelo anterior. Los cambios producidos se examinaron morfológicamente y el grado de daño pulmonar se calificó en una escala de 0 a 4 (0, ausente y parece normal; 1, ligero; 2, moderado; 3, fuerte; 4, intenso).

La histología del grupo control muestra un parénquima pulmonar sano, con estructuras respiratorias y vasculares normales y un arquitectura pulmonar típica de un sujeto sano en

ausencia de enfermedad. El grupo de ratones expuestos a LPS y humo de tabaco mostró una marcada inflamación con infiltración de células inflamatorias en el espacio aéreo, una destrucción del parénquima, hemorragia y engrosamiento de las paredes alveolares. Los grupos de ratones tratados con los distintos fármacos activadores de NRF2 mostraron una notable reducción de los distintos marcadores inflamatorios. Se puede observar, además, que los ratones tratados con los fármacos omaveloxolona y obacunona mostraron un histología del parénquima pulmonar muy similar a la mostrada por los ratones controles (**Figura 100, A**). Asimismo, la calificación del daño pulmonar mostró puntuaciones elevadas para los ratones del grupo LPS+HT y esta puntuación disminuía significativamente con el tratamiento de los fármacos, especialmente el caso de la omaveloxolona y la obacunona (**Figura 100, B**).

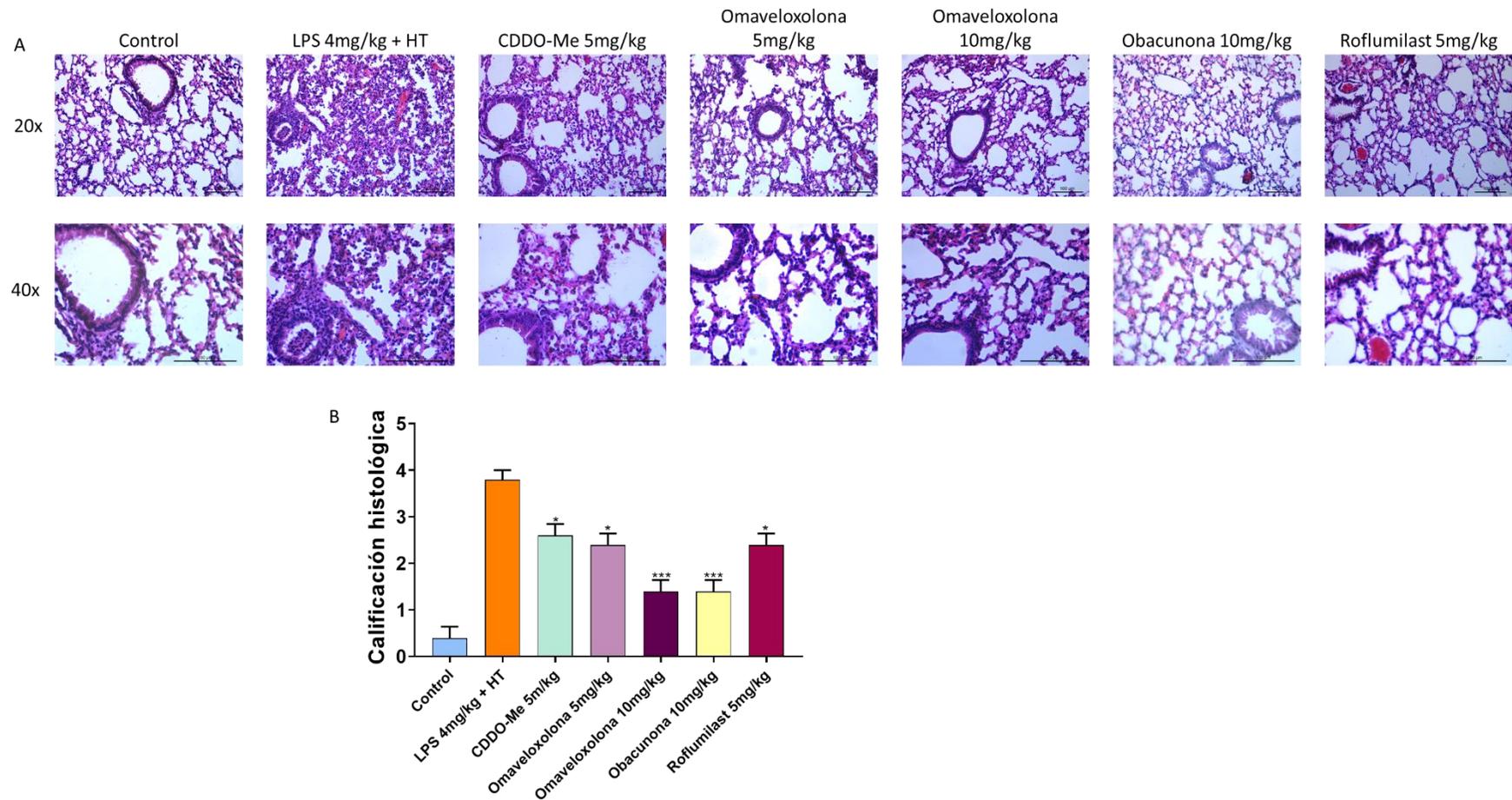


Figura 100. Los fármacos activadores de NRF2 mejoran los cambios histológicos en el parénquima pulmonar en el modelo murino de exacerbación de la EPOC. Imágenes representativas de la tinción con hematoxilina-eosina de los grupos experimentales (A), en las que se observa una marcada inflamación el grupo de LPS+HT, y una reducción de esta inflamación en los grupos de los fármacos. Calificación de la severidad del daño pulmonar (B). Los resultados se presentan como la media \pm SEM. Las comparaciones fueron analizadas mediante la prueba ANOVA de una vía seguido de un test post hoc de Bonferroni ($p < 0,005$ * respecto al grupo LPS 4mg/kg + HT). Abreviaturas: HT: humo de tabaco; LPS: lipopolisacárido

10.5 Cuantificación del tejido inflamatorio pulmonar con la técnica de imagen in vivo IVIS en el modelo de exacerbación

La combinación de la tecnología multimodal rayos X e IVIS nos permitió evaluar la progresión de la inflamación pulmonar, mientras que la técnica TC nos permitió evaluar los posibles cambios morfológicos ocurridos en el pulmón. Tal como se ha mencionado en el apartado de metodología, los ratones fueron sometidos a pruebas TC a día 0 (antes de la inducción de la enfermedad) y a día 6 (antes de llevar a cabo el punto final). Esto nos permitió hacer análisis densiométricos del entorno pulmonar. Asimismo, se llevó a cabo la técnica de imagen IVIS a día 0 y 6 que nos permitió determinar la señal del agente fluorescente ProSense® 680 tras su activación por la acción de las diferentes proteasas implicadas en la EPOC, por lo que a mayor señal de fluorescencia, más activación de las proteasas, mayor inflamación y mayor inducción de la enfermedad.

Las imágenes obtenidas con la técnica TC fueron analizadas y cuantificadas mediante la determinación de los VOI, que correspondían a la región pulmonar. Se observó que en este caso la cuantificación medida en Unidades Hounsfields se mantenía constante a lo largo del procedimiento en cada uno de los grupos (datos no mostrados). Esto es debido a que al tratarse de un modelo de inflamación aguda, no da tiempo a que se produzca el remodelado pulmonar alterando la morfología pulmonar. Tal como se puede ver en la **Figura 101, A**, no existen cambios morfológicos entre el control y el resto de los grupos a día 6. Por otro lado, la técnica IVIS nos permitió observar el proceso inflamatorio. La **Figura 101, B y C**, muestra una representación cualitativa y cuantitativa de las imágenes obtenidas con esta técnica. Se cuantificó la fluorescencia emitida por el agente en las regiones ROI, que engloban la región pulmonar, obtenidas a partir de las imágenes de rayos X. A mayor activación del agente, mayor emisión de fluorescencia y más cercano el color al amarillo. Tal como se puede observar en las imágenes y en la cuantificación, la instilación con LPS y la posterior exposición con humo de tabaco desencadenaron una significativa activación del agente fluorescente, lo que corrobora una correcta inducción de la enfermedad. Se observó que el tratamiento con los fármacos revertía esta activación, alcanzando niveles equivalentes a los del grupo control, lo que significaba un descenso de la inflamación generada por el LPS y el humo de tabaco. Asimismo, en la **Figura 119, D**, se pueden observar las imágenes obtenidas por la técnica IVIS de los pulmones obtenidos tras la necropsia. En ella se observa una mayor emisión de fluorescencia en el grupo LPS+HT, mientras que esta fluorescencia es menor en los grupos de los fármacos.

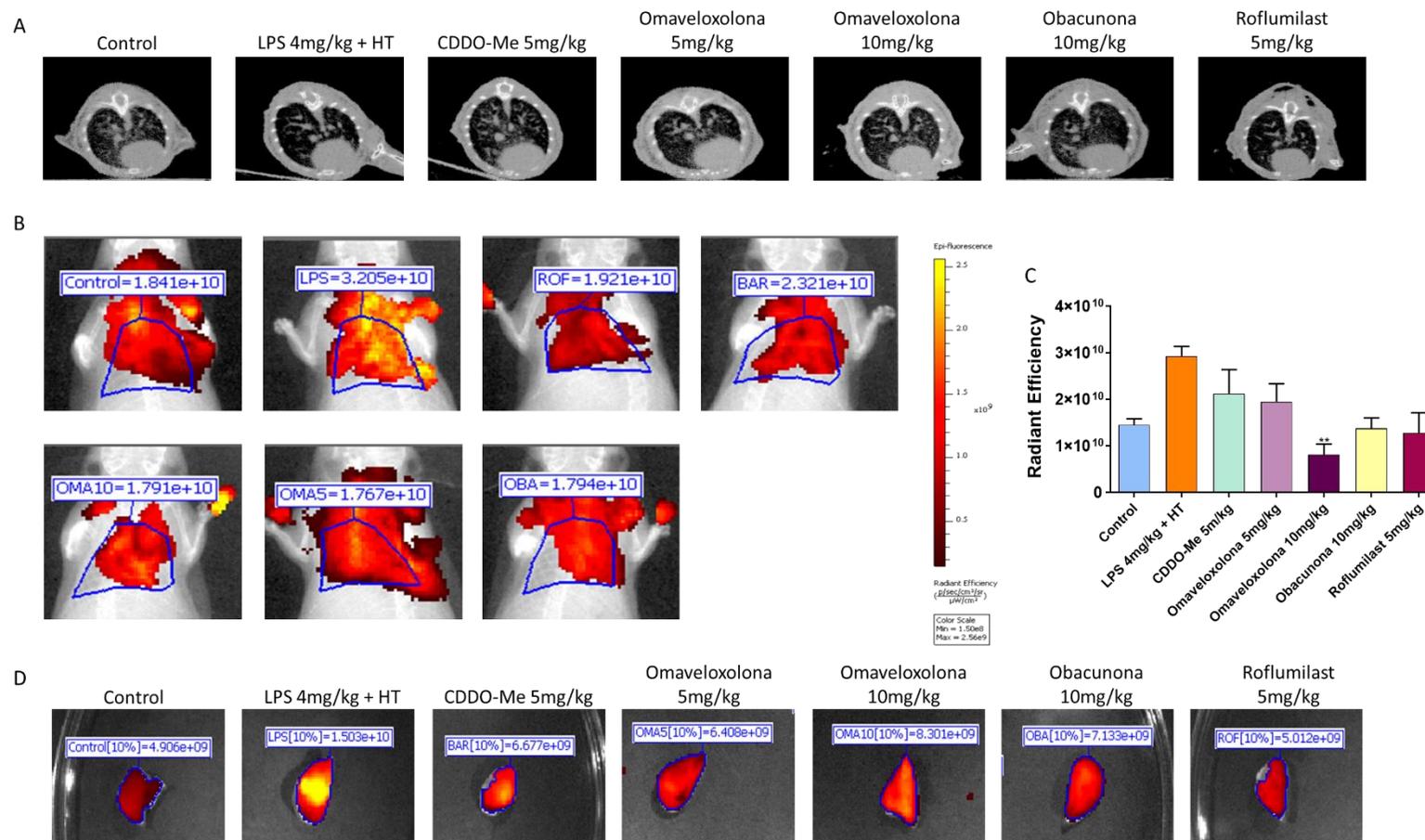


Figura 101. Efectos de los fármacos en la progresión de la inflamación mediante análisis de imagen por TC e IVIS. Análisis cualitativo de imágenes TC de la morfología pulmonar (A), al tratarse de un proceso inflamatorio agudo no hay cambios morfológicos reseñables. Análisis cualitativo (B) y cuantitativo (C) de imágenes obtenidas mediante la técnica multimodal IVIS. Se cuantifica la fluorescencia emitida por el agente ProSense® 680 tras su activación por la acción de las proteasas implicadas en la EPOC. A mayor fluorescencia, mayor inflamación. La administración de LPS y posterior exposición a humo de tabaco generan un incremento en la fluorescencia emitida, que es revertida por los fármacos activadores de NRF2. Análisis cualitativo (D) de imágenes de los pulmones una vez extraídos tras la necropsia obtenidas mediante la técnica IVIS. Los resultados se presentan como la media ± SEM. Las comparaciones fueron analizadas mediante la prueba ANOVA de una vía seguido de un test post hoc de Bonferroni (* p<0,005 * respecto al grupo LPS 5mg/kg LPS 4mg/kg + HT). Abreviaturas: HT: humo de tabaco; LPS: lipopolisacárido

10.6 Efecto antioxidante en el modelo de exacerbación

A continuación procedimos a estudiar el efecto antioxidante de los fármacos activadores de NRF2 mediante expresión génica y proteica del factor NRF2 y de las enzimas implicadas en la ruta antioxidante. Para ello se realizaron de RT-qPCR y de western blot a partir del parénquima pulmonar de cada ratón.

Estudiamos en primer lugar la expresión génica de *NRF2*, para comprobar, como habíamos hecho en los ensayos *in vitro* y en el anterior modelo, si los fármacos activaban también la expresión génica de NRF2 y no solo lo activaban. Observamos que la exposición a LPS y humo de tabaco generaba una disminución en la expresión de *NRF2* respecto al grupo control, esto también ocurría en el modelo de inflamación pulmonar aguda. Asimismo, los fármacos era capaces de revertir este efecto mediante el aumento de la expresión. Sin embargo, en el grupo tratado con CDDO-Me no se encontraron diferencias significativas, igual que ocurría en el modelo de inflamación pulmonar aguda, mientras que en el resto de activadores de NRF2 sí. En el grupo tratado con roflumilast no se observó que este fármaco aumentara la expresión del factor NRF2, algo imaginable ya que no es su activador (**Figura 102**).

Se procedió a estudiar, a continuación, la expresión génica y la expresión proteica de las enzimas antioxidantes ya estudiadas en esta tesis, HO-1 y NQO1. Se observó que la instilación con LPS y la exposición al humo de tabaco provocaban un aumento de la expresión génica de *HO-1*, aunque no era un aumento significativo. Asimismo, observamos que los fármacos activadores de NRF2 eran capaces de aumentar su expresión a niveles significativos. Sin embargo, en el caso de la omaveloxolona no encontramos diferencias significativas. Por otra parte, como era esperable, el roflumilast no aumento los niveles de expresión de esta enzima (**Figura 103**).

En cuanto a la expresión proteica, se obtuvieron resultados similares a los obtenidos en los ensayos de expresión génica. La estimulación con LPS y humo de tabaco generaba un aumento de la expresión proteica de HO-1 y los fármacos activadores de NRF2 aumentaban, en la mayoría de los casos, de forma significativa la expresión de HO-1 respecto al grupo LPS+HT. Igual que en los ensayos de expresión génica, el fármaco roflumilast no era capaz de aumentar de forma significativa la expresión de HO-1 (**Figura 104**).

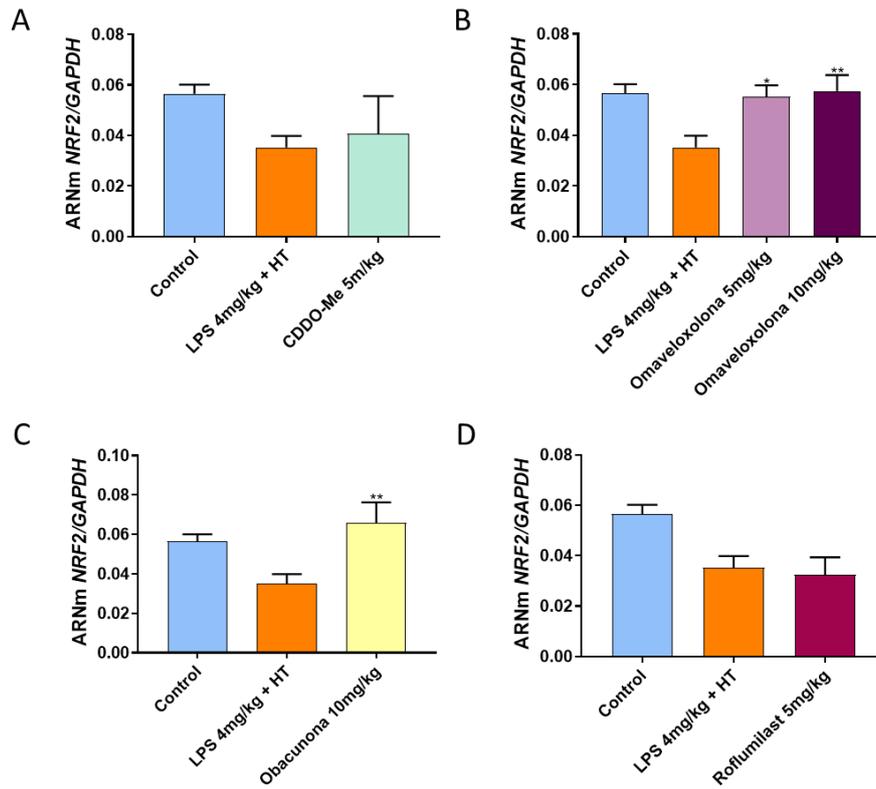


Figura 102. Expresión génica de NRF2 en parénquima pulmonar aislado del modelo murino de exacerbación de la EPOC. El parénquima pulmonar se aisló tras la necropsia de todos los grupos del modelo murino. Mediante la técnica de RT-qPCR se determinó la expresión del gen con la sonda correspondiente en todos los grupos. Se muestran los resultados de los fármacos activadores de NRF2, CDDO-Me (**A**), omaveloxolona (**B**) y obacunona (**C**) y del fármaco control, roflumilast (**D**). La instilación con LPS y la sucesiva exposición con humo de tabaco disminuyen la expresión de NRF2 y los fármacos activadores son capaces de revertir esta situación. Los resultados se presentan como la media \pm SEM. Las comparaciones fueron analizadas mediante la prueba ANOVA de una vía seguido de un test post hoc de Bonferroni (* $p < 0,005$ * respecto al grupo LPS 4mg/kg + HT) Abreviaturas: HT: humo de tabaco; LPS: lipopolisacárido

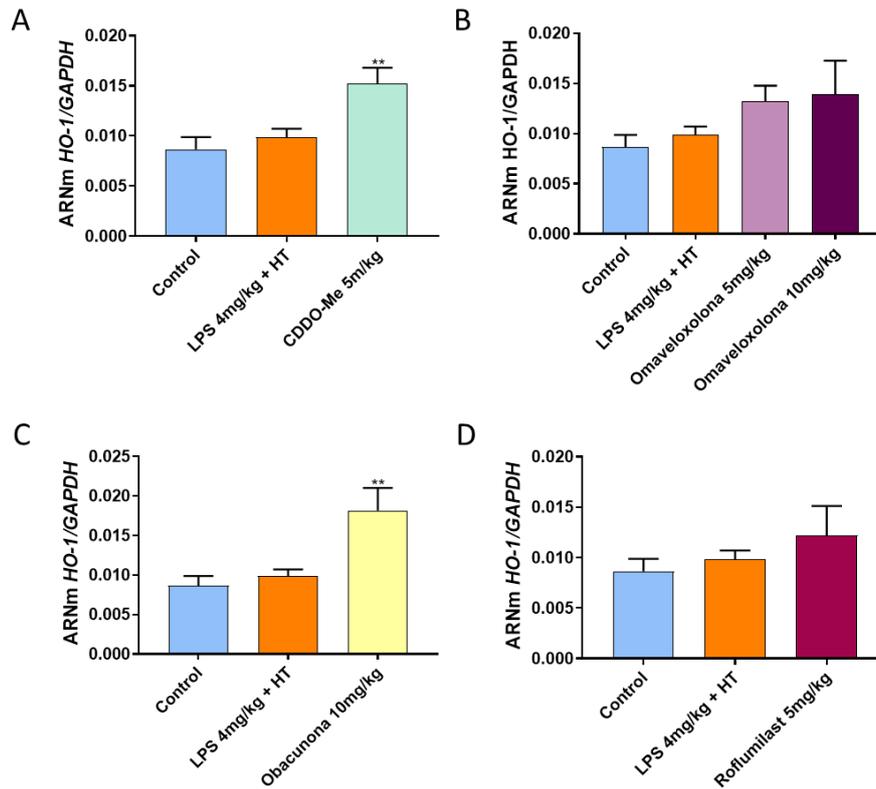


Figura 103. Expresión génica de HO-1 en parénquima pulmonar aislado del modelo murino de exacerbación de la EPOC. El parénquima pulmonar se aisló tras la necropsia de todos los grupos del modelo murino. Mediante la técnica de RT-qPCR se determinó la expresión del gen con la sonda correspondiente en todos los grupos. Se muestran los resultados de los fármacos activadores de NRF2, CDDO-Me (**A**), omaveloxolona (**B**) y obacunona (**C**) y del fármaco control, roflumilast (**D**). La instilación con LPS y la sucesiva exposición con humo de tabaco aumentan ligeramente la expresión de HO-1 y los fármacos activadores son capaces de aumentar de forma más significativa su expresión. Los resultados se presentan como la media \pm SEM. Las comparaciones fueron analizadas mediante la prueba ANOVA de una vía seguido de un test post hoc de Bonferroni (* $p < 0,005$ * respecto al grupo LPS 4mg/kg + HT) *Abreviaturas: HT: humo de tabaco; LPS: lipopolisacárido*

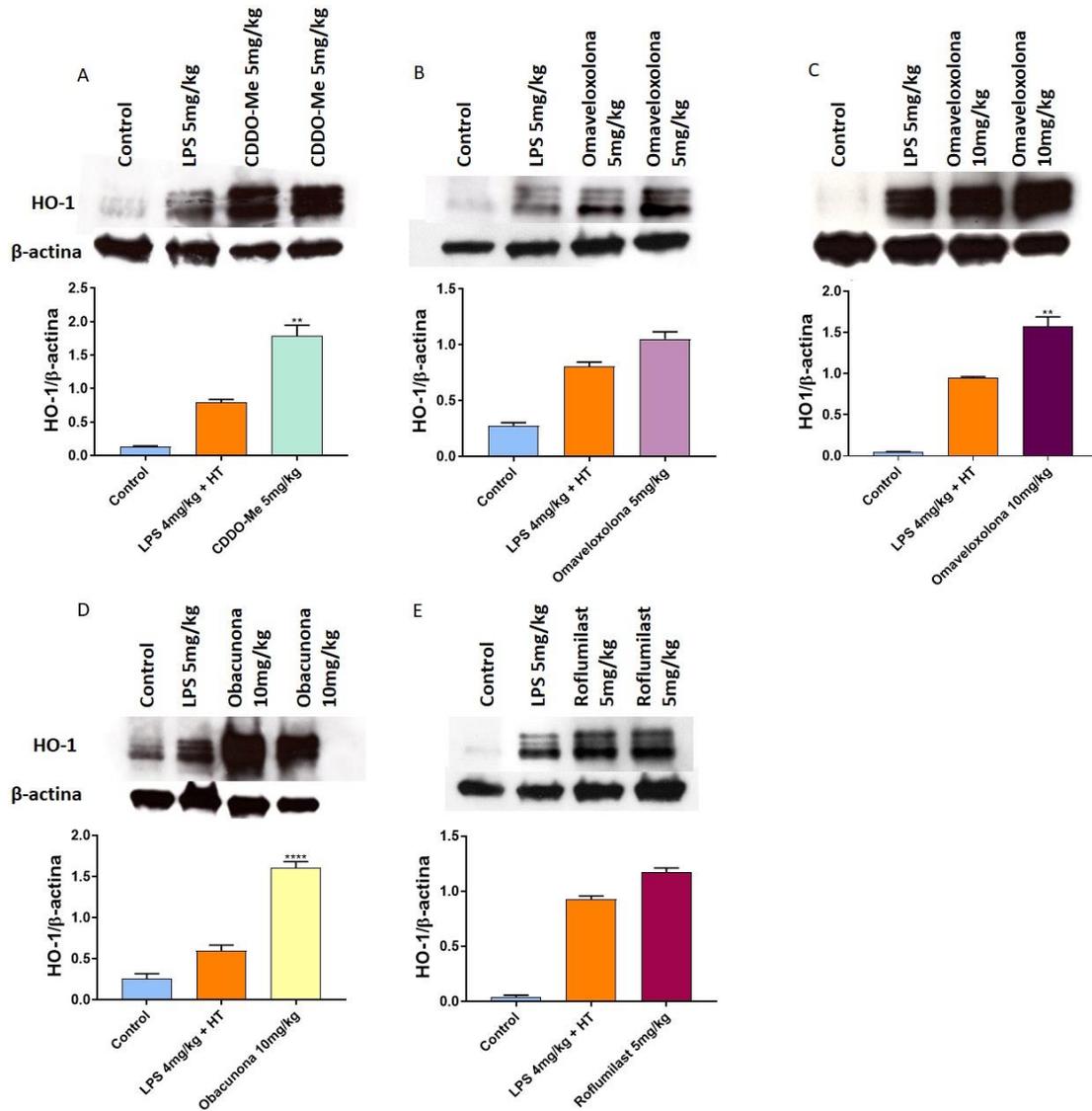


Figura 104. Expresión proteica de HO-1 en parénquima pulmonar aislado del modelo murino de exacerbación de la EPOC. El parénquima pulmonar se aisló tras la necropsia de todos los grupos del modelo murino. Mediante la técnica de western blot se determinó la expresión de la proteína con el anticuerpo correspondiente en todos los grupos. Se muestran los resultados de los fármacos activadores de NRF2, CDDO-Me (A), omaveloxolona (B y C) y obacunona (D) y del fármaco control, roflumilast (E). La instilación con LPS y la sucesiva exposición con humo de tabaco aumentan la expresión de HO-1 y los fármacos activadores son capaces de aumentar de forma significativa su expresión. Los resultados se presentan como la media ± SEM. Las comparaciones fueron analizadas mediante la prueba ANOVA de una vía seguido de un test post hoc de Bonferroni (* p<0,005 * respecto al grupo LPS 4mg/kg + HT). Abreviaturas: HT: humo de tabaco; LPS: lipopolisacárido.

Como se ha mencionado arriba, también se realizaron ensayos para el estudio de la expresión génica y proteica de la enzima NQO1. Estos resultados mostraron que la instilación con LPS y la exposición subsiguiente con humo de tabaco disminuía de forma significativa los niveles de

expresión génica y proteica de NQO1. Esto difería con lo observado *in vitro* y para la otra enzima, HO-1, sin embargo, concuerda perfectamente con lo visto en el modelo animal de inflamación pulmonar aguda. Tal como se puede observar en las Figuras 105 y 106, los fármacos activadores de NRF2 revertían el descenso de la expresión de NQO1 y lo aumentaban de forma significativa, superando los niveles obtenidos en el grupo control. Por el contrario, pero como era esperable, en el grupo tratado con roflumilast no se observó un reversión de la situación.

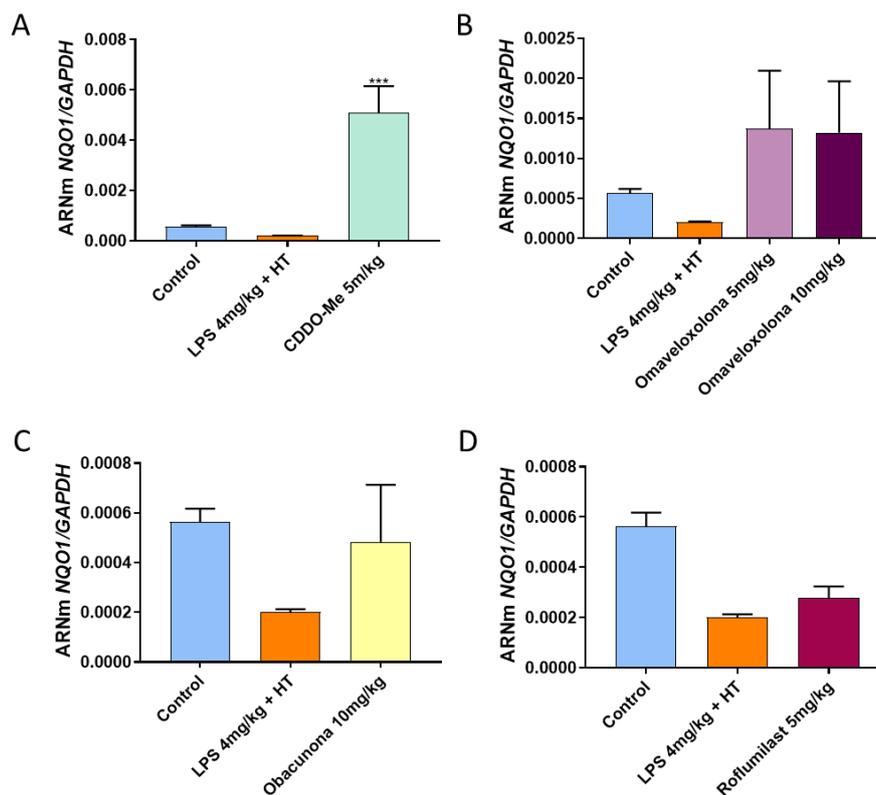


Figura 105. Expresión génica de NQO1 en parénquima pulmonar aislado del modelo murino de exacerbación de la EPOC. El parénquima pulmonar se aisló tras la necropsia de todos los grupos del modelo murino. Mediante la técnica de RT-qPCR se determinó la expresión del gen con la sonda correspondiente en todos los grupos. Se muestran los resultados de los fármacos activadores de NRF2, CDDO-Me (A), omaveloxolona (B) y obacunona (C) y del fármaco control, roflumilast (D). La instilación con LPS y la sucesiva exposición con humo de tabaco disminuyen la expresión la expresión de NQO1 y los fármacos activadores son capaces de revertir esta situación. Los resultados se presentan como la media \pm SEM. Las comparaciones fueron analizadas mediante la prueba ANOVA de una vía seguido de un test post hoc de Bonferroni (* $p < 0,005$ * respecto al grupo LPS 4mg/kg + HT) Abreviaturas: HT: humo de tabaco; LPS: lipopolisacárido

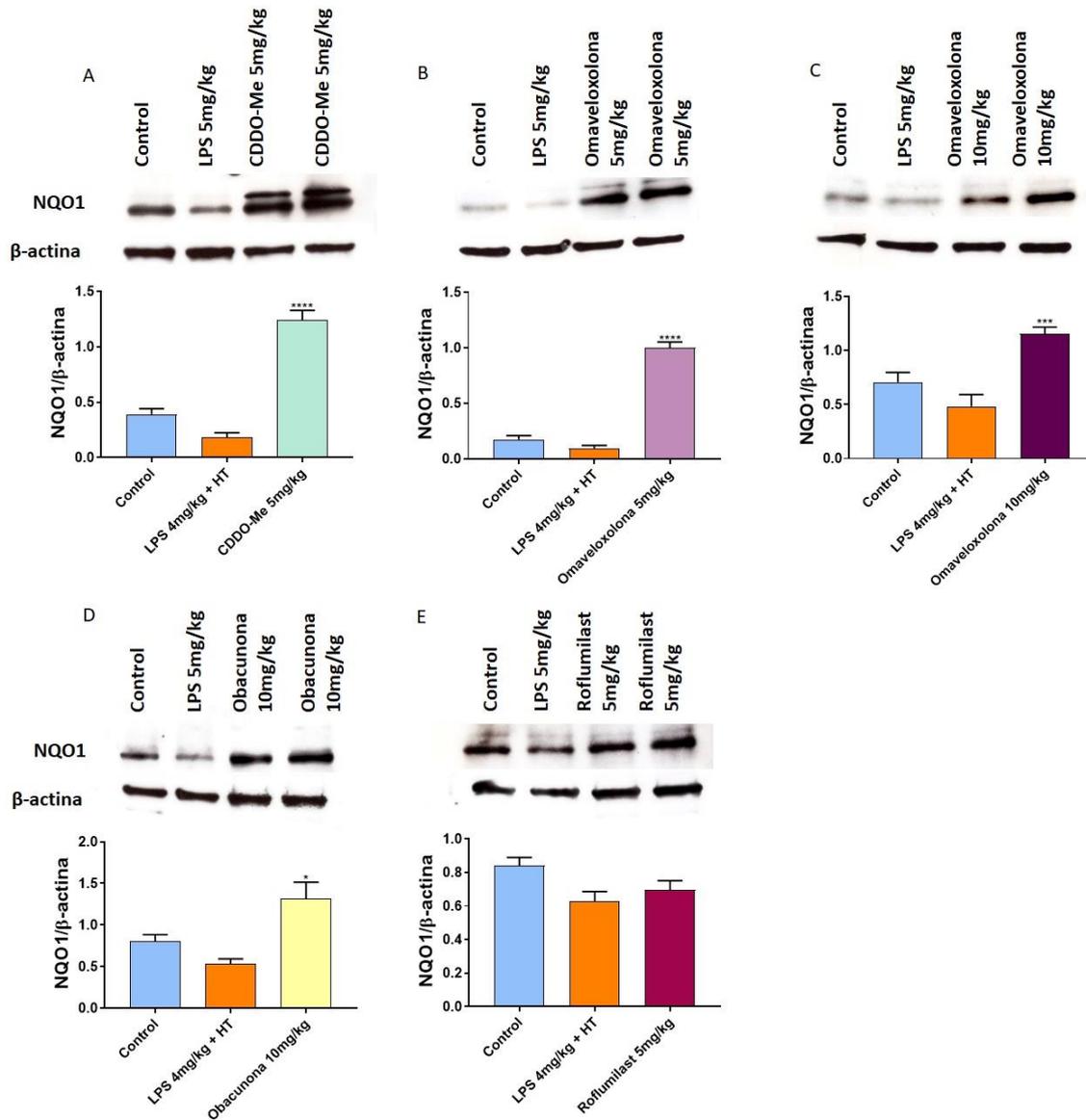


Figura 106. Expresión proteica de NQO1 en parénquima pulmonar aislado del modelo murino de exacerbación de la EPOC. El parénquima pulmonar se aisló tras la necropsia de todos los grupos del modelo murino. Mediante la técnica de western blot se determinó la expresión de la proteína con el anticuerpo correspondiente en todos los grupos. Se muestran los resultados de los fármacos activadores de NRF2, CDDO-Me (A), omaveloxolona (B y C) y obacunona (D) y del fármaco control, roflumilast (E). La instilación con LPS y la sucesiva exposición con humo de tabaco disminuyen la expresión de NQO1 y los fármacos activadores son capaces de revertir esta situación y aumentar de forma significativa su expresión. Los resultados se presentan como la media \pm SEM. Las comparaciones fueron analizadas mediante la prueba ANOVA de una vía seguido de un test post hoc de Bonferroni (* $p < 0,005$ * respecto al grupo LPS 4mg/kg + HT). Abreviaturas: HT: humo de tabaco; LPS: lipopolisacárido

Por último, estudiamos la expresión génica de la *iNOS*, ya que como se ha mencionado arriba su expresión puede estar mediada por NRF2 y tiene gran implicación en el estrés oxidativo. En este caso, la instilación con LPS y la sucesiva exposición con humo de tabaco generó un incremento significativo en la expresión de *iNOS*. Además, los fármacos eran capaces de revertir este efecto, disminuyendo la expresión a niveles casi similares a los del grupo control. En este caso, el roflumilast sí que es capaz de revertir este efecto (**Figura 107**).

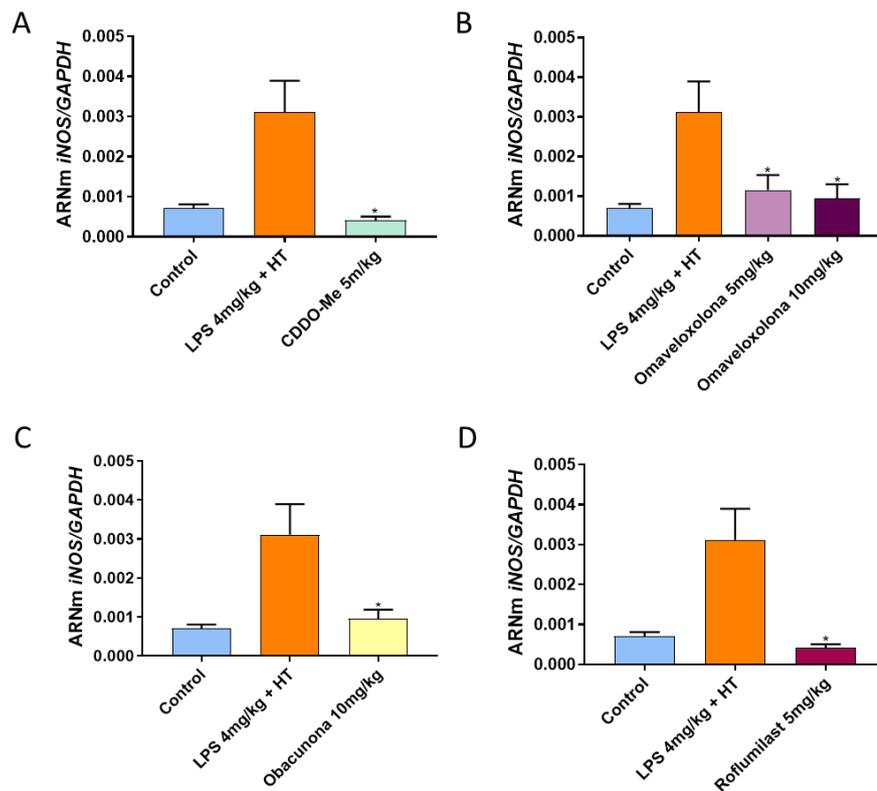


Figura 107. Expresión génica de *iNOS* en parénquima pulmonar aislado del modelo murino de exacerbación de la EPOC. El parénquima pulmonar se aisló tras la necropsia de todos los grupos del modelo murino. Mediante la técnica de RT-qPCR se determinó la expresión del gen con la sonda correspondiente en todos los grupos. Se muestran los resultados de los fármacos activadores de NRF2, CDDO-Me (**A**), omaveloxolona (**B**) y obacunona (**C**) y del fármaco control, roflumilast (**D**). La instilación con LPS y la sucesiva exposición con humo de tabaco aumentan la expresión de *iNOS* y los fármacos activadores son capaces de revertir esta situación y disminuir de forma más significativa su expresión. Los resultados se presentan como la media \pm SEM. Las comparaciones fueron analizadas mediante la prueba ANOVA de una vía seguido de un test post hoc de Bonferroni (* $p < 0,005$ * respecto al grupo LPS 4mg/kg + HT). Abreviaturas: HT: humo de tabaco; LPS: lipopolisacárido.

DISCUSIÓN

I. Expresión del sistema NRF2 en pacientes EPOC

La EPOC está caracterizada por un elevado nivel de estrés oxidativo, generado principalmente por la exposición al humo de tabaco, uno de los principales factores de riesgo de la enfermedad ¹¹⁰. El sistema NRF2 es uno de los principales rutas con acción antioxidante, ya que lleva a la activación de la expresión de numerosas enzimas antioxidantes ^{329,332,337}. Evidencias experimentales en esta tesis confirman, como se constata en otros muchos estudios ^{301,362-365,478-480}, que los niveles de expresión génica de los genes implicados en la ruta NRF2, así como la de enzimas antioxidantes reguladas por esta ruta, HO-1, NQO1 y GPx1, se encuentran disminuidos en los pacientes EPOC en comparación a sujetos sanos.

En este trabajo de investigación hemos utilizado para el estudio de la expresión, tejido pulmonar procedente del parénquima pulmonar de pacientes en los estadios más altos de la enfermedad, pero también hemos hecho uso de neutrófilos de sangre periférica, ya que se trata de una enfermedad sistémica donde no solo el aparato respiratorio se ve afectado. Hemos podido comprobar con estos estudios que en neutrófilos de sangre periférica la expresión de los genes implicados en la ruta NRF2 y de sus genes antioxidantes está disminuida y esta expresión disminuye de manera inversamente proporcional a la gravedad de la enfermedad. Ensayos inmunohistoquímicos realizados con parénquima pulmonar de pacientes EPOC y sano también han confirmado estos resultados. Estos resultados refuerzan la idea de que existe un elevado estrés oxidativo en los pulmones de pacientes EPOC.

Sin embargo, a pesar de que muchos estudios concuerdan con los resultados obtenidos en esta tesis, existen algunos trabajos que han demostrado que NRF2 y enzimas antioxidantes reguladas por este se encuentran sobre expresadas tanto en células mononucleares de células periféricas como en células procedentes de tejido pulmonar ^{199,481,482}. Esto puede deberse, principalmente, a los sujetos de estudio. En parte de estos estudios se emplean muestras procedentes de pacientes con los estadios más leves de la enfermedad. En nuestro caso, sin embargo, se han empleado muestras procedentes principalmente de los estadios más tardíos y graves y los resultados han mostrado que la expresión disminuye conforme empeora la enfermedad. Por lo que puede que a estadios más tempranos, como el GOLD1 y 2, la expresión de la ruta NRF2 no se vea tan afectada y su expresión aumente como defensa frente al estrés oxidativo generado por el consumo de tabaco. Esto ocurre con los fumadores sanos, en lo que la expresión de NRF2 se ve aumentada ^{483,484}. Finalmente, puede que el estrés oxidativo continuado en los pacientes EPOC acabe por afectar a la expresión y funcionamiento de la ruta NRF2. Resultados similares se han encontrado para pacientes con silicosis, en los que la expresión de NRF2 en pacientes en estadio I es mayor que en los sujetos sanos mientras que en pacientes en estadio II y III la expresión es menor que en los sujetos sanos ⁴⁸⁵.

2. Evidencias *in vitro* sobre la eficacia de los fármacos en modelos celulares de estrés oxidativo

Con el objetivo de determinar los fármacos con mayor potencial, se ha realizado un cribado de diferentes compuestos ya conocidos como activadores de NRF2 o que pudieran serlo. Para poder seleccionar los fármacos más idóneos se ha determinado el potencial antioxidante mediante la medición de los niveles de GSH. Este antioxidante de bajo peso molecular juega un papel fundamental en la protección frente al estrés oxidativo. Evidencias experimentales en este trabajo demuestran que los pacientes EPOC tienen los niveles disminuidos de GSH totales tanto en células epiteliales bronquiales como en neutrófilos de sangre periférica, lo que concuerda con estudios previamente publicados⁴⁸⁶ y corrobora la disminución de la capacidad antioxidante de los pacientes EPOC. Se ha demostrado, además, que NRF2 regula la homeostasis del GSH a través de su síntesis *de novo* y mediante la modulación de su estado redox^{339,487}. Por lo tanto tiene sentido que los pacientes EPOC tengan menores niveles de GSH, ya que también tienen reducidos niveles de expresión de NRF2. Asimismo, hemos podido demostrar que la exposición a EHT al 3%, durante únicamente 1h, produce un descenso en los niveles de GSH, esto concuerda con trabajos anteriores en los que se ha visto que la exposición a condensado de humo de tabaco de células epiteliales y pulmones de rata produce una reducción inicial de los niveles de GSH¹⁹³. Esto puede deberse a que las células, en sus horas iniciales de exposición al humo de tabaco, consume el GSH que tiene disponible, disminuyendo sus niveles, cuando la exposición al humo de tabaco se prolonga en el tiempo, se activan defensas antioxidantes que hacen aumentar la biosíntesis de GSH y modular su estado redox. Todo esto convierte al GSH en un indicador ideal y rápido del potencial antioxidante de los activadores de NRF2, ya que la activación de este factor generaría un aumento en los niveles de GSH al estar implicado en su regulación y biosíntesis.

Por este motivo, en este proyecto de investigación se han llevado a cabo ensayos de los niveles de GSH para seleccionar los fármacos más idóneos. Se han testado compuestos de muy diversa naturaleza, como son electrofílicos, no electrofílicos, naturales y compuestos peptídicos. De todos los compuestos a testar, se han seleccionado, por su capacidad de proteger a las células epiteliales bronquiales de línea frente a la reducción de GSH generada por EHT, cuatro fármacos: CDDO-Me (bardoxolona metil, RTA-402), omaveloxolona (RTA-408), obacunona y el péptido LAS200813:8 cedido por la empresa Ammirall. Estos cuatro fármacos han evidenciado un gran potencial antioxidante frente a muchos otros fármacos testados.

La capacidad de prevenir la disminución en los niveles de GSH debida a la exposición al EHT también ha sido testada en células epiteliales bronquiales primarias procedentes de sujetos sanos y EPOC y en monocitos, donde se ha demostrado que también en estos tipos celulares los fármacos seleccionados son capaces de proteger frente a la reducción de GSH. Esto puede deberse a que el previo tratamiento con los fármacos activa la ruta NRF2 lo que hace aumentar la biosíntesis de GSH, incrementando así las reservas disponibles, y regular el estado redox. Asimismo, se han determinado para cada uno de los compuestos y para cada tipo celular sus CE50, lo que nos permite comparar en cierta medida la potencia de los fármacos. En cuanto a los niveles de GSH, el fármaco CDDO-Me y la omaveloxolona han mostrado ser los compuestos

con menores CE50 y por lo tanto, ser los más potentes. Seguidos muy de cerca del péptido LAS200813:8. Sin embargo, debemos tener en consideración que el compuesto obacunona es un compuesto natural y que por este motivo se requiere de mayores concentraciones con lo que sus CE50 son de órdenes mucho mayores. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en otros estudios publicados donde la CDDO-Me aumenta los niveles de GSH en queratinocitos y en un modelo *in vivo* de endometriosis^{488,489}. Asimismo, estudios previos también han demostrado la capacidad de aumentar los niveles de GSH de la omaveloxolona en modelos tanto *in vitro* como *in vivo* de Ataxia de Friedreich, piel, asma y daño agudo renal^{397,402,490,491}, así como de la obacunona en el modelo *in vitro* de nefropatía diabética⁴²⁷.

En lo referente al efecto de los fármacos en la liberación de GSH también se ha estudiado la comparación entre el efecto en células procedentes de pacientes EPOC y en células de sujetos sanos. Los resultados demuestran que los fármacos tienen perfiles muy similares en ambos tipos celulares y no existen diferencias reseñables en su efecto. Por lo que en cuanto a la liberación de GSH en células epiteliales, los activadores de NRF2 tienen el mismo efecto en pacientes EPOC que en sujetos sanos, a pesar de que los pacientes EPOC suelen tener una menor expresión de NRF2.

Una de las características más importantes de la EPOC es el elevado estrés oxidativo al que están sometidos los pulmones de los pacientes¹⁷³⁻¹⁷⁵. Este estrés oxidativo es resultado de un desequilibrio entre la producción de ERO y las defensas antioxidantes, en la EPOC el humo de tabaco es la mayor fuente de oxidantes, sin embargo, el estrés oxidativo persiste incluso tras dejar de fumar, por lo que es también resultado indirecto de la liberación de ERO de origen celular^{170,173,175,179}. Numerosos estudios, incluyendo esta tesis, han demostrado que la exposición a EHT aumenta significativamente los niveles de ERO⁴⁹²⁻⁴⁹⁶. Una buena terapia farmacológica para la EPOC debe aumentar las defensas antioxidantes así como producir un descenso remarcable en los niveles de ERO. Por todo ello, para continuar con el estudio del potencial antioxidante de los fármacos seleccionados se han realizado ensayos para cuantificar los niveles de ERO tras la exposición a EHT y previo tratamiento con los activadores en células epiteliales bronquiales tanto de línea como primarias. Estos ensayos han demostrado que la activación de NRF2 mediada por estos compuestos es capaz de prevenir la liberación de ERO generada por el EHT al 5%, llegando incluso a niveles del control. En este caso parece que es el compuesto obacunona el que consigue mayores porcentajes de inhibición, a pesar de que su CE50 sea mayor al tratarse de un compuesto natural que requiere de concentraciones de orden de micromolar. Los resultados obtenidos con la CDDO-Me concuerdan con los previamente publicados sobre este mismo compuesto o derivados, donde estos triterpenoides reducen los niveles de ERO⁴⁹⁷⁻⁵⁰³. Sin embargo existen varios estudios en los que se demuestra que el tratamiento de corta duración (1h a 6h) con CDDO-Me aumenta la liberación de ERO^{497,504-508}. Por lo que, este compuesto puede tener una acción dual en la que en exposiciones agudas puede aumentar los niveles de ERO y en exposiciones de larga duración las disminuya por la activación de NRF2. Asimismo, también se ha visto que la activación de NRF2 y de enzimas antioxidantes puede deberse a la inducción transitoria de ERO^{508,509}. Por lo tanto, CDDO-Me puede activar a NRF2 no solo por su interacción directa con KEAP1 sino también a través de la inducción de ERO. Por otro lado, aunque se han realizado menos estudios con el fármaco omaveloxolona, los resultados obtenidos en esta tesis concuerdan con los obtenidos previamente en otros tipos celulares, modelos animales o enfermedades^{394,395,402,490,491,510,511}. Los estudios sobre la

reducción de las ERO empelando la obacunona son diversos y los resultados de todos ellos, a pesar de utilizar células y modelos diferentes, concuerdan con los de este trabajo de investigación^{423,427,428,512-514}.

Se han comparado, asimismo, los efectos de los fármacos entre células procedentes de pacientes EPOC y células de sujetos sanos. En lo que respecta a los niveles de ERO, los resultados sí que muestran diferencias entre los tipos celulares y este perfil es similar en los cuatro fármacos. En este caso, parece que los fármacos tiene mayores efectos en las células procedentes de pacientes EPOC que de sujetos sanos, esto puede deberse a los altos niveles de ERO que se encuentran en los pulmones de los pacientes EPOC. De hecho se puede observar también como la estimulación con EHT genera un incremento mayor de las ERO respecto al control en las células de pacientes EPOC. Por lo que a mayores niveles basales de ERO y mayor incremento, mayor es el porcentaje de inhibición que se lleva a cabo.

El pulmón se encarga de contrarrestar el daño inducido por las ERO mediante la activación de una variedad de defensas antioxidantes. Entre estas defensas antioxidantes se incluye el ya mencionado GSH, pero también un multitud de enzimas antioxidantes como la HO-1, la NQO1 o la GPx1, cuya expresión está regulada por NRF2^{185,186}. Estas enzimas, además, son algunas de las más analizadas en el estudio de los mecanismos y fármacos antioxidantes, por lo que se han convertido en marcadores moleculares clave. Por este motivo, para profundizar más en el estudio del potencial antioxidante de nuestros fármacos se han realizado ensayos de expresión génica y proteica para analizar la expresión tanto de NRF2 como de estas enzimas tras la exposición a EHT y previo tratamiento con los activadores en células epiteliales bronquiales y en neutrófilos. Debemos tener en consideración que el efecto o regulación del EHT en la ruta NRF2 y estas enzimas es controvertida. Algunas evidencias sugieren que el EHT aumenta la expresión de NRF2 y estas enzimas^{479,480,493,494,496,515-517}, mientras que otros estudios demuestran que, por el contrario, la exposición con EHT inhibe la expresión de NRF2 y las enzimas^{455,492,495,518}. Esto puede deberse tanto al tipo celular como al porcentaje de tabaco empleado, el tiempo de exposición, los cigarrillos empleados y al método para la obtención de EHT usado. En este trabajo hemos encontrado resultados controvertidos por si mismos. Por una parte se ha visto que la exposición a EHT en células epiteliales de línea o primarias durante 24h no modifica la expresión de NRF2, por otro lado los genes diana de NRF2, HO-1, NQO1 y GPx1 sí que están sobre expresados tras la exposición a EHT durante 24h. Esto coincide con evidencias previas realizadas en macrófagos alveolares humanos expuestos a EHT³⁶². Estos resultados indican que, en células epiteliales bronquiales humanas, la exposición a EHT aguda activa NRF2 principalmente a través de la acumulación de la proteína en el núcleo y a partir de esto regula varios genes diana de NRF2. Puede que el porcentaje de EHT o las condiciones no sean suficientes para afectar a los niveles de expresión de NRF2 como si ocurre en otros trabajos. Asimismo, se ha visto que la exposición a EHT de neutrófilos disminuye la expresión génica de *Nrf2* y *GPx1*, mientras que aumenta la expresión de *HO-1* y *NQO1*. Esto puede deberse a que los neutrófilos son células menos resistentes a la exposición al EHT y por lo tanto una exposición de un 3% ya merma la expresión de NRF2, sin embargo, las expresión de HO-1 y NQO1 aumenta ya que las moléculas de NRF2 que se encuentran en la célula se activan como respuesta a los oxidantes del tabaco. En cuanto a GPx1 las diferencias con las células epiteliales pueden deberse a que el mecanismo de inducción sea diferente o a que no sea una enzima de primer respuesta por lo que el descenso

progresivo en la expresión de *Nrf2* afecte a sus expresión, ya que no se repondrán las proteínas NRF2 disponibles.

En cuanto a los efectos de los fármacos, se ha evidenciado que todos los fármacos empleados en este proyecto son capaces de aumentar significativamente la expresión tanto de NRF2 como de sus genes diana. De entre ellos, en general, la CDDO-Me parece que es el que mayor poder de inducción de la expresión tiene. Aunque el compuesto obacunona también muestra muy buenos resultados. Estas evidencias concuerdan con las obtenidas en otros tipos celulares, modelos o estímulos distintos tanto para la CDDO-Me ^{387,393,489,497,499,500,507,519-524}, como para la omaveloxolona ^{390,393,395-398,404,490,491,510,525-528} y la obacunona ^{423,427,428,512-514}, en todos estos estudios se demuestra que estos fármacos son capaces de inducir la expresión de estos genes diana. Se debe mencionar en cuanto a la expresión de *NRF2* que los niveles de inducción son mucho menores que en el resto de los genes. Esto se debe a que los fármacos con activadores de NRF2 principalmente, por lo que su mecanismo de acción es permitir la translocación de NRF2 al núcleo donde activa la expresión de los genes diana. Puede, además, existir un mecanismo de retroalimentación en el que una mayor actividad de NRF2 haya aumentar la expresión.

Asimismo, se ha evidenciado que los fármacos tienen mayores efectos en las células de pacientes EPOC, tal como ocurría en la liberación de ERO. Esto puede deberse a que al tener expresiones basales reducidas de HO-1 y NQO1, una activación de NRF2 puede aumentar más fácilmente los niveles de estas enzimas, sin embargo, si los niveles de expresión génica y proteica son normales, la inducción será menor o el efecto en la inducción será menos percibido, ya que se parte de niveles de expresión normales.

En la EPOC, el estrés oxidativo, incluido el producido por el humo de tabaco, provoca un aumento de la expresión de genes proinflamatorios por la activación del factor NF- κ B, que incluyen IL-8 ^{170,197}. Una de las células inflamatorias principales implicadas en la enfermedad son los neutrófilos, que son reclutados al tracto respiratorio por la acción de varios factores quimiotácticos entre los que se incluye la interleucina IL-8 ^{119,120}. Los neutrófilos secretan proteasas como la MMP-9 y, además, pueden también secretar IL-8. Estos mediadores pueden también encontrarse aumentados en la circulación, lo que confirma una inflamación sistémica ^{107,119,121,122}. Por lo tanto, para estudiar la capacidad antiinflamatoria de los activadores de NRF2 se ha estudiado la liberación de estos marcadores inflamatorios por neutrófilos de sangre periférica tras la exposición a EHT y previo tratamiento con los fármacos. Con los ensayos realizados se ha demostrado que los neutrófilos procedentes de pacientes EPOC tienen mayores niveles basales de IL-8 y MMP-9, estos resultados confirma que se trata de una enfermedad sistémica y coincide con estudios previamente realizados en los que se ha demostrado que los marcadores IL-8 y MMP-9 están aumentados en células de pacientes EPOC, tanto inflamatorias como epiteliales, y que está mayor proporción se correlaciona con mayor número de neutrófilos, tal y como hemos visto en este trabajo ^{127-130,139-141,161-165,168}.

Los resultados aquí descritos han evidenciado que los activadores de NRF2 previenen la liberación de estos marcadores tanto en neutrófilos procedentes de pacientes EPOC como de sujetos sanos. Además, todos ellos muestran perfiles y efectos similares. La mayoría de los trabajos realizados previamente se centran en el estudio de los marcadores IL-6, TNF- α e IL-1 β ^{387,393,424,489,498,498,500,514,519}, en los que se ha visto que estos fármacos disminuyen su expresión y concentración. Sin embargo, existen escasos estudios que analicen el efecto de estos fármacos

en los niveles de liberación de IL-8 y MMP-9, por lo tanto, este trabajo es el primero en demostrar que los activadores de NRF2 disminuyen la liberación de estos marcadores en neutrófilos estimulados con EHT. Sí que existen estudios en los que se ha visto que la activación de la ruta NRF2 disminuye la expresión de IL-8^{455,529-536} y la de MMP-9⁵³⁷⁻⁵⁴³. Asimismo, existen estudios sobre derivados de la CDDO-Me que demuestran que estos disminuyen los niveles de IL-8 o sobre la CDDO-Me que evidencian que en otros tipos celulares este activador sí disminuye los niveles de MMP-9. Por otro lado, sí que existe un estudio que demuestra la inhibición de la expresión de MMP-9 por parte de la omaveloxolona en astrocitos de rata³⁹⁴. La activación de NRF2 reduce el estrés oxidativo mediante la activación de enzimas y moléculas antioxidantes, por lo que una reducción de las ERO genera que haya menos activación del factor NF- κ B, encargado de la inducción de gran variedad de genes proinflamatorios. Asimismo, también se ha visto que NRF2 inhibe la expresión de marcadores proinflamatorios uniéndose y afectando a la unión con el ADN del factor del complejo NF- κ B, p65⁵⁴⁴. Por otro lado, esta inhibición de los marcadores proinflamatorios también pueden deberse a mecanismo de acción paralelo de los fármacos, como la CDDO-Me que también tiene como diana IKK β , inhibidor de NF- κ B, o la omaveloxolona que se ha descrito también como y regulador del factor NF- κ B^{390,391}; por lo que la vía de acción antiinflamatoria es doble³⁷⁹.

La apoptosis o muerte celular programada es uno de los mecanismos implicados en el desarrollo de la EPOC⁵⁴⁵. Numerosos estudios han demostrado que la exposición al humo de tabaco o su extracto induce el proceso de apoptosis en diversos tipos celulares incluyendo macrófagos, células epiteliales y endoteliales^{206-208,546-553}. Este trabajo confirma estos resultados en los que la exposición a EHT al 8.5% durante 24h aumenta los niveles de apoptosis en células epiteliales bronquiales. Asimismo, se ha estudiado el potencial antiapoptótico de los activadores de NRF2 mediante estudios de citometría de flujo. Estos resultados han demostrado que la activación de NRF2 por parte de estos fármacos tienen un papel protector frente a la apoptosis generada por el EHT. Entre los activadores el fármaco que parece tener un mayor potencial antiapoptótico es la CDDO-Me, sin embargo, la omaveloxolona parece tener efectos y potencias muy similares. Por otro lado no debemos dejar a un lado la obacunona, que a pesar de necesitar concentraciones más elevadas por su origen natural, consigue efectos muy similares a los de los fármacos electrofílicos. Los efectos en el proceso de apoptosis ya han sido estudiados previamente para la CDDO-Me, sin embargo, este fármaco tiene un carácter controvertido respecto a este proceso. Diversos estudios han evidenciado el carácter proapoptótico de la CDDO-Me principalmente en células y modelos tumorales^{380,489,504,505,554-556}, mientras que otros, incluyendo esta tesis, han demostrado su capacidad antiapoptótica^{393,522,557,558}. Parece que la CDDO-Me a dosis micromolares, ejerce un efecto anticancerígeno induciendo, entre otras, vías apoptóticas; mientras que a dosis inferiores de 100nM, la CDDO-Me protege a la célula del estrés oxidativo activando al factor NRF2⁵⁵⁴. Además, se ha visto que el mecanismo proapoptótico de CDDO-Me está mediado por la generación de ERO⁵⁰⁵. Por lo que la CDDO-Me a altas concentraciones tiene potencial anticancerígeno, pero a bajas concentraciones ejerce un papel protector frente a la muerte celular. En el caso de la omaveloxolona, la mayoría de los estudios previos realizados han evidenciado su capacidad antiapoptótica^{395,491,527,559}, sin embargo también existen estudios que avalan su capacidad anticancerígena, activando procesos apoptóticos de una manera similar a la CDDO-Me³⁹¹. Aunque son más escasos los estudios realizados con obacunona, estos muestran resultados similares a los de la CDDO-Me y la

omaveloxolona. Existen estudios que demuestran el potencial anticancerígeno y propapoptótico de la obacunona, especialmente en células tumorales mediante la activación de las caspasas 9 y 3^{426,560-562}; y también, por otro lado, los que demuestran la capacidad antiapoptótica⁴²⁸.

En este trabajo, además, se ha comprobado la capacidad de los activadores de NRF2 de promover la translocación al núcleo del factor NRF2. Los resultados demuestran y confirman que tanto al CDDO-Me, como la omaveloxolona, la obacunona y el péptido LAS200813:8 aumentan la expresión de NRF2 en el núcleo o en sus proximidades. Esto confirma los resultados previamente publicados en los que se confirma la promoción de la traslocación al núcleo de NRF2 por parte de estos fármacos^{489,500,525}.

Los estudios *in vitro* realizados demuestran que los fármacos activadores de NRF2, CDDO-Me, omaveloxolona, obacunona y el péptido LAS200813:8 tienen un papel protector antioxidante, antiinflamatorio y antiapoptótico en células epiteliales bronquiales y en células inflamatorias expuestas a EHT. De estos fármacos, la CDDO-Me es la que presenta mejores resultados en la mayoría de los ensayos, pero seguida muy de cerca por la omaveloxolona. Por otro lado, la obacunona tiene grandes efectos antioxidantes, especialmente en ensayos de expresión génica, sin embargo las concentraciones necesarias para obtener efectos considerables son más elevadas que en los otros casos.

3. Evidencias *in vivo* sobre la eficacia de los fármacos en modelos murinos de inflamación pulmonar aguda y de exacerbación de la EPOC

En este trabajo de investigación se han analizado también los efectos de los activadores en modelos de inflamación pulmonar aguda y de exacerbación de la EPOC. Nos hemos centrados principalmente en analizar el efecto en los episodios agudos de inflamación que ocurren en la EPOC, para ello se ha empleado la instilación de LPS en dosis única o en combinación con exposición a humo de tabaco para generar estos modelos, ampliamente descritos en la bibliografía^{295,296,298,458,466-473,475-477}. En el modelo de inflamación pulmonar aguda los ratones han sido pretratados con los fármacos e instilados con LPS a dosis única, en el modelo de exacerbación por otro lado los ratones han sido instilados con LPS previamente y, posteriormente a la instilación, tratados con fármaco y sometidos a exposición al humo de tabaco. Por lo tanto, el modelo de inflamación pulmonar aguda consiste en un modelo preventivo que permite conocer el papel protector antiinflamatorio y antioxidante de los fármacos. Por otro lado, el modelo de exacerbación consiste en un modelo curativo, ya que la instilación de LPS es previa al tratamiento, que permite conocer los efectos antiinflamatorios y antioxidantes de los fármacos, así como su respuesta frente a la combinación de los dos estímulos, LPS y humo de tabaco.

Las concentraciones de fármacos empleadas se basan en publicaciones previas y/o en resultados previos de nuestro laboratorio^{387-389,403,404,423}. Sin embargo, para los modelos *in vivo* no se ha empleado el compuesto peptídico por falta de permisos por parte de la empresa propietaria. Cabe mencionar que en el primer modelo se emplean dos concentraciones de CDDO-Me, mientras que en el segundo modelo solo se utiliza la menor de ellas. Esto se debe a que modelos

previos en nuestro laboratorio con este fármaco han mostrado que administraciones continuadas de CDDO-Me a 10mg/kg tiene efectos tóxicos. Asimismo, cabe destacar que se ha empleado el fármaco roflumilast como fármaco control antiinflamatorio, lo que permite comparar el efecto de nuestros fármacos con uno ya ampliamente conocido ⁴⁷⁴.

En ambos modelos se ha visto que la instilación de LPS con y sin la exposición al humo de tabaco genera una excesiva respuesta inflamatoria. Los ratones expuestos a LPS y LPS+HT presentan un número mayor de células totales en el lavado broncoalveolar, acompañado de un aumento en el porcentaje de neutrófilos, respecto a los ratones control. La afluencia rápida y adecuada de leucocitos de la circulación a los pulmones es esencial para la eliminación de patógenos, la extravasación excesiva y persistente puede causar lesiones adicionales por la liberación de mediadores tóxicos, como ERO, proteasas, citoquinas proinflamatorias, etc., exacerbando así el proceso inflamatorio ⁵⁶³⁻⁵⁶⁶. Esta infiltración y acumulación de leucocitos en los espacios alveolares e intersticiales también puede observarse en los cortes histológicos de los ratones de los grupos LPS y LPS+HT. El LPS y las sustancias tóxicas y oxidantes del tabaco inducen la extravasación de células inflamatorias a los pulmones mediante la activación mediante su unión con receptores, como TLR4, que activan rutas de señalización para la inducción de la expresión genes proinflamatorios, una de estas rutas de señalización es la del complejo NF- κ B ^{197,567-570}. Este factor induce la expresión de moléculas proinflamatorias como TNF- α , IL-6, IL-8 y IL-1 β por parte de las células epiteliales y macrófagos alveolares, encargadas de atraer a las células inflamatorias como neutrófilos, macrófagos y linfocitos, que, a su vez, liberan más moléculas proinflamatorias ^{107,124,197}. En este trabajo hemos podido observar cómo en ambos modelos, los ratones de los grupos LPS y LPS+HT presentan concentraciones más elevadas de estos marcadores proinflamatorios en el LBA, así como mayores niveles de expresión en el tejido pulmonar. Estos resultados coinciden con los publicados anteriormente y los obtenidos por nuestro grupo ^{284,288,289,291,293,295-298,458,466-473,475-477,563,571,572}. En esta trabajo se evidencia la capacidad de prevenir y revertir esta respuesta inflamatoria. Estos activadores de NRF2 protegen y frenan la extravasación de células inflamatorias, reduciendo la cantidad de neutrófilos presentes en los espacios alveolares e intersticiales. Asimismo, también se ha demostrado que estos fármacos previenen y reducen la liberación de moléculas proinflamatorias, así como su expresión génica. Además, resultados aquí obtenidos muestran que los fármacos empleados son capaces de prevenir y revertir los cambios histológicos generados por el LPS con y sin humo de tabaco como la infiltración de células inflamatorias en el espacio aéreo alveolar, el engrosamiento de la pared alveolar y la presencia de hemorragias. De igual manera, se ha podido observar mediante el uso de técnica de imagen *in vivo* como los fármacos revierten la inflamación pulmonar generada tras las instilación con LPS y la exposición a humo de tabaco. Estos resultados obtenidos con los fármacos, además, son similares e, incluso, mejores que los obtenidos con el fármaco roflumilast, un fármaco antiinflamatorio sobradamente conocido. Esto indica, pues, que los activadores testados en este trabajo de investigación tienen potenciales antiinflamatorios comparables a fármacos antiinflamatorios puros. Este efecto antiinflamatorio puede deberse, como se ha explicado en los resultados *in vitro*, a la capacidad antioxidante y citoprotectora a través de la activación de NRF2 o a la inhibición del factor NF- κ B, directamente o través de NRF2. Los fármacos CDDO-Me y obacunona han sido ya testados anteriormente en modelos de inflamación pulmonar similares, pero siempre preventivos, donde el tratamiento con los fármacos era previo a la instilación con LPS, los resultados obtenidos en estos trabajos coinciden con los obtenidos en esta tesis ^{387,388,514,519}.

Por otro lado, el fármaco omaveloxolona no ha sido testado en modelos de inflamación o estrés oxidativo pulmonar, pero sí que ha sido testado en modelos preventivos de asma por ozono o de Ataxia de Friedreich, entre otros, con resultados antiinflamatorios similares^{402,490}. Sin embargo, con este proyecto, como hemos comentado, además de la capacidad de proteger y prevenir la excesiva respuesta inflamatoria, también hemos demostrado la capacidad curativa y de reversión de todos los fármacos testados.

Se han estudiado, también, los efectos antioxidantes de estos fármacos en estos modelos murinos. Para ello se ha estudiado la expresión génica y proteica del propio factor NRF2, de las enzimas antioxidantes HO-1 y NQO1 y de la enzima iNOS. En ambos modelos hemos podido observar como la exposición a LPS solo o en combinación con humo de tabaco disminuye la expresión del factor NRF2, lo que coincide con nuestros resultados obtenidos *in vitro* en neutrófilos. Igual que ocurre en los resultados *in vitro*, podemos encontrar publicaciones en las que la expresión de NRF2 se ve aumentada con la instilación de LPS o la exposición a humo de tabaco^{531,573-577}, pero otras publicaciones en las que evidencian un descenso de la expresión^{388,514,578-580}, como en nuestro caso. Asimismo, también se ha observado que en los grupos de ratones LPS y LPS+HT la expresión de HO-1 está elevada respecto al grupo control, mientras que la de la NQO1 está disminuida. La mayoría de los estudios realizados previamente analizan principalmente la expresión de la HO-1 y, en menor medida, la de la NQO1. En estos casos podemos encontrar niveles de expresión incrementados^{461,573-577} o disminuidos^{388,514,578,580} de ambas enzimas, pero también existe un estudio en el que se observa un incremento en la expresión de HO-1, pero no de NQO1⁵⁷⁹. Las diferencias entre estas enzimas, ambas reguladas por NRF2, pueden deberse a que vías alternativas de activación y a sus niveles de expresión basales. Mientras que la activación de la NQO1 depende principalmente del factor NRF2, la expresión de HO-1 puede inducirse por el factor NRF2, por retroalimentación positiva de su propia enzima y por el factor NF- κ B. Por lo que, al estar la expresión de NRF2 disminuida, esto afecta a la expresión de NQO1, siendo esta menor; sin embargo, la disminución de NRF2 no afecta de la misma manera a la enzima HO-1 ya que esta tiene vías alternativas para su activación. La estimulación con LPS o la exposición a humo de tabaco aumentan la expresión y la actividad del factor NF- κ B^{388,569,574,576,577}, por lo que este factor puede activar la expresión de HO-1 paralelamente. Esto explicaría la diferencia de expresión entre ambas enzimas, ya que la NQO1 dependería casi únicamente de NRF2, que está disminuido en este caso, mientras que la HO-1 también podría ser activada por el factor NF- κ B⁵⁸¹⁻⁵⁸³. Por otro lado, debemos tener en cuenta las expresiones y actividades basales de estas enzimas, mientras la actividad de NQO1 está presente de forma ubicua en todos los tejidos y sus niveles de expresión son más elevados en tejidos como los pulmones⁵⁸³, la enzima HO-1 es inducible⁵⁸⁴. Por lo tanto, en el caso de la NQO1, como está expresada continuamente, una inhibición de la expresión de NRF2, afectará a su expresión, disminuyéndola. Por otro lado, en el caso de la HO-1, al ser inducible y tener niveles basales escasos, incluso un estímulo pequeño hará aumentar su expresión.

A pesar de estos controvertidos resultados, en ambos modelos, se ha observado que los fármacos activadores de NRF2 aumentan la expresión del propio factor NRF2 y de las enzimas NQO1 y HO-1, protegiendo del estrés oxidativo o revirtiendo el daño generado por este. De entre los fármacos testados, los mejores resultados en cuanto al potencial antioxidante se han observado en los fármacos obacunona y omaveloxolona. De la misma forma que ocurre respecto al potencial antiinflamatorio, los fármacos CDDO-Me y obacunona ya han sido testados para

modelos similares y sus resultados coinciden con los mostrados en esta tesis^{387,388,514,519}. Sin embargo, de nuevo, remarcar que no solo hemos demostrado la capacidad preventiva de estos fármacos, sino también su capacidad curativa. En cuanto a la omaveloxolona, no existen estudios realizados con modelos análogos, pero en otros modelos se han encontrado resultados similares^{490,510,525}. Por otro lado, se ha observado que el fármaco roflumilast no es capaz de prevenir o revertir los efectos generados por la instilación de LPS con o sin exposición a humo de tabaco. Estudios previos sí que han demostrado que el roflumilast, o al menos el metabolito activo roflumilast n-oxide, es capaz de activar la expresión de NRF2 y HO-1, pero estos se han realizado en células epiteliales bronquiales y no en modelos animales⁴⁴⁷. Por lo que, puede que a mayores concentraciones el roflumilast sea capaz de inducir la expresión de NRF2, sin embargo, queda clara que su principal actividad es antiinflamatoria y no antioxidante.

Por último, se ha estudiado la expresión de la enzima iNOS, para estudiar no solo aquellas enzimas encargadas de la defensa antioxidantes sino también alguna enzima generadora de moléculas oxidantes, como es el NO. En ambos modelos se ha podido observar como en los ratones de los grupos LPS y LPS+HT la expresión de esta enzima esta claramente incrementada respecto a los ratones del grupo control. Esto coincide con resultados previos que han demostrado que en modelos similares hay un aumento de la expresión de iNOS debido a la acción del factor NF- κ B^{388,585}. Los resultados en este trabajo demuestran que los fármacos testados son capaces de prevenir y revertir los efectos en la expresión de iNOS generados por el LPS y el LPS+HT, incluyendo el roflumilast. Esto seguramente se deba a la inhibición del factor NF- κ B, directamente o a través de la activación de NRF2. En el caso del roflumilast, se ha demostrado previamente que puede participar en la regulación de este factor, por lo tanto, inhibiendo la inducción de mediadores proinflamatorios, incluyendo iNOS⁵⁸⁶.

Estos modelos murinos, por lo tanto, han demostrado el potencial antiinflamatorio y antioxidante de los fármacos activadores de NRF2, pero no solo desde una perspectiva preventiva, sino también desde una visión curativa.

En cuanto a los estudios con humanos, la CDDO-Me ha sido testada para el tratamiento de la nefropatía diabética³⁸¹. Sin embargo, el ensayo tuvo que ser suspendido por los riesgos asociados a las complicaciones cardiovasculares³⁸⁴. Actualmente, debido los buenos resultados *in vivo*, la CDDO-Me está en fase de investigación clínica para el tratamiento potencial del síndrome de Alport y la hipertensión pulmonar⁵⁸⁷. Por lo tanto, visto que a bajas concentraciones puede ejercer efectos antioxidantes, este fármaco podría plantearse como terapia complementaria para la EPOC. La omaveloxolona también se encuentra en ensayos clínicos para la Ataxia de Friedreich, cuyos resultados muestran una mejora significativa de la función neurológica y una buena tolerancia^{400,401}. Estos buenos resultados y la alta seguridad y tolerabilidad podría abrir las puertas a una terapia farmacológica para la EPOC basada en el uso de la omaveloxolona. En cuanto a la obacunona, no existen estudios clínicos que comprueben la capacidad de atenuar y/o prevenir mecanismos patológicos de la EPOC. En este caso se debe tener en cuenta que se trata de un compuesto natural que requiere de altas concentraciones *in vitro* para tener efectos reseñables, por lo que, a pesar de que en el *in vivo* la concentración empleada era similar a la de los otros fármacos, debería considerarse como terapia complementaria y, sobre todo, preventiva en los primeros estadios de la enfermedad. Por último, no existen datos sobre ensayos clínicos realizados con el péptido LAS200813:8, en este

caso, al tratarse de un fármaco cedido por una empresa privada, los datos que poseemos son escasos. Sin embargo, es interesante contemplar la idea de una terapia farmacológica basada en compuestos peptídicos diseñados, que podrían asegurar una mayor especificidad, evitando así efectos nocivos indeseables.

CONCLUSIONES

Las conclusiones que se extraen de este trabajo son las siguientes:

- Existe una pérdida de capacidad antioxidante en pacientes con EPOC, en tejido pulmonar y neutrófilos de sangre periférica, caracterizada por una disminución en la expresión génica basal de genes implicados en la ruta NRF2 y genes antioxidantes activados por esta, así como por una disminución en la liberación de GSH.
- En pacientes EPOC, la expresión génica basal de genes implicados en la ruta NRF2 y activados por esta disminuye progresivamente conforme aumenta la gravedad de la enfermedad.
- Los activadores de NRF2: CDDO-Me, omaveloxolona, obacunona y el péptido LAS200813:8, tienen una gran capacidad preventiva antioxidante, antiinflamatoria y antiapoptótica frente a la exposición a humo de tabaco en células epiteliales bronquiales y células inflamatorias.
- Los activadores de NRF2: CDDO-Me, omaveloxolona y obacunona, presentan capacidad preventiva y curativa antioxidante y antiinflamatoria frente a la instilación intratraqueal con LPS en combinación o no con la exposición a humo de tabaco en modelos murinos.

BIBLIOGRAFÍA

1. WHO | Global surveillance, prevention and control of chronic respiratory diseases: a comprehensive approach [Internet]. WHO. World Health Organization; [citado 15 de febrero de 2022]. Disponible en: <https://www.who.int/gard/publications/GARD%20Book%202007.pdf?ua=1>
2. Barnes PJ, Burney PGJ, Silverman EK, Celli BR, Vestbo J, Wedzicha JA, et al. Chronic obstructive pulmonary disease. *Nat Rev Dis Primers*. 17 de diciembre de 2015;1(1):15076.
3. Page CP, Barnes PJ, editores. *Pharmacology and Therapeutics of Asthma and COPD* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2017 [citado 10 de febrero de 2022]. (Handbook of Experimental Pharmacology; vol. 237). Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-52175-6>
4. GLOBAL STRATEGY FOR PREVENTION, DIAGNOSIS AND MANAGEMENT OF COPD: 2022 Report [Internet]. [citado 15 de febrero de 2022]. Disponible en: https://goldcopd.org/wp-content/uploads/2021/12/GOLD-REPORT-2022-v1.1-22Nov2021_WMV.pdf
5. Roman-Rodriguez M, Kaplan A. GOLD 2021 Strategy Report: Implications for Asthma-COPD Overlap. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2021;16:1709-15.
6. Vogelmeier CF, Criner GJ, Martinez FJ, Anzueto A, Barnes PJ, Bourbeau J, et al. Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Lung Disease 2017 Report: GOLD Executive Summary. *Eur Respir J*. marzo de 2017;49(3):1700214.
7. Chronic obstructive pulmonary disease - ERS European Lung White Book [Internet]. [citado 15 de febrero de 2022]. Disponible en: <https://www.erswhitebook.org/chapters/chronic-obstructive-pulmonary-disease/>
8. Yawn B, Mannino D, Littlejohn T, Ruoff G, Emmett A, Raphiou I, et al. Prevalence of COPD among symptomatic patients in a primary care setting. *Current Medical Research and Opinion*. 1 de noviembre de 2009;25(11):2671-7.
9. OECD, Union E. Health at a Glance: Europe 2016 [Internet]. 2016. Disponible en: <https://www.oecd-ilibrary.org/content/publication/9789264265592-en>
10. WHO European health information at your fingertips. [Internet]. [citado 15 de febrero de 2022]. Disponible en: https://gateway.euro.who.int/en/indicators/hfa_403-2510-prevalence-of-chronic-obstructive-pulmonary-disease/
11. OECD, Union E. Health at a Glance: Europe 2020 [Internet]. 2020. Disponible en: <https://www.oecd-ilibrary.org/content/publication/82129230-en>
12. Sobradillo V, Miravittles M, Jiménez CA, Gabriel R, Viejo JL, Masa JF, et al. Estudio IBERPOC en España: prevalencia de síntomas respiratorios habituales y de limitación crónica al flujo aéreo. *Arch Bronconeumol*. 1 de abril de 1999;35(4):159-66.
13. Bermúdez JA, Miratvilles M, Río FG, Cabrera LM, Sánchez G, Peña VS, et al. Infradiagnóstico de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica en mujeres: cuantificación del problema, determinantes y propuestas de acción. *Archivos de bronconeumología: Organó oficial de la Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica SEPAR y la Asociación Latinoamericana de Tórax (ALAT)*. 2013;49(6):223-9.

14. Ortíz JBS, Miratvilles M, Clau LB, Duran-Tauleria E, Río FG, Martínez J, et al. Diferencias geográficas en la prevalencia de EPOC en España:: relación con hábito tabáquico, tasas de mortalidad y otros determinantes. Archivos de bronconeumología: Organo oficial de la Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica SEPAR y la Asociación Latinoamericana de Tórax (ALAT). 2010;46(10):522-30.
15. INEbase / Sociedad /Salud /Encuesta europea de salud en España / Resultados [Internet]. INE. [citado 15 de febrero de 2022]. Disponible en: https://www.ine.es/dyngs/INEbase/es/operacion.htm?c=Estadistica_C&cid=1254736176784&menu=resultados&idp=1254735573175
16. Direcció General de Salut Pública. IV Plan de Salud de la Comunidad Valenciana 2016-2020 [Internet]. Generalitat. Conselleria de Sanitat Universal i Salut Pública. 2016. Disponible en: http://www.san.gva.es/documents/157385/6431837/IV_PLAN+DE+SALUD_CV_2016_Castellano_web.pdf
17. Ancochea J, Badiola C, Duran-Tauleria E, Garcia Rio F, Miravittles M, Muñoz L, et al. Estudio EPI-SCAN: resumen del protocolo de un estudio para estimar la prevalencia de EPOC en personas de 40 a 80 años en España. Arch Bronconeumol. 1 de enero de 2009;45(1):41-7.
18. Alfageme I, de Lucas P, Ancochea J, Miravittles M, Soler-Cataluña JJ, García-Río F, et al. Nuevo estudio sobre la prevalencia de la EPOC en España: resumen del protocolo EPISCAN II, 10 años después de EPISCAN. Archivos de Bronconeumología. enero de 2019;55(1):38-47.
19. OECD. Health at a Glance: Europe 2018: State of Health in the EU Cycle [Internet]. Paris: Organisation for Economic Co-operation and Development; 2018 [citado 15 de febrero de 2022]. Disponible en: https://www.oecd-ilibrary.org/social-issues-migration-health/health-at-a-glance-europe-2018_health_glance_eur-2018-en
20. La Estrategia en EPOC del Sistema Nacional de Salud. Ministerio de Salud y Políticas Sociales. Madrid; 2009.
21. COPD | NHLBI, NIH [Internet]. [citado 15 de febrero de 2022]. Disponible en: <https://www.nlm.nih.gov/health-topics/copd>
22. Miravittles M, Soriano JB, Garcia-Rio F, Munoz L, Duran-Tauleria E, Sanchez G, et al. Prevalence of COPD in Spain: impact of undiagnosed COPD on quality of life and daily life activities. Thorax. 1 de octubre de 2009;64(10):863-8.
23. Cherian M, Jensen D, Tan WC, Mursleen S, Goodall EC, Nadeau GA, et al. Dyspnoea and Symptom Burden in Mild-Moderate COPD: the Canadian Cohort Obstructive Lung Disease Study. ERJ Open Research [Internet]. 1 de enero de 2021 [citado 15 de febrero de 2022]; Disponible en: <https://openres.ersjournals.com/content/early/2021/01/14/23120541.00960-2020>
24. Cho SH, Lin HC, Ghoshal AG, Bin Abdul Muttalif AR, Thanaviratananich S, Bagga S, et al. Respiratory disease in the Asia-Pacific region: Cough as a key symptom. Allergy Asthma Proc. abril de 2016;37(2):131-40.

25. Allinson JP, Hardy R, Donaldson GC, Shaheen SO, Kuh D, Wedzicha JA. The Presence of Chronic Mucus Hypersecretion across Adult Life in Relation to Chronic Obstructive Pulmonary Disease Development. *Am J Respir Crit Care Med*. 15 de marzo de 2016;193(6):662-72.
26. Du Q, Jin J, Liu X, Sun Y. Bronchiectasis as a Comorbidity of Chronic Obstructive Pulmonary Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One*. 2016;11(3):e0150532.
27. Soler N, Esperatti M, Ewig S, Huerta A, Agustí C, Torres A. Sputum purulence-guided antibiotic use in hospitalised patients with exacerbations of COPD. *Eur Respir J*. diciembre de 2012;40(6):1344-53.
28. Brusse-Keizer MGJ, Grotenhuis AJ, Kerstjens H a. M, Telgen MC, van der Palen J, Hendrix MGR, et al. Relation of sputum colour to bacterial load in acute exacerbations of COPD. *Respir Med*. abril de 2009;103(4):601-6.
29. Goërtz YMJ, Looijmans M, Prins JB, Janssen DJA, Thong MSY, Peters JB, et al. Fatigue in patients with chronic obstructive pulmonary disease: protocol of the Dutch multicentre, longitudinal, observational FANTASTIGUE study. *BMJ Open*. 10 de abril de 2018;8(4):e021745.
30. Schols AMWJ, Broekhuizen R, Weling-Scheepers CA, Wouters EF. Body composition and mortality in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Clin Nutr*. julio de 2005;82(1):53-9.
31. Attaway AH, Welch N, Hatipoğlu U, Zein JG, Dasarathy S. Muscle loss contributes to higher morbidity and mortality in COPD: An analysis of national trends. *Respirology*. 2021;26(1):62-71.
32. Hanania NA, Müllerova H, Locantore NW, Vestbo J, Watkins ML, Wouters EFM, et al. Determinants of depression in the ECLIPSE chronic obstructive pulmonary disease cohort. *Am J Respir Crit Care Med*. 1 de marzo de 2011;183(5):604-11.
33. Blakemore A, Dickens C, Guthrie E, Bower P, Kontopantelis E, Afzal C, et al. Depression and anxiety predict health-related quality of life in chronic obstructive pulmonary disease: systematic review and meta-analysis. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2014;9:501-12.
34. Wedzicha JA, Seemungal TAR. COPD exacerbations: defining their cause and prevention. *Lancet*. 1 de septiembre de 2007;370(9589):786-96.
35. Papi A, Bellettato CM, Braccioni F, Romagnoli M, Casolari P, Caramori G, et al. Infections and airway inflammation in chronic obstructive pulmonary disease severe exacerbations. *Am J Respir Crit Care Med*. 15 de mayo de 2006;173(10):1114-21.
36. Barnes PJ, Celli BR. Systemic manifestations and comorbidities of COPD. *European Respiratory Journal*. 1 de mayo de 2009;33(5):1165-85.
37. Fabbri LM, Luppi F, Beghé B, Rabe KF. Complex chronic comorbidities of COPD. *Eur Respir J*. enero de 2008;31(1):204-12.

38. Mannino DM, Thorn D, Swensen A, Holguin F. Prevalence and outcomes of diabetes, hypertension and cardiovascular disease in COPD. *Eur Respir J.* octubre de 2008;32(4):962-9.
39. Agustí AGN, Noguera A, Sauleda J, Sala E, Pons J, Busquets X. Systemic effects of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J.* febrero de 2003;21(2):347-60.
40. Celli BR. COPD: Clinical Presentation and Evaluation. En: *Chronic Obstructive Pulmonary Disease* [Internet]. John Wiley & Sons, Ltd; 2007 [citado 16 de febrero de 2022]. p. 167-80. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9780470755976.ch15>
41. Holleman DR, Simel DL. Does the clinical examination predict airflow limitation? *JAMA.* 25 de enero de 1995;273(4):313-9.
42. Çolak Y, Nordestgaard BG, Vestbo J, Lange P, Afzal S. Prognostic significance of chronic respiratory symptoms in individuals with normal spirometry. *Eur Respir J.* septiembre de 2019;54(3):1900734.
43. Jackson H, Hubbard R. Detecting chronic obstructive pulmonary disease using peak flow rate: cross sectional survey. *BMJ.* 20 de septiembre de 2003;327(7416):653-4.
44. Pauwels RA, Rabe KF. Burden and clinical features of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Lancet.* 14 de agosto de 2004;364(9434):613-20.
45. Pellegrino R, Viegi G, Brusasco V, Crapo RO, Burgos F, Casaburi R, et al. Interpretative strategies for lung function tests. *Eur Respir J.* noviembre de 2005;26(5):948-68.
46. García-Río F, Calle M, Burgos F, Casan P, del Campo F, Galdiz JB, et al. Espirometría. *Arch Bronconeumol.* 1 de septiembre de 2013;49(9):388-401.
47. Stephens MB, Yew KS. Diagnosis of chronic obstructive pulmonary disease. *Am Fam Physician.* 1 de julio de 2008;78(1):87-92.
48. Tager IB, Segal MR, Speizer FE, Weiss ST. The natural history of forced expiratory volumes. Effect of cigarette smoking and respiratory symptoms. *Am Rev Respir Dis.* octubre de 1988;138(4):837-49.
49. Parr DG, Stoel BC, Stolk J, Stockley RA. Pattern of emphysema distribution in alpha1-antitrypsin deficiency influences lung function impairment. *Am J Respir Crit Care Med.* 1 de diciembre de 2004;170(11):1172-8.
50. Miravittles M. Alpha1-antitrypsin deficiency: epidemiology and prevalence. *Respir Med.* agosto de 2000;94 Suppl C:S12-15.
51. Alpha 1-antitrypsin deficiency: memorandum from a WHO meeting. *Bull World Health Organ.* 1997;75(5):397-415.
52. Stern DA, Morgan WJ, Wright AL, Guerra S, Martinez FD. Poor airway function in early infancy and lung function by age 22 years: a non-selective longitudinal cohort study. *Lancet.* 1 de septiembre de 2007;370(9589):758-64.

53. Celli BR, Halbert RJ, Nordyke RJ, Schau B. Airway obstruction in never smokers: results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Am J Med.* diciembre de 2005;118(12):1364-72.
54. Sanchez-Salcedo P, Divo M, Casanova C, Pinto-Plata V, de-Torres JP, Cote C, et al. Disease progression in young patients with COPD: rethinking the Fletcher and Peto model. *European Respiratory Journal.* 1 de agosto de 2014;44(2):324-31.
55. Erb-Downward JR, Thompson DL, Han MK, Freeman CM, McCloskey L, Schmidt LA, et al. Analysis of the lung microbiome in the «healthy» smoker and in COPD. *PLoS One.* 22 de febrero de 2011;6(2):e16384.
56. Salvi SS, Barnes PJ. Chronic obstructive pulmonary disease in non-smokers. *Lancet.* 29 de agosto de 2009;374(9691):733-43.
57. Lamprecht B, McBurnie MA, Vollmer WM, Gudmundsson G, Welte T, Nizankowska-Mogilnicka E, et al. COPD in Never Smokers: Results From the Population-Based Burden of Obstructive Lung Disease Study. *Chest.* 1 de abril de 2011;139(4):752-63.
58. Sood A, Petersen H, Blanchette CM, Meek P, Picchi MA, Belinsky SA, et al. Wood smoke exposure and gene promoter methylation are associated with increased risk for COPD in smokers. *Am J Respir Crit Care Med.* 1 de noviembre de 2010;182(9):1098-104.
59. Trupin L, Earnest G, San Pedro M, Balmes JR, Eisner MD, Yelin E, et al. The occupational burden of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J.* septiembre de 2003;22(3):462-9.
60. Mannino DM, Buist AS. Global burden of COPD: risk factors, prevalence, and future trends. *The Lancet.* septiembre de 2007;370(9589):765-73.
61. Rosenberg S, Kalhan R, Mannino D. Epidemiology of Chronic Obstructive Pulmonary Disease: Prevalence, Morbidity, Mortality, and Risk Factors. *Semin Respir Crit Care Med.* 3 de agosto de 2015;36(04):457-69.
62. Marsh S, Aldington S, Shirtcliffe P, Weatherall M, Beasley R. Smoking and COPD: What really are the risks? *Eur Respir J.* octubre de 2006;28(4):883-4.
63. Lopez AD, Begg S, Bos E. Demographic and Epidemiological Characteristics of Major Regions, 1990–2001. En: Lopez AD, Mathers CD, Ezzati M, Jamison DT, Murray CJ, editores. *Global Burden of Disease and Risk Factors* [Internet]. Washington (DC): World Bank; 2006 [citado 17 de febrero de 2022]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK11807/>
64. Gilliland FD, Li YF, Dubeau L, Berhane K, Avol E, McConnell R, et al. Effects of glutathione S-transferase M1, maternal smoking during pregnancy, and environmental tobacco smoke on asthma and wheezing in children. *Am J Respir Crit Care Med.* 15 de agosto de 2002;166(4):457-63.
65. Taylor DH, Hasselblad V, Henley SJ, Thun MJ, Sloan FA. Benefits of smoking cessation for longevity. *Am J Public Health.* junio de 2002;92(6):990-6.

66. Rutgers SR, Postma DS, ten Hacken NH, Kauffman HF, van Der Mark TW, Koëter GH, et al. Ongoing airway inflammation in patients with COPD who do not currently smoke. *Thorax*. enero de 2000;55(1):12-8.
67. Xu X, Dockery DW, Ware JH, Speizer FE, Ferris BG. Effects of cigarette smoking on rate of loss of pulmonary function in adults: a longitudinal assessment. *Am Rev Respir Dis*. noviembre de 1992;146(5 Pt 1):1345-8.
68. Scanlon PD, Connett JE, Waller LA, Altose MD, Bailey WC, Buist AS, et al. Smoking cessation and lung function in mild-to-moderate chronic obstructive pulmonary disease. The Lung Health Study. *Am J Respir Crit Care Med*. febrero de 2000;161(2 Pt 1):381-90.
69. Balmes J, Becklake M, Blanc P, Henneberger P, Kreiss K, Mapp C, et al. American Thoracic Society Statement: Occupational contribution to the burden of airway disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 1 de marzo de 2003;167(5):787-97.
70. Hnizdo E, Sullivan PA, Bang KM, Wagner G. Association between chronic obstructive pulmonary disease and employment by industry and occupation in the US population: a study of data from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Am J Epidemiol*. 15 de octubre de 2002;156(8):738-46.
71. Harber P, Tashkin DP, Simmons M, Crawford L, Hnizdo E, Connett J. Effect of Occupational Exposures on Decline of Lung Function in Early Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 15 de noviembre de 2007;176(10):994-1000.
72. Matheson MC, Benke G, Raven J, Sim MR, Kromhout H, Vermeulen R, et al. Biological dust exposure in the workplace is a risk factor for chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax*. agosto de 2005;60(8):645-51.
73. de Meer G, Kerkhof M, Kromhout H, Schouten JP, Heederik D. Interaction of atopy and smoking on respiratory effects of occupational dust exposure: a general population-based study. *Environ Health*. 2 de junio de 2004;3(1):6.
74. Blanc PD, Iribarren C, Trupin L, Earnest G, Katz PP, Balmes J, et al. Occupational exposures and the risk of COPD: dusty trades revisited. *Thorax*. enero de 2009;64(1):6-12.
75. Stoller JK, Aboussouan LS. Alpha1-antitrypsin deficiency. *Lancet*. 25 de julio de 2005;365(9478):2225-36.
76. Ingebrigtsen T, Thomsen SF, Vestbo J, van der Sluis S, Kyvik KO, Silverman EK, et al. Genetic influences on Chronic Obstructive Pulmonary Disease - a twin study. *Respir Med*. diciembre de 2010;104(12):1890-5.
77. Celedón JC, Lange C, Raby BA, Litonjua AA, Palmer LJ, DeMeo DL, et al. The transforming growth factor-beta1 (TGFB1) gene is associated with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Hum Mol Genet*. 1 de agosto de 2004;13(15):1649-56.
78. Keatings VM, Cave SJ, Henry MJ, Morgan K, O'Connor CM, FitzGerald MX, et al. A polymorphism in the tumor necrosis factor-alpha gene promoter region may predispose to a poor prognosis in COPD. *Chest*. octubre de 2000;118(4):971-5.
79. Cheng SL, Yu CJ, Chen CJ, Yang PC. Genetic polymorphism of epoxide hydrolase and glutathione S-transferase in COPD. *Eur Respir J*. junio de 2004;23(6):818-24.

80. Mannino DM, Homa DM, Akinbami LJ, Ford ES, Redd SC. Chronic obstructive pulmonary disease surveillance--United States, 1971-2000. *Respir Care*. octubre de 2002;47(10):1184-99.
81. Sørheim IC, Johannessen A, Gulsvik A, Bakke PS, Silverman EK, DeMeo DL. Gender differences in COPD: are women more susceptible to smoking effects than men? *Thorax*. 1 de junio de 2010;65(6):480-5.
82. Silverman EK, Weiss ST, Drazen JM, Chapman HA, Carey V, Campbell EJ, et al. Gender-related differences in severe, early-onset chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. diciembre de 2000;162(6):2152-8.
83. Buist AS, McBurnie MA, Vollmer WM, Gillespie S, Burney P, Mannino DM, et al. International variation in the prevalence of COPD (the BOLD Study): a population-based prevalence study. *Lancet*. 1 de septiembre de 2007;370(9589):741-50.
84. Watson L, Vonk JM, Löfdahl CG, Pride NB, Pauwels RA, Laitinen LA, et al. Predictors of lung function and its decline in mild to moderate COPD in association with gender: results from the Euroscop study. *Respir Med*. abril de 2006;100(4):746-53.
85. Chen Y, Horne SL, Dosman JA. Increased susceptibility to lung dysfunction in female smokers. *Am Rev Respir Dis*. junio de 1991;143(6):1224-30.
86. Foreman MG, Zhang L, Murphy J, Hansel NN, Make B, Hokanson JE, 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*. 15 de agosto de 2011;184(4):414-20.
87. Dennis RJ, Maldonado D, Norman S, Baena E, Martinez G. Woodsmoke exposure and risk for obstructive airways disease among women. *Chest*. enero de 1996;109(1):115-9.
88. Pérez-Padilla R, Regalado J, Vedal S, Paré P, Chapela R, Sansores R, et al. Exposure to biomass smoke and chronic airway disease in Mexican women. A case-control study. *Am J Respir Crit Care Med*. septiembre de 1996;154(3 Pt 1):701-6.
89. Ekici A, Ekici M, Kurtipek E, Akin A, Arslan M, Kara T, et al. Obstructive airway diseases in women exposed to biomass smoke. *Environ Res*. septiembre de 2005;99(1):93-8.
90. Fletcher C, Peto R. The Natural History Of Chronic Airflow Obstruction. *The British Medical Journal*. 1977;1(6077):1645-8.
91. Jemal A, Ward E, Hao Y, Thun M. Trends in the leading causes of death in the United States, 1970-2002. *JAMA*. 14 de septiembre de 2005;294(10):1255-9.
92. Silva GE, Sherrill DL, Guerra S, Barbee RA. Asthma as a risk factor for COPD in a longitudinal study. *Chest*. julio de 2004;126(1):59-65.
93. Lange P, Parner J, Vestbo J, Schnohr P, Jensen G. A 15-year follow-up study of ventilatory function in adults with asthma. *N Engl J Med*. 22 de octubre de 1998;339(17):1194-200.
94. Ulrik CS, Lange P. Decline of lung function in adults with bronchial asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. septiembre de 1994;150(3):629-34.

95. Hooper R, Burney P, Vollmer WM, McBurnie MA, Gislason T, Tan WC, et al. Risk factors for COPD spirometrically defined from the lower limit of normal in the BOLD project. *Eur Respir J.* junio de 2012;39(6):1343-53.
96. Antó JM, Vermeire P, Vestbo J, Sunyer J. Epidemiology of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J.* mayo de 2001;17(5):982-94.
97. Shohaimi S, Welch A, Bingham S, Luben R, Day N, Wareham N, et al. Area deprivation predicts lung function independently of education and social class. *Eur Respir J.* julio de 2004;24(1):157-61.
98. Lawlor DA, Ebrahim S, Davey Smith G. Association between self-reported childhood socioeconomic position and adult lung function: findings from the British Women's Heart and Health Study. *Thorax.* marzo de 2004;59(3):199-203.
99. Carraro S, Filippone M, Da Dalt L, Ferraro V, Maretti M, Bressan S, et al. Bronchopulmonary dysplasia: the earliest and perhaps the longest lasting obstructive lung disease in humans. *Early Hum Dev.* octubre de 2013;89 Suppl 3:S3-5.
100. Vollsæter M, Røksund OD, Eide GE, Markestad T, Halvorsen T. Lung function after preterm birth: development from mid-childhood to adulthood. *Thorax.* agosto de 2013;68(8):767-76.
101. Madeddu G, Fois AG, Calia GM, Babudieri S, Soddu V, Becciu F, et al. Chronic obstructive pulmonary disease: an emerging comorbidity in HIV-infected patients in the HAART era? *Infection.* abril de 2013;41(2):347-53.
102. Raynaud C, Roche N, Chouaid C. Interactions between HIV infection and chronic obstructive pulmonary disease: Clinical and epidemiological aspects. *Respir Res.* 1 de septiembre de 2011;12:117.
103. Sze MA, Hogg JC, Sin DD. Bacterial microbiome of lungs in COPD. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* 2014;9:229-38.
104. Sethi S. Chronic obstructive pulmonary disease and infection. Disruption of the microbiome? *Ann Am Thorac Soc.* enero de 2014;11 Suppl 1:S43-47.
105. Hogg JC, Timens W. The Pathology of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Annu Rev Pathol Mech Dis.* 1 de febrero de 2009;4(1):435-59.
106. MacNee W. Pathology, pathogenesis, and pathophysiology. *BMJ.* 20 de mayo de 2006;332(7551):1202-4.
107. Barnes PJ. Inflammatory mechanisms in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* julio de 2016;138(1):16-27.
108. Scarlata S, Panaiotis F, Meszaros M, Dragonieri S, Bikov A. The Role of Electronic Noses in Phenotyping Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Biosensors.* 11 de noviembre de 2020;10:171.
109. Lee SH, Goswami S, Grudo A, Song LZ, Bandi V, Goodnight-White S, et al. Antielastin autoimmunity in tobacco smoking-induced emphysema. *Nat Med.* mayo de 2007;13(5):567-9.

110. Domej W, Oettl K, Renner W. Oxidative stress and free radicals in COPD--implications and relevance for treatment. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* 2014;9:1207-24.
111. Sze MA, Dimitriu PA, Suzuki M, McDonough JE, Campbell JD, Brothers JF, et al. Host Response to the Lung Microbiome in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 15 de agosto de 2015;192(4):438-45.
112. Barnes PJ. Cellular and molecular mechanisms of chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Chest Med.* marzo de 2014;35(1):71-86.
113. Wang Y, Xu J, Meng Y, Adcock IM, Yao X. Role of inflammatory cells in airway remodeling in COPD. *COPD.* octubre de 2018;Volume 13:3341-8.
114. Gamble E, Grootendorst DC, Hattotuwa K, O'Shaughnessy T, Ram FSF, Qiu Y, et al. Airway mucosal inflammation in COPD is similar in smokers and ex-smokers: a pooled analysis. *Eur Respir J.* septiembre de 2007;30(3):467-71.
115. Gao W, Li L, Wang Y, Zhang S, Adcock IM, Barnes PJ, et al. Bronchial epithelial cells: The key effector cells in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease?: Bronchial epithelial cells in COPD. *Respirology.* julio de 2015;20(5):722-9.
116. Perez-Padilla R, Schilman A, Riojas-Rodriguez H. Respiratory health effects of indoor air pollution. *Int J Tuberc Lung Dis.* septiembre de 2010;14(9):1079-86.
117. Barnes PJ. Alveolar macrophages as orchestrators of COPD. *COPD.* abril de 2004;1(1):59-70.
118. Russell REK, Thorley A, Culpitt SV, Dodd S, Donnelly LE, Demattos C, et al. Alveolar macrophage-mediated elastolysis: roles of matrix metalloproteinases, cysteine, and serine proteases. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* octubre de 2002;283(4):L867-873.
119. Barnes PJ. Mediators of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Pharmacol Rev.* diciembre de 2004;56(4):515-48.
120. Tanino M, Betsuyaku T, Takeyabu K, Tanino Y, Yamaguchi E, Miyamoto K, et al. Increased levels of interleukin-8 in BAL fluid from smokers susceptible to pulmonary emphysema. *Thorax.* mayo de 2002;57(5):405-11.
121. Bazzoni F, Cassatella MA, Rossi F, Ceska M, Dewald B, Baggiolini M. Phagocytosing neutrophils produce and release high amounts of the neutrophil-activating peptide 1/interleukin 8. *J Exp Med.* 1 de marzo de 1991;173(3):771-4.
122. Fahy JV, Dickey BF. Airway Mucus Function and Dysfunction. *New England Journal of Medicine.* 2 de diciembre de 2010;363(23):2233-47.
123. Biernacki WA, Kharitonov SA, Barnes PJ. Increased leukotriene B4 and 8-isoprostane in exhaled breath condensate of patients with exacerbations of COPD. *Thorax.* abril de 2003;58(4):294-8.
124. Barnes PJ. The cytokine network in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Cell Mol Biol.* diciembre de 2009;41(6):631-8.

125. Olson TS, Ley K. Chemokines and chemokine receptors in leukocyte trafficking. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. julio de 2002;283(1):R7-28.
126. Lukacs NW. Role of chemokines in the pathogenesis of asthma. *Nat Rev Immunol*. noviembre de 2001;1(2):108-16.
127. Keatings VM, Barnes PJ. Granulocyte activation markers in induced sputum: comparison between chronic obstructive pulmonary disease, asthma, and normal subjects. *Am J Respir Crit Care Med*. febrero de 1997;155(2):449-53.
128. Yamamoto C, Yoneda T, Yoshikawa M, Fu A, Tokuyama T, Tsukaguchi K, et al. Airway inflammation in COPD assessed by sputum levels of interleukin-8. *Chest*. agosto de 1997;112(2):505-10.
129. Nocker RE, Schoonbrood DF, van de Graaf EA, Hack CE, Lutter R, Jansen HM, et al. Interleukin-8 in airway inflammation in patients with asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Int Arch Allergy Immunol*. febrero de 1996;109(2):183-91.
130. Soler N, Ewig S, Torres A, Filella X, Gonzalez J, Zaubet A. Airway inflammation and bronchial microbial patterns in patients with stable chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J*. noviembre de 1999;14(5):1015-22.
131. Woolhouse IS, Bayley DL, Stockley RA. Sputum chemotactic activity in chronic obstructive pulmonary disease: effect of alpha(1)-antitrypsin deficiency and the role of leukotriene B(4) and interleukin 8. *Thorax*. agosto de 2002;57(8):709-14.
132. Crooks SW, Bayley DL, Hill SL, Stockley RA. Bronchial inflammation in acute bacterial exacerbations of chronic bronchitis: the role of leukotriene B4. *Eur Respir J*. febrero de 2000;15(2):274-80.
133. Aaron SD, Angel JB, Lunau M, Wright K, Fex C, Le Saux N, et al. Granulocyte inflammatory markers and airway infection during acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. febrero de 2001;163(2):349-55.
134. Gompertz S, O'Brien C, Bayley DL, Hill SL, Stockley RA. Changes in bronchial inflammation during acute exacerbations of chronic bronchitis. *Eur Respir J*. junio de 2001;17(6):1112-9.
135. Nakamura H, Yoshimura K, Jaffe HA, Crystal RG. Interleukin-8 gene expression in human bronchial epithelial cells. *J Biol Chem*. 15 de octubre de 1991;266(29):19611-7.
136. DeForge LE, Preston AM, Takeuchi E, Kenney J, Boxer LA, Remick DG. Regulation of interleukin 8 gene expression by oxidant stress. *J Biol Chem*. 5 de diciembre de 1993;268(34):25568-76.
137. Kwon OJ, Au BT, Collins PD, Adcock IM, Mak JC, Robbins RR, et al. Tumor necrosis factor-induced interleukin-8 expression in cultured human airway epithelial cells. *Am J Physiol*. octubre de 1994;267(4 Pt 1):L398-405.
138. Johnston SL, Papi A, Bates PJ, Mastrorarde JG, Monick MM, Hunninghake GW. Low grade rhinovirus infection induces a prolonged release of IL-8 in pulmonary epithelium. *J Immunol*. 15 de junio de 1998;160(12):6172-81.

139. Schulz C, Krätzel K, Wolf K, Schroll S, Köhler M, Pfeifer M. Activation of bronchial epithelial cells in smokers without airway obstruction and patients with COPD. *Chest*. mayo de 2004;125(5):1706-13.
140. de Boer WI, Sont JK, van Schadewijk A, Stolk J, van Krieken JH, Hiemstra PS. Monocyte chemoattractant protein 1, interleukin 8, and chronic airways inflammation in COPD. *J Pathol*. abril de 2000;190(5):619-26.
141. Profita M, Chiappara G, Mirabella F, Di Giorgi R, Chimenti L, Costanzo G, et al. Effect of cilomilast (Ariflo) on TNF-alpha, IL-8, and GM-CSF release by airway cells of patients with COPD. *Thorax*. julio de 2003;58(7):573-9.
142. Van den Steen PE, Proost P, Wuyts A, Van Damme J, Opdenakker G. Neutrophil gelatinase B potentiates interleukin-8 tenfold by aminoterminal processing, whereas it degrades CTAP-III, PF-4, and GRO-alpha and leaves RANTES and MCP-2 intact. *Blood*. 15 de octubre de 2000;96(8):2673-81.
143. Komaki Y, Sugiura H, Koarai A, Tomaki M, Ogawa H, Akita T, et al. Cytokine-mediated xanthine oxidase upregulation in chronic obstructive pulmonary disease's airways. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*. 1 de agosto de 2005;18(4):297-302.
144. Gearing AJ, Beckett P, Christodoulou M, Churchill M, Clements J, Davidson AH, et al. Processing of tumour necrosis factor-alpha precursor by metalloproteinases. *Nature*. 18 de agosto de 1994;370(6490):555-7.
145. Rusznak C, Mills PR, Devalia JL, Sapsford RJ, Davies RJ, Lozewicz S. Effect of cigarette smoke on the permeability and IL-1beta and sICAM-1 release from cultured human bronchial epithelial cells of never-smokers, smokers, and patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Cell Mol Biol*. octubre de 2000;23(4):530-6.
146. Kusano K, Miyaura C, Inada M, Tamura T, Ito A, Nagase H, et al. Regulation of matrix metalloproteinases (MMP-2, -3, -9, and -13) by interleukin-1 and interleukin-6 in mouse calvaria: association of MMP induction with bone resorption. *Endocrinology*. marzo de 1998;139(3):1338-45.
147. Bhowmik A, Seemungal TA, Sapsford RJ, Wedzicha JA. Relation of sputum inflammatory markers to symptoms and lung function changes in COPD exacerbations. *Thorax*. febrero de 2000;55(2):114-20.
148. SONG W, ZHAO J, LI Z. Interleukin-6 in bronchoalveolar lavage fluid from patients with COPD. *Chinese Medical Journal*. 114(11):1140-2.
149. Bucchioni E, Kharitonov SA, Allegra L, Barnes PJ. High levels of interleukin-6 in the exhaled breath condensate of patients with COPD. *Respiratory Medicine*. 1 de diciembre de 2003;97(12):1299-302.
150. Debigaré R, Marquis K, Côté CH, Tremblay RR, Michaud A, LeBlanc P, et al. Catabolic/anabolic balance and muscle wasting in patients with COPD. *Chest*. julio de 2003;124(1):83-9.
151. Godoy I, Campana AO, Geraldo RRC, Padovani CR, Paiva S a. R. Cytokines and dietary energy restriction in stable chronic obstructive pulmonary disease patients. *European Respiratory Journal*. 1 de diciembre de 2003;22(6):920-5.

152. Hageman GJ, Larik I, Pennings HJ, Haenen GRMM, Wouters EFM, Bast A. Systemic poly(ADP-ribose) polymerase-1 activation, chronic inflammation, and oxidative stress in COPD patients. *Free Radic Biol Med*. 15 de julio de 2003;35(2):140-8.
153. Aldonyte R, Jansson L, Piitulainen E, Janciauskiene S. Circulating monocytes from healthy individuals and COPD patients. *Respiratory Research*. 22 de septiembre de 2003;4(1):11.
154. Senior RM, Tegner H, Kuhn C, Ohlsson K, Starcher BC, Pierce JA. The induction of pulmonary emphysema with human leukocyte elastase. *Am Rev Respir Dis*. septiembre de 1977;116(3):469-75.
155. Damiano VV, Tsang A, Kucich U, Abrams WR, Rosenbloom J, Kimbel P, et al. Immunolocalization of elastase in human emphysematous lungs. *J Clin Invest*. agosto de 1986;78(2):482-93.
156. Owen CA, Campbell MA, Boukedes SS, Campbell EJ. Cytokines regulate membrane-bound leukocyte elastase on neutrophils: a novel mechanism for effector activity. *Am J Physiol*. marzo de 1997;272(3 Pt 1):L385-393.
157. Hansel TT, Kharitonov SA, Donnelly LE, Erin EM, Currie MG, Moore WM, et al. A selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase inhibits exhaled breath nitric oxide in healthy volunteers and asthmatics. *FASEB J*. julio de 2003;17(10):1298-300.
158. Wiegman CH, Michaeloudes C, Haji G, Narang P, Clarke CJ, Russell KE, et al. Oxidative stress-induced mitochondrial dysfunction drives inflammation and airway smooth muscle remodeling in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 1 de septiembre de 2015;136(3):769-80.
159. Stamenkovic I. Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases. *J Pathol*. julio de 2003;200(4):448-64.
160. Shapiro SD, Senior RM. Matrix metalloproteinases. Matrix degradation and more. *Am J Respir Cell Mol Biol*. junio de 1999;20(6):1100-2.
161. Culpitt SV, Maziak W, Loukidis S, Nightingale JA, Matthews JL, Barnes PJ. Effect of high dose inhaled steroid on cells, cytokines, and proteases in induced sputum in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. noviembre de 1999;160(5 Pt 1):1635-9.
162. Betsuyaku T, Nishimura M, Takeyabu K, Tanino M, Venge P, Xu S, et al. Neutrophil granule proteins in bronchoalveolar lavage fluid from subjects with subclinical emphysema. *Am J Respir Crit Care Med*. junio de 1999;159(6):1985-91.
163. Mercer P, Shute J, Bhowmik A, Donaldson G, Wedzicha J, Warner J. MMP-9, TIMP-1 and inflammatory cells in sputum from COPD patients during exacerbation. *Respiratory Research*. 22 de diciembre de 2005;6(1):151.
164. Kwiatkowska S, Noweta K, Zieba M, Nowak D, Bialasiewicz P. Enhanced exhalation of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in patients with COPD exacerbation: a prospective study. *Respiration*. 2012;84(3):231-41.

165. Ohnishi K, Takagi M, Kurokawa Y, Satomi S, Konttinen YT. Matrix metalloproteinase-mediated extracellular matrix protein degradation in human pulmonary emphysema. *Lab Invest.* septiembre de 1998;78(9):1077-87.
166. Kang MJ, Oh YM, Lee JC, Kim DG, Park MJ, Lee MG, et al. Lung matrix metalloproteinase-9 correlates with cigarette smoking and obstruction of airflow. *J Korean Med Sci.* diciembre de 2003;18(6):821-7.
167. Imai K, Dalal SS, Chen ES, Downey R, Schulman LL, Ginsburg M, et al. Human collagenase (matrix metalloproteinase-1) expression in the lungs of patients with emphysema. *Am J Respir Crit Care Med.* marzo de 2001;163(3 Pt 1):786-91.
168. Lim S, Roche N, Oliver BG, Mattos W, Barnes PJ, Chung KF. Balance of matrix metalloprotease-9 and tissue inhibitor of metalloprotease-1 from alveolar macrophages in cigarette smokers. Regulation by interleukin-10. *Am J Respir Crit Care Med.* octubre de 2000;162(4 Pt 1):1355-60.
169. Russell REK, Culpitt SV, DeMatos C, Donnelly L, Smith M, Wiggins J, et al. Release and activity of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 by alveolar macrophages from patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Cell Mol Biol.* mayo de 2002;26(5):602-9.
170. Barnes PJ. Oxidative stress-based therapeutics in COPD. *Redox Biology.* junio de 2020;33:101544.
171. Owen CA, Hu Z, Barrick B, Shapiro SD. Inducible Expression of Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-Resistant Matrix Metalloproteinase-9 on the Cell Surface of Neutrophils. *Am J Respir Cell Mol Biol.* septiembre de 2003;29(3):283-94.
172. Owen CA, Hu Z, Lopez-Otin C, Shapiro SD. Membrane-bound matrix metalloproteinase-8 on activated polymorphonuclear cells is a potent, tissue inhibitor of metalloproteinase-resistant collagenase and serpinase. *J Immunol.* 15 de junio de 2004;172(12):7791-803.
173. Rahman I. Oxidative Stress in Pathogenesis of Chronic Obstructive Pulmonary Disease: Cellular and Molecular Mechanisms. *CBB.* 2005;43(1):167-88.
174. MacNee W. Oxidative stress and lung inflammation in airways disease. *European Journal of Pharmacology.* octubre de 2001;429(1-3):195-207.
175. Rahman I. The Role of Oxidative Stress in the Pathogenesis of COPD: Implications for Therapy. *Treatments in Respiratory Medicine.* 2005;4(3):175-200.
176. Gutteridge JM, Halliwell B. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;899:136-47.
177. Rahman I, MacNee W. Role of transcription factors in inflammatory lung diseases. *Thorax.* 1 de julio de 1998;53(7):601-12.
178. Guyton KZ, Liu Y, Gorospe M, Xu Q, Holbrook NJ. Activation of mitogen-activated protein kinase by H₂O₂. Role in cell survival following oxidant injury. *J Biol Chem.* 23 de febrero de 1996;271(8):4138-42.

179. Drost EM. Oxidative stress and airway inflammation in severe exacerbations of COPD. *Thorax*. 1 de abril de 2005;60(4):293-300.
180. Snider GL. Chronic obstructive pulmonary disease: risk factors, pathophysiology and pathogenesis. *Annu Rev Med*. 1989;40:411-29.
181. Church DF, Pryor WA. Free-radical chemistry of cigarette smoke and its toxicological implications. *Environ Health Perspect*. diciembre de 1985;64:111-26.
182. Pryor WA, Stone K. Oxidants in cigarette smoke. Radicals, hydrogen peroxide, peroxyxynitrate, and peroxyxynitrite. *Ann N Y Acad Sci*. 28 de mayo de 1993;686:12-27; discussion 27-28.
183. Decramer M, Janssens W, Miravittles M. Chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet*. 7 de abril de 2012;379(9823):1341-51.
184. Schaberg T, Klein U, Rau M, Eller J, Lode H. Subpopulations of alveolar macrophages in smokers and nonsmokers: relation to the expression of CD11/CD18 molecules and superoxide anion production. *Am J Respir Crit Care Med*. mayo de 1995;151(5):1551-8.
185. Fischer BM, Voynow JA, Ghio AJ. COPD: balancing oxidants and antioxidants. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2015;10:261-76.
186. Boutten A, Goven D, Boczkowski J, Bonay M. Oxidative stress targets in pulmonary emphysema: focus on the Nrf2 pathway. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*. marzo de 2010;14(3):329-46.
187. Rahman I, Morrison D, Donaldson K, MacNee W. Systemic oxidative stress in asthma, COPD, and smokers. *Am J Respir Crit Care Med*. octubre de 1996;154(4 Pt 1):1055-60.
188. Rahman I, Skwarska E, MacNee W. Attenuation of oxidant/antioxidant imbalance during treatment of exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax*. junio de 1997;52(6):565-8.
189. Rahman I, MacNee W. Oxidant/antioxidant imbalance in smokers and chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax*. abril de 1996;51(4):348-50.
190. Duthie GG, Arthur JR, James WP. Effects of smoking and vitamin E on blood antioxidant status. *Am J Clin Nutr*. abril de 1991;53(4 Suppl):1061S-1063S.
191. Mezzetti A, Lapenna D, Pierdomenico SD, Calafiore AM, Costantini F, Riario-Sforza G, et al. Vitamins E, C and lipid peroxidation in plasma and arterial tissue of smokers and non-smokers. *Atherosclerosis*. 6 de enero de 1995;112(1):91-9.
192. Chow CK, Thacker RR, Changchit C, Bridges RB, Rehm SR, Humble J, et al. Lower levels of vitamin C and carotenoids in plasma of cigarette smokers. *J Am Coll Nutr*. 1986;5(3):305-12.
193. Rahman I, Li XY, Donaldson K, Harrison DJ, MacNee W. Glutathione homeostasis in alveolar epithelial cells in vitro and lung in vivo under oxidative stress. *Am J Physiol*. septiembre de 1995;269(3 Pt 1):L285-292.

194. Li XY, Donaldson K, Rahman I, MacNee W. An investigation of the role of glutathione in increased epithelial permeability induced by cigarette smoke in vivo and in vitro. *Am J Respir Crit Care Med.* junio de 1994;149(6):1518-25.
195. McCusker K, Hoidal J. Selective increase of antioxidant enzyme activity in the alveolar macrophages from cigarette smokers and smoke-exposed hamsters. *Am Rev Respir Dis.* marzo de 1990;141(3):678-82.
196. Kondo T, Tagami S, Yoshioka A, Nishimura M, Kawakami Y. Current smoking of elderly men reduces antioxidants in alveolar macrophages. *Am J Respir Crit Care Med.* enero de 1994;149(1):178-82.
197. Yang SR, Chida AS, Bauter MR, Shafiq N, Seweryniak K, Maggirwar SB, et al. Cigarette smoke induces proinflammatory cytokine release by activation of NF-kappaB and posttranslational modifications of histone deacetylase in macrophages. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* julio de 2006;291(1):L46-57.
198. Di Stefano A, Caramori G, Oates T, Capelli A, Lusuardi M, Gnemmi I, et al. Increased expression of nuclear factor-kappaB in bronchial biopsies from smokers and patients with COPD. *Eur Respir J.* septiembre de 2002;20(3):556-63.
199. Maestrelli P, El Messlemani AH, De Fina O, Nowicki Y, Saetta M, Mapp C, et al. Increased expression of heme oxygenase (HO)-1 in alveolar spaces and HO-2 in alveolar walls of smokers. *Am J Respir Crit Care Med.* 15 de octubre de 2001;164(8 Pt 1):1508-13.
200. Favatier F, Polla BS. Tobacco-smoke-inducible human haem oxygenase-1 gene expression: role of distinct transcription factors and reactive oxygen intermediates. *Biochem J.* 1 de febrero de 2001;353(Pt 3):475-82.
201. Vayssier M, Favatier F, Pinot F, Bachelet M, Polla BS. Tobacco smoke induces coordinate activation of HSF and inhibition of NFkappaB in human monocytes: effects on TNFalpha release. *Biochem Biophys Res Commun.* 9 de noviembre de 1998;252(1):249-56.
202. Tyagi SC. Homocysteine redox receptor and regulation of extracellular matrix components in vascular cells. *Am J Physiol.* febrero de 1998;274(2):C396-405.
203. Foda HD, Rollo EE, Brown P, Pakbaz H, Berisha H, Said SI, et al. Attenuation of oxidant-induced lung injury by the synthetic matrix metalloproteinase inhibitor BB-3103. *Ann N Y Acad Sci.* 30 de junio de 1999;878:650-3.
204. Taggart C, Cervantes-Laurean D, Kim G, McElvaney NG, Wehr N, Moss J, et al. Oxidation of either Methionine 351 or Methionine 358 in α 1-Antitrypsin Causes Loss of Anti-neutrophil Elastase Activity*. *Journal of Biological Chemistry.* 1 de septiembre de 2000;275(35):27258-65.
205. Rossi AG, Haslett C. Inflammation, Cell Injury, and Apoptosis. En: *Proinflammatory and Antiinflammatory Peptides.* CRC Press; 1998.
206. Aoshiba K, Tamaoki J, Nagai A. Acute cigarette smoke exposure induces apoptosis of alveolar macrophages. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* diciembre de 2001;281(6):L1392-1401.

207. Hoshino Y, Mio T, Nagai S, Miki H, Ito I, Izumi T. Cytotoxic effects of cigarette smoke extract on an alveolar type II cell-derived cell line. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. agosto de 2001;281(2):L509-516.
208. Vayssier M, Banzet N, François D, Bellmann K, Polla BS. Tobacco smoke induces both apoptosis and necrosis in mammalian cells: differential effects of HSP70. *Am J Physiol*. octubre de 1998;275(4):L771-779.
209. Kasahara Y, Tuder RM, Cool CD, Lynch DA, Flores SC, Voelkel NF. Endothelial cell death and decreased expression of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor 2 in emphysema. *Am J Respir Crit Care Med*. marzo de 2001;163(3 Pt 1):737-44.
210. Wang J, Wilcken DE, Wang XL. Cigarette smoke activates caspase-3 to induce apoptosis of human umbilical venous endothelial cells. *Mol Genet Metab*. enero de 2001;72(1):82-8.
211. Mullick AE, McDonald JM, Melkonian G, Talbot P, Pinkerton KE, Rutledge JC. Reactive carbonyls from tobacco smoke increase arterial endothelial layer injury. *American Journal of Physiology - Renal Fluid and Electrolyte Physiology* [Internet]. 2002 [citado 22 de febrero de 2022];283(2 52-2). Disponible en: <http://www.scopus.com/inward/record.url?scp=0036076770&partnerID=8YFLogxK>
212. Hall AG. Review: The role of glutathione in the regulation of apoptosis. *Eur J Clin Invest*. marzo de 1999;29(3):238-45.
213. Barnes PJ. Corticosteroid resistance in patients with asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 1 de marzo de 2013;131(3):636-45.
214. Barnes PJ, Baker J, Donnelly LE. Cellular Senescence as a Mechanism and Target in Chronic Lung Diseases. *Am J Respir Crit Care Med*. septiembre de 2019;200(5):556-64.
215. Birch J, Barnes PJ, Passos JF. Mitochondria, telomeres and cell senescence: Implications for lung ageing and disease. *Pharmacology & Therapeutics*. 1 de marzo de 2018;183:34-49.
216. Córdoba-Lanús E, Cazorla-Rivero S, Espinoza-Jiménez A, de-Torres JP, Pajares MJ, Aguirre-Jaime A, et al. Telomere shortening and accelerated aging in COPD: findings from the BODE cohort. *Respir Res*. 13 de abril de 2017;18(1):59.
217. Nakamaru Y, Vuppusetty C, Wada H, Milne JC, Ito M, Rossios C, et al. A protein deacetylase SIRT1 is a negative regulator of metalloproteinase-9. *The FASEB Journal*. 2009;23(9):2810-9.
218. Feghali-Bostwick CA, Gadgil AS, Otterbein LE, Pilewski JM, Stoner MW, Csizmadia E, et al. Autoantibodies in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2008;177(2):156-63.
219. Kirkham PA, Caramori G, Casolari P, Papi AA, Edwards M, Shamji B, et al. Oxidative Stress-induced Antibodies to Carbonyl-modified Protein Correlate with Severity of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med*. octubre de 2011;184(7):796-802.

220. Caramori G, Adcock IM, Casolari P, Ito K, Jazrawi E, Tsaprouni L, et al. Unbalanced oxidant-induced DNA damage and repair in COPD: a link towards lung cancer. *Thorax*. 1 de junio de 2011;66(6):521-7.
221. Adcock IM, Caramori G, Barnes PJ. Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Lung Cancer: New Molecular Insights. *RES*. 2011;81(4):265-84.
222. Ofir D, Laveneziana P, Webb KA, Lam YM, O'Donnell DE. Mechanisms of dyspnea during cycle exercise in symptomatic patients with GOLD stage I chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 15 de marzo de 2008;177(6):622-9.
223. Elbehairy AF, Ciavaglia CE, Webb KA, Guenette JA, Jensen D, Mourad SM, et al. Pulmonary Gas Exchange Abnormalities in Mild Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Implications for Dyspnea and Exercise Intolerance. *Am J Respir Crit Care Med*. 15 de junio de 2015;191(12):1384-94.
224. Burgel PR, Nadel JA. Epidermal growth factor receptor-mediated innate immune responses and their roles in airway diseases. *Eur Respir J*. octubre de 2008;32(4):1068-81.
225. Sakao S, Voelkel NF, Tatsumi K. The vascular bed in COPD: pulmonary hypertension and pulmonary vascular alterations. *Eur Respir Rev*. septiembre de 2014;23(133):350-5.
226. Peinado VI, Pizarro S, Barberà JA. Pulmonary vascular involvement in COPD. *Chest*. octubre de 2008;134(4):808-14.
227. Parker CM, Voduc N, Aaron SD, Webb KA, O'Donnell DE. Physiological changes during symptom recovery from moderate exacerbations of COPD. *Eur Respir J*. septiembre de 2005;26(3):420-8.
228. Miller J, Edwards LD, Agustí A, Bakke P, Calverley PMA, Celli B, et al. Comorbidity, systemic inflammation and outcomes in the ECLIPSE cohort. *Respir Med*. septiembre de 2013;107(9):1376-84.
229. Dougherty JA, Didur BL, Aboussouan LS. Long-Acting Inhaled β 2-Agonists for Stable COPD. *Ann Pharmacother*. 1 de septiembre de 2003;37(9):1247-55.
230. Barnes PJ. New therapies for chronic obstructive pulmonary disease. *Med Princ Pract*. 2010;19(5):330-8.
231. Rennard SI. Chronic obstructive pulmonary disease: linking outcomes and pathobiology of disease modification. *Proc Am Thorac Soc*. mayo de 2006;3(3):276-80.
232. Higgins BG, Powell RM, Cooper S, Tattersfield AE. Effect of salbutamol and ipratropium bromide on airway calibre and bronchial reactivity in asthma and chronic bronchitis. *Eur Respir J*. abril de 1991;4(4):415-20.
233. Vathenen AS, Britton JR, Ebdon P, Cookson JB, Wharrad HJ, Tattersfield AE. High-dose inhaled albuterol in severe chronic airflow limitation. *Am Rev Respir Dis*. octubre de 1988;138(4):850-5.

234. Cazzola M, Rogliani P, Ruggeri P, Segreti A, Proietto A, Picciolo S, et al. Chronic treatment with indacaterol and airway response to salbutamol in stable COPD. *Respir Med.* junio de 2013;107(6):848-53.
235. Melani AS. Long-acting muscarinic antagonists. *Expert Rev Clin Pharmacol.* 2015;8(4):479-501.
236. Lainé DI. Long-acting muscarinic antagonists for the treatment of chronic obstructive pulmonary disease. *Expert Rev Clin Pharmacol.* enero de 2010;3(1):43-53.
237. Ray R, Tombs L, Naya I, Compton C, Lipson DA, Boucot I. Efficacy and safety of the dual bronchodilator combination umeclidinium/vilanterol in COPD by age and airflow limitation severity: A pooled post hoc analysis of seven clinical trials. *Pulm Pharmacol Ther.* agosto de 2019;57:101802.
238. Einecke D. [Dual bronchodilators becomes the first choice combination]. *MMW Fortschr Med.* 9 de junio de 2016;158(11):18.
239. Gross N, Tashkin D, Miller R, Oren J, Coleman W, Linberg S. Inhalation by nebulization of albuterol-ipratropium combination (Dey combination) is superior to either agent alone in the treatment of chronic obstructive pulmonary disease. Dey Combination Solution Study Group. *Respiration.* 1998;65(5):354-62.
240. Farne HA, Cates CJ. Long-acting beta2-agonist in addition to tiotropium versus either tiotropium or long-acting beta2-agonist alone for chronic obstructive pulmonary disease. *Cochrane Database Syst Rev.* 22 de octubre de 2015;(10):CD008989.
241. Reza Maleki-Yazdi M, Molimard M, Keininger DL, Gruenberger JB, Carrasco J, Pitotti C, et al. Cost Effectiveness of the Long-Acting β 2-Adrenergic Agonist (LABA)/Long-Acting Muscarinic Antagonist Dual Bronchodilator Indacaterol/Glycopyrronium Versus the LABA/Inhaled Corticosteroid Combination Salmeterol/Fluticasone in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease: Analyses Conducted for Canada, France, Italy, and Portugal. *Appl Health Econ Health Policy.* octubre de 2016;14(5):579-94.
242. Ferguson GT, Ghafouri M, Dai L, Dunn LJ. COPD patient satisfaction with ipratropium bromide/albuterol delivered via Respimat: a randomized, controlled study. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* 2013;8:139-50.
243. Singh D, Ferguson GT, Bolitschek J, Grönke L, Hallmann C, Bennett N, et al. Tiotropium + olodaterol shows clinically meaningful improvements in quality of life. *Respir Med.* octubre de 2015;109(10):1312-9.
244. van der Molen T, Cazzola M. Beyond lung function in COPD management: effectiveness of LABA/LAMA combination therapy on patient-centred outcomes. *Prim Care Respir J.* marzo de 2012;21(1):101-8.
245. Aubier M. Pharmacotherapy of respiratory muscles. *Clin Chest Med.* junio de 1988;9(2):311-24.
246. McKay SE, Howie CA, Thomson AH, Whiting B, Addis GJ. Value of theophylline treatment in patients handicapped by chronic obstructive lung disease. *Thorax.* 1 de marzo de 1993;48(3):227-32.

247. Moxham J. Aminophylline and the respiratory muscles: an alternative view. *Clin Chest Med.* junio de 1988;9(2):325-36.
248. Zhou Y, Wang X, Zeng X, Qiu R, Xie J, Liu S, 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.* septiembre de 2006;11(5):603-10.
249. Birru RL, Di YP. Pathogenic mechanism of second hand smoke induced inflammation and COPD. *Front Physiol.* 2012;3:348.
250. Spencer S, Calverley PMA, Burge PS, Jones PW. Impact of preventing exacerbations on deterioration of health status in COPD. *European Respiratory Journal.* 1 de mayo de 2004;23(5):698-702.
251. Yang IA, Clarke MS, Sim EHA, Fong KM. Inhaled corticosteroids for stable chronic obstructive pulmonary disease. *Cochrane Database Syst Rev.* 11 de julio de 2012;(7):CD002991.
252. Calverley PMA, Anderson JA, Celli B, Ferguson GT, Jenkins C, Jones PW, et al. Salmeterol and fluticasone propionate and survival in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med.* 22 de febrero de 2007;356(8):775-89.
253. Nannini L, Cates CJ, Lasserson TJ, Poole P. Combined corticosteroid and long acting beta-agonist in one inhaler for chronic obstructive pulmonary disease. *Cochrane Database Syst Rev.* 2004;(3):CD003794.
254. Nannini LJ, Cates CJ, Lasserson TJ, Poole P. Combined corticosteroid and long-acting beta-agonist in one inhaler versus long-acting beta-agonists for chronic obstructive pulmonary disease. *Cochrane Database Syst Rev.* 17 de octubre de 2007;(4):CD006829.
255. Manson SC, Brown RE, Cerulli A, Vidaurre CF. The cumulative burden of oral corticosteroid side effects and the economic implications of steroid use. *Respir Med.* julio de 2009;103(7):975-94.
256. Walters JAE, Tan DJ, White CJ, Gibson PG, Wood-Baker R, Walters EH. Systemic corticosteroids for acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Cochrane Database Syst Rev.* 1 de septiembre de 2014;(9):CD001288.
257. Renkema TE, Schouten JP, Koëter GH, Postma DS. Effects of long-term treatment with corticosteroids in COPD. *Chest.* mayo de 1996;109(5):1156-62.
258. Rice KL, Rubins JB, Lebahn F, Parenti CM, Duane PG, Kuskowski M, et al. Withdrawal of chronic systemic corticosteroids in patients with COPD: a randomized trial. *Am J Respir Crit Care Med.* julio de 2000;162(1):174-8.
259. Rabe KF. Update on roflumilast, a phosphodiesterase 4 inhibitor for the treatment of chronic obstructive pulmonary disease. *Br J Pharmacol.* mayo de 2011;163(1):53-67.
260. Calverley PMA, Rabe KF, Goehring UM, Kristiansen S, Fabbri LM, Martinez FJ, et al. Roflumilast in symptomatic chronic obstructive pulmonary disease: two randomised clinical trials. *Lancet.* 29 de agosto de 2009;374(9691):685-94.

261. Fein A, Fein AM. Management of acute exacerbations in chronic obstructive pulmonary disease. *Curr Opin Pulm Med*. marzo de 2000;6(2):122-6.
262. Francis RS, May JR, Spicer CC. Chemotherapy of Bronchitis. *Br Med J*. 14 de octubre de 1961;2(5258):979-85.
263. Francis RS, Spicer CC. Chemotherapy in chronic bronchitis. Influence of daily penicillin and tetracycline on exacerbations and their cost. *Br Med J*. 30 de enero de 1960;1(5169):297-303.
264. Herath SC, Normansell R, Maisey S, Poole P. Prophylactic antibiotic therapy for chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Cochrane Database Syst Rev*. 30 de octubre de 2018;10:CD009764.
265. Ni W, Shao X, Cai X, Wei C, Cui J, Wang R, et al. Prophylactic Use of Macrolide Antibiotics for the Prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease Exacerbation: A Meta-Analysis. *PLoS One*. 26 de marzo de 2015;10(3):e0121257.
266. Saint S, Bent S, Vittinghoff E, Grady D. Antibiotics in chronic obstructive pulmonary disease exacerbations. A meta-analysis. *JAMA*. 22 de marzo de 1995;273(12):957-60.
267. Cazzola M, Calzetta L, Page C, Jardim J, Chuchalin AG, Rogliani P, et al. Influence of N-acetylcysteine on chronic bronchitis or COPD exacerbations: a meta-analysis. *Eur Respir Rev*. septiembre de 2015;24(137):451-61.
268. Poole P, Sathananthan K, Fortescue R. Mucolytic agents versus placebo for chronic bronchitis or chronic obstructive pulmonary disease. *Cochrane Database Syst Rev*. 20 de mayo de 2019;5:CD001287.
269. Rogliani P, Matera MG, Page C, Puxeddu E, Cazzola M, Calzetta L. Efficacy and safety profile of mucolytic/antioxidant agents in chronic obstructive pulmonary disease: a comparative analysis across erdosteine, carbocysteine, and N-acetylcysteine. *Respir Res*. 27 de mayo de 2019;20(1):104.
270. Wongsurakiat P, Maranetra KN, Wasi C, Kositanont U, Dejsomritrutai W, Charoenratanakul S. Acute respiratory illness in patients with COPD and the effectiveness of influenza vaccination: a randomized controlled study. *Chest*. junio de 2004;125(6):2011-20.
271. Poole PJ, Chacko E, Wood-Baker RWB, Cates CJ. Influenza vaccine for patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Cochrane Database Syst Rev*. 25 de enero de 2006;(1):CD002733.
272. Tomczyk S, Bennett NM, Stoecker C, Gierke R, Moore MR, Whitney CG, et al. Use of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine and 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine among adults aged ≥ 65 years: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 19 de septiembre de 2014;63(37):822-5.
273. Alfageme I, Vazquez R, Reyes N, Muñoz J, Fernández A, Hernandez M, et al. Clinical efficacy of anti-pneumococcal vaccination in patients with COPD. *Thorax*. marzo de 2006;61(3):189-95.

274. Havers FP. Use of Tetanus Toxoid, Reduced Diphtheria Toxoid, and Acellular Pertussis Vaccines: Updated Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices — United States, 2019. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* [Internet]. 2020 [citado 23 de febrero de 2022];69. Disponible en: <https://www.cdc.gov/mmwr/volumes/69/wr/mm6903a5.htm>
275. CDC. CDC's Vaccine Information for Adults with Lung Disease [Internet]. Centers for Disease Control and Prevention. 2021 [citado 23 de febrero de 2022]. Disponible en: <https://www.cdc.gov/vaccines/adults/rec-vac/health-conditions/lung-disease.html>
276. Thompson MG, Stenehjem E, Grannis S, Ball SW, Naleway AL, Ong TC, et al. Effectiveness of Covid-19 Vaccines in Ambulatory and Inpatient Care Settings. *New England Journal of Medicine*. 7 de octubre de 2021;385(15):1355-71.
277. Pavord ID, Chanez P, Criner GJ, Kerstjens HAM, Korn S, Lugogo N, et al. Mepolizumab for Eosinophilic Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *New England Journal of Medicine*. 26 de octubre de 2017;377(17):1613-29.
278. Criner GJ, Bourbeau J, Diekemper RL, Ouellette DR, Goodridge D, Hernandez P, et al. Prevention of acute exacerbations of COPD: American College of Chest Physicians and Canadian Thoracic Society Guideline. *Chest*. abril de 2015;147(4):894-942.
279. Rennard SI, Fogarty C, Kelsen S, Long W, Ramsdell J, Allison J, et al. The safety and efficacy of infliximab in moderate to severe chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 1 de mayo de 2007;175(9):926-34.
280. Gross NJ, Barnes PJ. New Therapies for Asthma and Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 15 de enero de 2017;195(2):159-66.
281. Pérez-Rial S, Girón-Martínez Á, Peces-Barba G. Modelos animales de enfermedad pulmonar obstructiva crónica. *Archivos de Bronconeumología*. marzo de 2015;51(3):121-7.
282. Peces-Barba G, Heili S. Modelos animales de EPOC. *Archivos de Bronconeumología*. enero de 2007;43:30-7.
283. Pérez-Rial S, del Puerto-Nevado L, González-Mangado N, Peces-Barba G. Early Detection of Susceptibility to Acute Lung Inflammation by Molecular Imaging in Mice Exposed to Cigarette Smoke. *Mol Imaging*. septiembre de 2011;10(5):7290.2011.00010.
284. Pérez-Rial S, Puerto-Nevado L del, Terrón-Expósito R, Girón-Martínez Á, González-Mangado N, Peces-Barba G. Role of Recently Migrated Monocytes in Cigarette Smoke-Induced Lung Inflammation in Different Strain of Mice. *PLOS ONE*. 13 de septiembre de 2013;8(9):e72975.
285. Wright JL, Cosio M, Churg A. Animal models of chronic obstructive pulmonary disease. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. julio de 2008;295(1):L1-15.
286. Van Der Strate BWA, Postma DS, Brandsma CA, Melgert BN, Luinge MA, Geerlings M, et al. Cigarette smoke-induced emphysema: A role for the B cell? *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2006;173(7):751-8.

287. Vlahos R, Bozinovski S. Glutathione peroxidase-1 as a novel therapeutic target for COPD. *Redox Report*. julio de 2013;18(4):142-9.
288. Gaschler GJ, Bauer CMT, Zavitz CCJ, Stämpfli MR. Animal models of chronic obstructive pulmonary disease exacerbations. *Contrib Microbiol*. 2007;14:126-41.
289. John G, Kohse K, Orasche J, Reda A, Schnelle-Kreis J, Zimmermann R, et al. The composition of cigarette smoke determines inflammatory cell recruitment to the lung in COPD mouse models. *Clinical Science*. 2014;126(3):207-21.
290. Howard DJ, Briggs LA, Pritsos CA. Oxidative DNA damage in mouse heart, liver, and lung tissue due to acute side-stream tobacco smoke exposure. *Arch Biochem Biophys*. 15 de abril de 1998;352(2):293-7.
291. Beckett EL, Stevens RL, Jarnicki AG, Kim RY, Hanish I, Hansbro NG, et al. A new short-term mouse model of chronic obstructive pulmonary disease identifies a role for mast cell tryptase in pathogenesis. *J Allergy Clin Immunol*. marzo de 2013;131(3):752-62.
292. Hsu ACY, Starkey MR, Hanish I, Parsons K, Haw TJ, Howland LJ, et al. Targeting PI3K-p110 α Suppresses Influenza Virus Infection in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 1 de mayo de 2015;191(9):1012-23.
293. Starkey MR, Jarnicki AG, Essilfie AT, Gellatly SL, Kim RY, Brown AC, et al. Murine models of infectious exacerbations of airway inflammation. *Curr Opin Pharmacol*. junio de 2013;13(3):337-44.
294. Wittels EH, Coalson JJ, Welch MH, Guenter CA. Pulmonary intravascular leukocyte sequestration. A potential mechanism of lung injury. *Am Rev Respir Dis*. mayo de 1974;109(5):502-9.
295. Spond J, Billah MM, Chapman RW, Egan RW, Hey JA, House A, et al. The role of neutrophils in LPS-induced changes in pulmonary function in conscious rats. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*. 1 de junio de 2004;17(3):133-40.
296. Kohno M, Ishizaka A, Sawafuji M, Koh H, Hirayama Y, Ikeda E, et al. Hyperoxia-induced emphysematous changes in subacute phase of endotoxin-induced lung injury in rats. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. julio de 2004;287(1):L184-90.
297. Stolk J, Rudolphus A, Davies P, Osinga D, Dijkman JH, Agarwal L, et al. Induction of emphysema and bronchial mucus cell hyperplasia by intratracheal instillation of lipopolysaccharide in the hamster. *J Pathol*. julio de 1992;167(3):349-56.
298. Nie YC, Wu H, Li PB, Luo YL, Zhang CC, Shen JG, et al. Characteristic comparison of three rat models induced by cigarette smoke or combined with LPS: To establish a suitable model for study of airway mucus hypersecretion in chronic obstructive pulmonary disease. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*. 1 de octubre de 2012;25(5):349-56.
299. Drannik AG, Pouladi MA, Robbins CS, Goncharova SI, Kianpour S, Stämpfli MR. Impact of cigarette smoke on clearance and inflammation after *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Am J Respir Crit Care Med*. 1 de diciembre de 2004;170(11):1164-71.

300. Kensler TW, Wakabayashi N, Biswal S. Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2007;47:89-116.
301. Goven D, Boutten A, Leçon-Malas V, Marchal-Sommé J, Amara N, Crestani B, et al. Altered Nrf2/Keap1-Bach1 equilibrium in pulmonary emphysema. *Thorax.* octubre de 2008;63(10):916-24.
302. Biswal S, Thimmulappa RK, Harvey CJ. Experimental Therapeutics of Nrf2 as a Target for Prevention of Bacterial Exacerbations in COPD. *Proc Am Thorac Soc.* 1 de mayo de 2012;9(2):47-51.
303. Hsu ACY, See HV, Hansbro PM, Wark PAB. Innate immunity to influenza in chronic airways diseases. *Respirology.* noviembre de 2012;17(8):1166-75.
304. Donovan C, Seow HJ, Bourke JE, Vlahos R. Influenza A virus infection and cigarette smoke impair bronchodilator responsiveness to β -adrenoceptor agonists in mouse lung. *Clin Sci (Lond).* 1 de mayo de 2016;130(10):829-37.
305. Gualano RC, Hansen MJ, Vlahos R, Jones JE, Park-Jones RA, Deliyannis G, et al. Cigarette smoke worsens lung inflammation and impairs resolution of influenza infection in mice. *Respiratory Research.* 15 de julio de 2008;9(1):53.
306. Snider GL, Lucey EC, Stone PJ. Animal models of emphysema. *Am Rev Respir Dis.* enero de 1986;133(1):149-69.
307. Suki B, Bartolák-Suki E, Rocco PRM. Elastase-Induced Lung Emphysema Models in Mice. *Methods Mol Biol.* 2017;1639:67-75.
308. Miyabara Y, Ichinose T, Takano H, Lim HB, Sagai M. Effects of diesel exhaust on allergic airway inflammation in mice. *J Allergy Clin Immunol.* noviembre de 1998;102(5):805-12.
309. Hirota JA, Gold MJ, Hiebert PR, Parkinson LG, Wee T, Smith D, et al. The nucleotide-binding domain, leucine-rich repeat protein 3 inflammasome/IL-1 receptor I axis mediates innate, but not adaptive, immune responses after exposure to particulate matter under 10 μ m. *Am J Respir Cell Mol Biol.* enero de 2015;52(1):96-105.
310. Jones B, Donovan C, Liu G, Gomez HM, Chimankar V, Harrison CL, et al. Animal models of COPD: What do they tell us?: Animal models of COPD. *Respirology.* enero de 2017;22(1):21-32.
311. Li K, Keeling B, Churg A. Mineral dusts cause elastin and collagen breakdown in the rat lung: a potential mechanism of dust-induced emphysema. *Am J Respir Crit Care Med.* febrero de 1996;153(2):644-9.
312. Edirisinghe I, Yang SR, Yao H, Rajendrasozhan S, Caito S, Adenuga D, et al. VEGFR-2 inhibition augments cigarette smoke-induced oxidative stress and inflammatory responses leading to endothelial dysfunction. *The FASEB Journal.* 2008;22(7):2297-310.
313. Agustí A, MacNee W, Donaldson K, Cosío M. Hypothesis: Does COPD have an autoimmune component? *Thorax.* 2003;58(10):832-4.
314. Cosío MG, Saetta M, Agustí A. Immunologic aspects of chronic obstructive pulmonary disease. *New England Journal of Medicine.* 2009;360(23):2445.

315. Cosío BG, Agustí A. Autoinmunidad en la EPOC. Archivos de Bronconeumología. 1 de enero de 2005;41:10-4.
316. Kheradmand F, Shan M, Xu C, Corry DB. Autoimmunity in chronic obstructive pulmonary disease: clinical and experimental evidence. Expert Review of Clinical Immunology. 1 de marzo de 2012;8(3):285-92.
317. Taraseviciene-Stewart L, Scerbavicius R, Choe KH, Moore M, Sullivan A, Nicolls MR, et al. An animal model of autoimmune emphysema. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. 2005;171(7):734-42.
318. Taraseviciene-Stewart L, Burns N, Kraskauskas D, Nicolls MR, Tuder RM, Voelkel NF. Mechanisms of autoimmune emphysema. Proceedings of the American Thoracic Society. 2006;3(6):486-7.
319. Kuo YB, Chang C, Wu YK, Hsieh MJ, Tsai CH, Chen KT, et al. Identification and clinical association of anti-cytokeratin 18 autoantibody in COPD. Immunology letters. 16 de febrero de 2010;128:131-6.
320. Mercer JFB, Grimes A, Ambrosini L, Lockhart P, Paynter JA, Dierick H, et al. Mutations in the murine homologue of the Menkes gene in dappled and blotchy mice. Nature Genetics. 1994;6(4):374-8.
321. Fisk DE, Kuhn C. Emphysema like changes in the lungs of the blotchy mouse. American Review of Respiratory Disease. 1976;113(6):787-97.
322. Kielty CM, Raghunath M, Siracusa LD, Sherratt MJ, Peters R, Shuttleworth CA, et al. The Tight skin mouse: Demonstration of mutant fibrillin-1 production and assembly into abnormal microfibrils. Journal of Cell Biology. 1998;140(5):1159-66.
323. Podowski M, Calvi CL, Cheadle C, Tuder RM, Biswals S, Neptune ER. Complex Integration of Matrix, Oxidative Stress, and Apoptosis in Genetic Emphysema. The American Journal of Pathology. 1 de julio de 2009;175(1):84-96.
324. Shibata Y, Zsengeller Z, Otake K, Palaniyar N, Trapnell BC. Alveolar macrophage deficiency in osteopetrotic mice deficient in macrophage colony-stimulating factor is spontaneously corrected with age and associated with matrix metalloproteinase expression and emphysema. Blood. 1 de noviembre de 2001;98(9):2845-52.
325. D'Armiento J, Dalal SS, Okada Y, Berg RA, Chada K. Collagenase expression in the lungs of transgenic mice causes pulmonary emphysema. Cell. 11 de diciembre de 1992;71(6):955-61.
326. Shiomi T, Okada Y, Foronjy R, Schiltz J, Jaenish R, Krane S, et al. Emphysematous changes are caused by degradation of type III collagen in transgenic mice expressing MMP-1. Experimental Lung Research. 2003;29(1):1-15.
327. Jaiswal AK. Nrf2 signaling in coordinated activation of antioxidant gene expression. Free Radic Biol Med. 15 de mayo de 2004;36(10):1199-207.
328. Dhakshinamoorthy S, Long DJ, Jaiswal AK. Antioxidant regulation of genes encoding enzymes that detoxify xenobiotics and carcinogens. Curr Top Cell Regul. 2000;36:201-16.

329. Zhang DD. Mechanistic studies of the Nrf2-Keap1 signaling pathway. *Drug Metab Rev.* 2006;38(4):769-89.
330. Kobayashi M, Yamamoto M. Nrf2-Keap1 regulation of cellular defense mechanisms against electrophiles and reactive oxygen species. *Adv Enzyme Regul.* 2006;46:113-40.
331. Copple IM, Goldring CE, Kitteringham NR, Park BK. The Nrf2-Keap1 defence pathway: role in protection against drug-induced toxicity. *Toxicology.* 3 de abril de 2008;246(1):24-33.
332. Kaspar JW, Niture SK, Jaiswal AK. Nrf2: Nrf2 (Keap1) signaling in oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine.* noviembre de 2009;47(9):1304-9.
333. Sykiotis GP, Bohmann D. Stress-Activated Cap'n'collar Transcription Factors in Aging and Human Disease. *Sci Signal.* 9 de marzo de 2010;3(112):re3.
334. Boutten A, Goven D, Artaud-Macari E, Boczkowski J, Bonay M. NRF2 targeting: a promising therapeutic strategy in chronic obstructive pulmonary disease. *Trends in Molecular Medicine.* julio de 2011;17(7):363-71.
335. Liu Q, Gao Y, Ci X. Role of Nrf2 and Its Activators in Respiratory Diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* 8 de enero de 2019;2019:1-17.
336. Kobayashi A, Kang MI, Watai Y, Tong KI, Shibata T, Uchida K, et al. Oxidative and electrophilic stresses activate Nrf2 through inhibition of ubiquitination activity of Keap1. *Mol Cell Biol.* enero de 2006;26(1):221-9.
337. Ma Q. Role of Nrf2 in Oxidative Stress and Toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2013;53:401-26.
338. Hayes JD, Dinkova-Kostova AT. The Nrf2 regulatory network provides an interface between redox and intermediary metabolism. *Trends Biochem Sci.* abril de 2014;39(4):199-218.
339. Cuadrado A, Manda G, Hassan A, Alcaraz MJ, Barbas C, Daiber A, et al. Transcription Factor NRF2 as a Therapeutic Target for Chronic Diseases: A Systems Medicine Approach. Michel MC, editor. *Pharmacol Rev.* abril de 2018;70(2):348-83.
340. Thor H, Smith MT, Hartzell P, Bellomo G, Jewell SA, Orrenius S. The metabolism of menadione (2-methyl-1,4-naphthoquinone) by isolated hepatocytes. A study of the implications of oxidative stress in intact cells. *J Biol Chem.* 25 de octubre de 1982;257(20):12419-25.
341. Ross D, Siegel D. Functions of NQO1 in Cellular Protection and CoQ10 Metabolism and its Potential Role as a Redox Sensitive Molecular Switch. *Front Physiol.* 24 de agosto de 2017;8:595.
342. Loboda A, Damulewicz M, Pyza E, Jozkowicz A, Dulak J. Role of Nrf2/HO-1 system in development, oxidative stress response and diseases: an evolutionarily conserved mechanism. *Cell Mol Life Sci.* septiembre de 2016;73(17):3221-47.
343. Lubos E, Loscalzo J, Handy DE. Glutathione Peroxidase-1 in Health and Disease: From Molecular Mechanisms to Therapeutic Opportunities. *Antioxidants & Redox Signaling.* octubre de 2011;15(7):1957-97.

344. Pajares M, Cuadrado A, Rojo AI. Modulation of proteostasis by transcription factor NRF2 and impact in neurodegenerative diseases. *Redox Biol.* 10 de enero de 2017;11:543-53.
345. Pajares M, Jiménez-Moreno N, García-Yagüe AJ, Escoll M, de Ceballos ML, Van Leuven F, et al. Transcription factor NFE2L2/NRF2 is a regulator of macroautophagy genes. *Autophagy.* 2 de octubre de 2016;12(10):1902-16.
346. Rojo de la Vega M, Dodson M, Gross C, Mansour HM, Lantz RC, Chapman E, et al. Role of Nrf2 and Autophagy in Acute Lung Injury. *Curr Pharmacol Rep.* abril de 2016;2(2):91-101.
347. Rahman I. Antioxidant therapeutic advances in COPD. *Ther Adv Respir Dis.* diciembre de 2008;2(6):351-74.
348. Tong KI, Padmanabhan B, Kobayashi A, Shang C, Hirotsu Y, Yokoyama S, et al. Different electrostatic potentials define ETGE and DLG motifs as hinge and latch in oxidative stress response. *Mol Cell Biol.* noviembre de 2007;27(21):7511-21.
349. Tonelli C, Chio IIC, Tuveson DA. Transcriptional Regulation by Nrf2. *Antioxid Redox Signal.* 10 de diciembre de 2018;29(17):1727-45.
350. Cullinan SB, Gordan JD, Jin J, Harper JW, Diehl JA. The Keap1-BTB protein is an adaptor that bridges Nrf2 to a Cul3-based E3 ligase: oxidative stress sensing by a Cul3-Keap1 ligase. *Mol Cell Biol.* octubre de 2004;24(19):8477-86.
351. Kobayashi A, Kang MI, Okawa H, Ohtsuji M, Zenke Y, Chiba T, et al. Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2. *Mol Cell Biol.* agosto de 2004;24(16):7130-9.
352. Zhang DD, Lo SC, Cross JV, Templeton DJ, Hannink M. Keap1 Is a Redox-Regulated Substrate Adaptor Protein for a Cul3-Dependent Ubiquitin Ligase Complex. *Molecular and Cellular Biology.* 15 de diciembre de 2004;24(24):10941-53.
353. Furukawa M, Xiong Y. BTB protein Keap1 targets antioxidant transcription factor Nrf2 for ubiquitination by the Cullin 3-Roc1 ligase. *Mol Cell Biol.* enero de 2005;25(1):162-71.
354. Zhang DD, Hannink M. Distinct cysteine residues in Keap1 are required for Keap1-dependent ubiquitination of Nrf2 and for stabilization of Nrf2 by chemopreventive agents and oxidative stress. *Mol Cell Biol.* noviembre de 2003;23(22):8137-51.
355. Wakabayashi N, Dinkova-Kostova AT, Holtzclaw WD, Kang MI, Kobayashi A, Yamamoto M, et al. Protection against electrophile and oxidant stress by induction of the phase 2 response: Fate of cysteines of the Keap1 sensor modified by inducers. *PNAS.* 17 de febrero de 2004;101(7):2040-5.
356. Nioi P, Nguyen T. A mutation of Keap1 found in breast cancer impairs its ability to repress Nrf2 activity. *Biochem Biophys Res Commun.* 3 de noviembre de 2007;362(4):816-21.
357. Li W, Jain MR, Chen C, Yue X, Hebbar V, Zhou R, et al. Nrf2 Possesses a redox-insensitive nuclear export signal overlapping with the leucine zipper motif. *J Biol Chem.* 5 de agosto de 2005;280(31):28430-8.

358. Li W, Yu SW, Kong ANT. Nrf2 Possesses a Redox-sensitive Nuclear Exporting Signal in the Neh5 Transactivation Domain*. *Journal of Biological Chemistry*. 15 de septiembre de 2006;281(37):27251-63.
359. Theodore M, Kawai Y, Yang J, Kleshchenko Y, Reddy SP, Villalta F, et al. Multiple Nuclear Localization Signals Function in the Nuclear Import of the Transcription Factor Nrf2. *J Biol Chem*. 4 de abril de 2008;283(14):8984-94.
360. Li W, Kong AN. Molecular Mechanisms of Nrf2-Mediated Antioxidant Response. *Mol Carcinog*. febrero de 2009;48(2):91-104.
361. Cuadrado A. Structural and functional characterization of Nrf2 degradation by glycogen synthase kinase 3/ β -TrCP. *Free Radic Biol Med*. noviembre de 2015;88(Pt B):147-57.
362. Suzuki M, Betsuyaku T, Ito Y, Nagai K, Nasuhara Y, Kaga K, et al. Down-regulated NF-E2-related factor 2 in pulmonary macrophages of aged smokers and patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Cell Mol Biol*. diciembre de 2008;39(6):673-82.
363. Barnes PJ. Defective antioxidant gene regulation in COPD: a case for broccoli. *Am J Respir Crit Care Med*. 15 de septiembre de 2008;178(6):552-4.
364. Yamada K, Asai K, Nagayasu F, Sato K, Ijiri N, Yoshii N, et al. Impaired nuclear factor erythroid 2-related factor 2 expression increases apoptosis of airway epithelial cells in patients with chronic obstructive pulmonary disease due to cigarette smoking. *BMC Pulm Med*. 9 de febrero de 2016;16:27.
365. Pasini AMF, Stranieri C, Peserico D, Garbin U, Cominacini L. OXIDATIVE STRESS AND NRF2 GENE EXPRESSION IN PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS DERIVED FROM COPD PATIENTS: A LONGITUDINAL STUDY. *Chest*. junio de 2019;155(6):A363.
366. Goven D, Boutten A, Leçon-Malas V, Boczkowski J, Bonay M. Prolonged cigarette smoke exposure decreases heme oxygenase-1 and alters Nrf2 and Bach1 expression in human macrophages: roles of the MAP kinases ERK(1/2) and JNK. *FEBS Lett*. 3 de noviembre de 2009;583(21):3508-18.
367. Yamada N, Yamaya M, Okinaga S, Nakayama K, Sekizawa K, Shibahara S, et al. Microsatellite polymorphism in the heme oxygenase-1 gene promoter is associated with susceptibility to emphysema. *Am J Hum Genet*. enero de 2000;66(1):187-95.
368. Rangasamy T, Cho CY, Thimmulappa RK, Zhen L, Srisuma SS, Kensler TW, et al. Genetic ablation of Nrf2 enhances susceptibility to cigarette smoke-induced emphysema in mice. *J Clin Invest*. noviembre de 2004;114(9):1248-59.
369. Blake DJ, Singh A, Kombairaju P, Malhotra D, Mariani TJ, Tudor RM, et al. Deletion of Keap1 in the Lung Attenuates Acute Cigarette Smoke-Induced Oxidative Stress and Inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol*. mayo de 2010;42(5):524-36.
370. Surh YJ, Kundu JK, Na HK. Nrf2 as a master redox switch in turning on the cellular signaling involved in the induction of cytoprotective genes by some chemopreventive phytochemicals. *Planta Med*. octubre de 2008;74(13):1526-39.

371. Jaccard G, Djoko DT, Korneliou A, Stabbert R, Belushkin M, Esposito M. Mainstream smoke constituents and in vitro toxicity comparative analysis of 3R4F and 1R6F reference cigarettes. *Toxicology Reports*. 1 de enero de 2019;6:222-31.
372. Suh N, Wang Y, Honda T, Gribble GW, Dmitrovsky E, Hickey WF, et al. A novel synthetic oleanane triterpenoid, 2-cyano-3,12-dioxoolean-1,9-dien-28-oic acid, with potent differentiating, antiproliferative, and anti-inflammatory activity. *Cancer Res*. 15 de enero de 1999;59(2):336-41.
373. Wang Y. A Synthetic Triterpenoid, 2-Cyano-3,12-dioxooleana-1,9-dien-28-oic Acid (CDDO), Is a Ligand for the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor. *Molecular Endocrinology*. 1 de octubre de 2000;14(10):1550-6.
374. Liby K, Royce DB, Williams CR, Risingsong R, Yore MM, Honda T, et al. The synthetic triterpenoids CDDO-methyl ester and CDDO-ethyl amide prevent lung cancer induced by vinyl carbamate in A/J mice. *Cancer Res*. 15 de marzo de 2007;67(6):2414-9.
375. Kawamoto Y, Nakamura Y, Naito Y, Torii Y, Kumagai T, Osawa T, et al. Cyclopentenone Prostaglandins as Potential Inducers of Phase II Detoxification Enzymes. *Journal of Biological Chemistry*. abril de 2000;275(15):11291-9.
376. Rossi A, Kapahi P, Natoli G, Takahashi T, Chen Y, Karin M, et al. Anti-inflammatory cyclopentenone prostaglandins are direct inhibitors of I κ B kinase. *Nature*. 6 de enero de 2000;403(6765):103-8.
377. Levonen AL, Landar A, Ramachandran A, Ceaser EK, Dickinson DA, Zanoni G, et al. Cellular mechanisms of redox cell signalling: role of cysteine modification in controlling antioxidant defences in response to electrophilic lipid oxidation products. *Biochem J*. 1 de marzo de 2004;378(Pt 2):373-82.
378. Dinkova-Kostova AT, Liby KT, Stephenson KK, Holtzclaw WD, Gao X, Suh N, et al. Extremely potent triterpenoid inducers of the phase 2 response: correlations of protection against oxidant and inflammatory stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 22 de marzo de 2005;102(12):4584-9.
379. Ahmad R, Raina D, Meyer C, Kharbanda S, Kufe D. Triterpenoid CDDO-Me blocks the NF- κ B pathway by direct inhibition of IKK β on Cys-179. *J Biol Chem*. 24 de noviembre de 2006;281(47):35764-9.
380. Wang YY, Yang YX, Zhe H, He ZX, Zhou SF. Bardoxolone methyl (CDDO-Me) as a therapeutic agent: an update on its pharmacokinetic and pharmacodynamic properties. *Drug Des Devel Ther*. 2014;8:2075-88.
381. Pergola PE, Raskin P, Toto RD, Meyer CJ, Huff JW, Grossman EB, et al. Bardoxolone Methyl and Kidney Function in CKD with Type 2 Diabetes. *N Engl J Med*. 28 de julio de 2011;365(4):327-36.
382. Hu J, Xu Q, McTiernan C, Lai YC, Osei-Hwedieh D, Gladwin M. Novel Targets of Drug Treatment for Pulmonary Hypertension. *Am J Cardiovasc Drugs*. agosto de 2015;15(4):225-34.

383. de Zeeuw D, Akizawa T, Audhya P, Bakris GL, Chin M, Christ-Schmidt H, et al. Bardoxolone Methyl in Type 2 Diabetes and Stage 4 Chronic Kidney Disease. *N Engl J Med.* 26 de diciembre de 2013;369(26):2492-503.
384. Chin MP, Wrolstad D, Bakris GL, Chertow GM, de Zeeuw D, Goldsberry A, et al. Risk factors for heart failure in patients with type 2 diabetes mellitus and stage 4 chronic kidney disease treated with bardoxolone methyl. *J Card Fail.* diciembre de 2014;20(12):953-8.
385. Camer D, Yu Y, Szabo A, Wang H, Dinh CHL, Huang XF. Bardoxolone methyl prevents the development and progression of cardiac and renal pathophysiologies in mice fed a high-fat diet. *Chemico-Biological Interactions.* enero de 2016;243:10-8.
386. Nagaraj S, Youn JI, Weber H, Iclozan C, Lu L, Cotter MJ, et al. Anti-inflammatory triterpenoid blocks immune suppressive function of myeloid-derived suppressor cells and improves immune response in cancer. *Clin Cancer Res.* 15 de marzo de 2010;16(6):1812-23.
387. Chen T, Mou Y, Tan J, Wei L, Qiao Y, Wei T, et al. The protective effect of CDDO-Me on lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice. *Int Immunopharmacol.* marzo de 2015;25(1):55-64.
388. Pei X, Zhang XJ, Chen HM. Bardoxolone treatment alleviates lipopolysaccharide (LPS)-induced acute lung injury through suppressing inflammation and oxidative stress regulated by Nrf2 signaling. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 13 de agosto de 2019;516(1):270-7.
389. Hisamichi M, Kamijo-Ikemori A, Sugaya T, Hoshino S, Kimura K, Shibagaki Y. Role of bardoxolone methyl, a nuclear factor erythroid 2-related factor 2 activator, in aldosterone- and salt-induced renal injury. *Hypertens Res.* enero de 2018;41(1):8-17.
390. Creelan B, Gabrilovich D, Gray J, Williams C, Tanvetyanon T, Haura E, et al. Safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of oral omaveloxolone (RTA 408), a synthetic triterpenoid, in a first-in-human trial of patients with advanced solid tumors. *OTT.* agosto de 2017;Volume 10:4239-50.
391. Probst BL, Trevino I, McCauley L, Bumeister R, Dulubova I, Wigley WC, et al. RTA 408, A Novel Synthetic Triterpenoid with Broad Anticancer and Anti-Inflammatory Activity. *PLoS One.* 2015;10(4):e0122942.
392. El-Hattab AW, Zarante AM, Almannai M, Scaglia F. Therapies for mitochondrial diseases and current clinical trials. *Mol Genet Metab.* noviembre de 2017;122(3):1-9.
393. Chien JY, Chou YY, Ciou JW, Liu FY, Huang SP. The Effects of Two Nrf2 Activators, Bardoxolone Methyl and Omaveloxolone, on Retinal Ganglion Cell Survival during Ischemic Optic Neuropathy. *Antioxidants.* 15 de septiembre de 2021;10(9):1466.
394. Yang CC, Lin CC, Jou MJ, Hsiao LD, Yang CM. RTA 408 Inhibits Interleukin-1 β -Induced MMP-9 Expression via Suppressing Protein Kinase-Dependent NF- κ B and AP-1 Activation in Rat Brain Astrocytes. *Int J Mol Sci.* 10 de junio de 2019;20(11):E2826.

395. Liu X, Ward K, Xavier C, Jann J, Clark AF, Pang IH, et al. The novel triterpenoid RTA 408 protects human retinal pigment epithelial cells against H₂O₂-induced cell injury via NF-E2-related factor 2 (Nrf2) activation. *Redox Biol.* agosto de 2016;8:98-109.
396. Reisman SA, Lee CYI, Meyer CJ, Proksch JW, Sonis ST, Ward KW. Topical application of the synthetic triterpenoid RTA 408 protects mice from radiation-induced dermatitis. *Radiat Res.* mayo de 2014;181(5):512-20.
397. Reisman SA, Lee CYI, Meyer CJ, Proksch JW, Ward KW. Topical application of the synthetic triterpenoid RTA 408 activates Nrf2 and induces cytoprotective genes in rat skin. *Arch Dermatol Res.* julio de 2014;306(5):447-54.
398. Reisman SA, Goldsberry AR, Lee CYI, O'Grady ML, Proksch JW, Ward KW, et al. Topical application of RTA 408 lotion activates Nrf2 in human skin and is well-tolerated by healthy human volunteers. *BMC Dermatol.* 14 de julio de 2015;15:10.
399. Lynch DR, Farmer J, Hauser L, Blair IA, Wang QQ, Mesaros C, et al. Safety, pharmacodynamics, and potential benefit of omaveloxolone in Friedreich ataxia. *Ann Clin Transl Neurol.* enero de 2019;6(1):15-26.
400. Rodden LN, Lynch DR. Designing phase II clinical trials in Friedreich ataxia. *Expert Opin Emerg Drugs.* diciembre de 2021;26(4):415-23.
401. Lynch DR, Chin MP, Delatycki MB, Subramony SH, Corti M, Hoyle JC, et al. Safety and Efficacy of Omaveloxolone in Friedreich Ataxia (MOXIe Study). *Ann Neurol.* febrero de 2021;89(2):212-25.
402. Zhang J hong, Yang X, Chen Y ping, Zhang J feng, Li C qian. Nrf2 Activator RTA-408 Protects Against Ozone-Induced Acute Asthma Exacerbation by Suppressing ROS and γ T17 Cells. *Inflammation.* octubre de 2019;42(5):1843-56.
403. Goldman DC, Alexeev V, Lash E, Guha C, Rodeck U, Fleming WH. The Triterpenoid RTA 408 is a Robust Mitigator of Hematopoietic Acute Radiation Syndrome in Mice. *Radiat Res.* marzo de 2015;183(3):338-44.
404. Reisman SA, Ferguson DA, Lee CYI, Proksch JW. Omaveloxolone and TX63682 are hepatoprotective in the STAM mouse model of nonalcoholic steatohepatitis. *J Biochem Mol Toxicol.* 14 de mayo de 2020;e22526.
405. Richards DM, Brogden RN, Heel RC, Speight TM, Avery GS. Astemizole. A review of its pharmacodynamic properties and therapeutic efficacy. *Drugs.* julio de 1984;28(1):38-61.
406. Zhang QY, Chu XY, Jiang LH, Liu MY, Mei ZL, Zhang HY. Identification of Non-Electrophilic Nrf2 Activators from Approved Drugs. *Molecules.* 26 de mayo de 2017;22(6):883.
407. Lee EH, Oh JH, Park HJ, Kim DG, Lee JH, Kim CY, et al. Simultaneous gene expression signature of heart and peripheral blood mononuclear cells in astemizole-treated rats. *Arch Toxicol.* agosto de 2010;84(8):609-18.
408. Thöny B, Auerbach G, Blau N. Tetrahydrobiopterin biosynthesis, regeneration and functions. *Biochem J.* 1 de abril de 2000;347 Pt 1:1-16.

409. Shi W, Meininger CJ, Haynes TE, Hatakeyama K, Wu G. Regulation of tetrahydrobiopterin synthesis and bioavailability in endothelial cells. *Cell Biochem Biophys*. 2004;41(3):415-34.
410. Katusic ZS, d'Uscio LV, Nath KA. Vascular protection by tetrahydrobiopterin: progress and therapeutic prospects. *Trends Pharmacol Sci*. enero de 2009;30(1):48-54.
411. Montuschi P, Ciabattoni G, Paredi P, Pantelidis P, du Bois RM, Kharitonov SA, et al. 8-Isoprostane as a biomarker of oxidative stress in interstitial lung diseases. *Am J Respir Crit Care Med*. noviembre de 1998;158(5 Pt 1):1524-7.
412. Almudéver P, Milara J, De Diego A, Serrano-Mollar A, Xaubet A, Perez-Vizcaino F, et al. Role of tetrahydrobiopterin in pulmonary vascular remodelling associated with pulmonary fibrosis. *Thorax*. octubre de 2013;68(10):938-48.
413. Mazibuko SE, Joubert E, Johnson R, Louw J, Opoku AR, Muller CJF. Aspalathin improves glucose and lipid metabolism in 3T3-L1 adipocytes exposed to palmitate. *Mol Nutr Food Res*. noviembre de 2015;59(11):2199-208.
414. von Gadow A, Joubert E, Hansmann CF. Comparison of the Antioxidant Activity of Aspalathin with That of Other Plant Phenols of Rooibos Tea (*Aspalathus linearis*), α -Tocopherol, BHT, and BHA. *J Agric Food Chem*. 1 de marzo de 1997;45(3):632-8.
415. Snijman PW, Joubert E, Ferreira D, Li XC, Ding Y, Green IR, et al. Antioxidant activity of the dihydrochalcones Aspalathin and Nothofagin and their corresponding flavones in relation to other Rooibos (*Aspalathus linearis*) Flavonoids, Epigallocatechin Gallate, and Trolox. *J Agric Food Chem*. 12 de agosto de 2009;57(15):6678-84.
416. Krafczyk N, Woyand F, Glomb MA. Structure-antioxidant relationship of flavonoids from fermented rooibos. *Mol Nutr Food Res*. mayo de 2009;53(5):635-42.
417. Dłudla P, Muller C, Joubert E, Louw J, Essop M, Gabuza K, et al. Aspalathin Protects the Heart against Hyperglycemia-Induced Oxidative Damage by Up-Regulating Nrf2 Expression. *Molecules*. 14 de enero de 2017;22(1):129.
418. Surai PF, Earle-Payne K, Kidd MT. Taurine as a Natural Antioxidant: From Direct Antioxidant Effects to Protective Action in Various Toxicological Models. *Antioxidants (Basel)*. 24 de noviembre de 2021;10(12):1876.
419. Huxtable RJ. Taurine. Past, present, and future. *Adv Exp Med Biol*. 1996;403:641-50.
420. Surai PF, Kochish II, Kidd MT. Taurine in poultry nutrition. *Animal Feed Science and Technology*. 1 de febrero de 2020;260:114339.
421. Baliou S, Adamaki M, Ioannou P, Pappa A, Panayiotidis MI, Spandidos DA, et al. Protective role of taurine against oxidative stress (Review). *Mol Med Rep*. agosto de 2021;24(2):605.
422. Chen Y, Zhang Z, Zhang Y, Zhang X, Zhang Z, Liao Y, et al. A New Method for Simultaneous Determination of Phenolic Acids, Alkaloids and Limonoids in *Phellodendri Amurensis* Cortex. *Molecules*. enero de 2019;24(4):709.
423. Xu S, Chen W, Xie Q, Xu Y. Obacunone activates the Nrf2-dependent antioxidant responses. *Protein Cell*. septiembre de 2016;7(9):684-8.

424. Gao Y, Hou R, Liu F, Liu H, Fei Q, Han Y, et al. Obacunone causes sustained expression of MKP-1 thus inactivating p38 MAPK to suppress pro-inflammatory mediators through intracellular MIF. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2018;119(1):837-49.
425. Horiba T, Katsukawa M, Mita M, Sato R. Dietary obacunone supplementation stimulates muscle hypertrophy, and suppresses hyperglycemia and obesity through the TGR5 and PPAR γ pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 7 de agosto de 2015;463(4):846-52.
426. Murthy KNC, Jayaprakasha GK, Patil BS. Cytotoxicity of obacunone and obacunone glucoside in human prostate cancer cells involves Akt-mediated programmed cell death. *Toxicology*. 2 de marzo de 2015;329:88-97.
427. Zhou J, Wang T, Wang H, Jiang Y, Peng S. Obacunone attenuates high glucose-induced oxidative damage in NRK-52E cells by inhibiting the activity of GSK-3 β . *Biochem Biophys Res Commun*. 21 de mayo de 2019;513(1):226-33.
428. Huang DR, Dai CM, Li SY, Li XF. Obacunone protects retinal pigment epithelium cells from ultra-violet radiation-induced oxidative injury. *Aging (Albany NY)*. 1 de febrero de 2021;13(8):11010-25.
429. Poulouse SM, Harris ED, Patil BS. Antiproliferative effects of citrus limonoids against human neuroblastoma and colonic adenocarcinoma cells. *Nutr Cancer*. 2006;56(1):103-12.
430. Yoon J, Park M, Lee J hyung, Min BS, Ryoo S. Endothelial nitric oxide synthase activation through obacunone-dependent arginase inhibition restored impaired endothelial function in ApoE-null mice. *Vascul Pharmacol*. marzo de 2014;60(3):102-9.
431. Lo SC, Li X, Henzl MT, Beamer LJ, Hannink M. Structure of the Keap1:Nrf2 interface provides mechanistic insight into Nrf2 signaling. *EMBO J*. 9 de agosto de 2006;25(15):3605-17.
432. Deshayes S, Morris MC, Divita G, Heitz F. Cell-penetrating peptides: tools for intracellular delivery of therapeutics. *Cell Mol Life Sci*. agosto de 2005;62(16):1839-49.
433. Steel R, Cowan J, Payerne E, O'Connell MA, Searcey M. Anti-inflammatory Effect of a Cell-Penetrating Peptide Targeting the Nrf2/Keap1 Interaction. *ACS Med Chem Lett*. 10 de mayo de 2012;3(5):407-10.
434. Orallo F, Fernández Alzueta A, Loza MI, Vivas N, Badía A, Campos M, et al. Study of the mechanism of the relaxant action of (+)-glaucine in rat vas deferens. *Br J Pharmacol*. noviembre de 1993;110(3):943-8.
435. Rühle KH, Criscuolo D, Dieterich HA, Köhler D, Riedel G. Objective evaluation of dextromethorphan and glaucine as antitussive agents. *Br J Clin Pharmacol*. mayo de 1984;17(5):521-4.
436. Cortijo J, Villagrasa V, Pons R, Berto L, Martí-Cabrera M, Martínez-Losa M, et al. Bronchodilator and anti-inflammatory activities of glaucine: In vitro studies in human airway smooth muscle and polymorphonuclear leukocytes. *Br J Pharmacol*. agosto de 1999;127(7):1641-51.

437. Kondo Y, Imai Y, Hojo H, Endo T, Nozoe S. Suppression of tumor cell growth and mitogen response by aporphine alkaloids, dicentrine, glaucine, corydine, and apomorphine. *J Pharmacobiodyn.* julio de 1990;13(7):426-31.
438. Hoet S, Stévigny C, Block S, Opperdoes F, Colson P, Baldeyrou B, et al. Alkaloids from *Cassytha filiformis* and related aporphines: antitrypanosomal activity, cytotoxicity, and interaction with DNA and topoisomerases. *Planta Med.* mayo de 2004;70(5):407-13.
439. Lei Y, Tan J, Wink M, Ma Y, Li N, Su G. An isoquinoline alkaloid from the Chinese herbal plant *Corydalis yanhusuo* W.T. Wang inhibits P-glycoprotein and multidrug resistance-associate protein 1. *Food Chem.* 15 de febrero de 2013;136(3-4):1117-21.
440. Ivorra MD, Lugnier C, Schott C, Catret M, Noguera MA, Anselmi E, et al. Multiple actions of glaucine on cyclic nucleotide phosphodiesterases, alpha 1-adrenoceptor and benzothiazepine binding site at the calcium channel. *Br J Pharmacol.* junio de 1992;106(2):387-94.
441. Wang C, Zhou J, Wang J, Li S, Fukunaga A, Yodoi J, et al. Progress in the mechanism and targeted drug therapy for COPD. *Signal Transduction and Targeted Therapy* [Internet]. 2020 [citado 10 de marzo de 2022];5. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7588592/>
442. Kang H, Jang SW, Pak JH, Shim S. Glaucine inhibits breast cancer cell migration and invasion by inhibiting MMP-9 gene expression through the suppression of NF- κ B activation. *Mol Cell Biochem.* 2015;403(1):85-94.
443. Pons R, Santamaría P, Suchankova J, Cortijo J, Morcillo EJ. Effects of inhaled glaucine on pulmonary responses to antigen in sensitized guinea pigs. *Eur J Pharmacol.* 26 de mayo de 2000;397(1):187-95.
444. Hatzelmann A, Morcillo EJ, Lungarella G, Adnot S, Sanjar S, Beume R, et al. The preclinical pharmacology of roflumilast--a selective, oral phosphodiesterase 4 inhibitor in development for chronic obstructive pulmonary disease. *Pulm Pharmacol Ther.* agosto de 2010;23(4):235-56.
445. Garnock-Jones KP. Roflumilast: A Review in COPD. *Drugs.* 1 de septiembre de 2015;75(14):1645-56.
446. Cortijo J, Iranzo A, Milara X, Mata M, Cerdá-Nicolás M, Ruiz-Saurí A, et al. Roflumilast, a phosphodiesterase 4 inhibitor, alleviates bleomycin-induced lung injury. *Br J Pharmacol.* febrero de 2009;156(3):534-44.
447. Mata M, Martínez I, Melero JA, Tenor H, Cortijo J. Roflumilast inhibits respiratory syncytial virus infection in human differentiated bronchial epithelial cells. *PLoS One.* 2013;8(7):e69670.
448. Milara J, Armengot M, Bañuls P, Tenor H, Beume R, Artigues E, et al. Roflumilast N-oxide, a PDE4 inhibitor, improves cilia motility and ciliated human bronchial epithelial cells compromised by cigarette smoke in vitro. *Br J Pharmacol.* agosto de 2012;166(8):2243-62.
449. Milara J, Lluch J, Almudever P, Freire J, Xiaozhong Q, Cortijo J. Roflumilast N-oxide reverses corticosteroid resistance in neutrophils from patients with chronic obstructive

- pulmonary disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. agosto de 2014;134(2):314-322.e9.
450. Milara J, Peiró T, Serrano A, Guijarro R, Zaragoza C, Tenor H, et al. Roflumilast N-oxide inhibits bronchial epithelial to mesenchymal transition induced by cigarette smoke in smokers with COPD. *Pulm Pharmacol Ther*. agosto de 2014;28(2):138-48.
451. Milara J, Morell A, Ballester B, Sanz C, Freire J, Qian X, et al. Roflumilast improves corticosteroid resistance COPD bronchial epithelial cells stimulated with toll like receptor 3 agonist. *Respir Res*. 5 de febrero de 2015;16:12.
452. Milara J, Morcillo E, Monleon D, Tenor H, Cortijo J. Roflumilast Prevents the Metabolic Effects of Bleomycin-Induced Fibrosis in a Murine Model. *PLoS One*. 2015;10(7):e0133453.
453. Chen ZH, Kim HP, Sciarba FC, Lee SJ, Feghali-Bostwick C, Stolz DB, et al. Egr-1 Regulates Autophagy in Cigarette Smoke-Induced Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *PLOS ONE*. 2 de octubre de 2008;3(10):e3316.
454. Sampilvanjil A, Karasawa T, Yamada N, Komada T, Higashi T, Baatarjav C, et al. Cigarette smoke extract induces ferroptosis in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 1 de marzo de 2020;318(3):H508-18.
455. Cui W, Zhang Z, Zhang P, Qu J, Zheng C, Mo X, et al. Nrf2 attenuates inflammatory response in COPD/emphysema: Crosstalk with Wnt3a/ β -catenin and AMPK pathways. *J Cell Mol Med*. julio de 2018;22(7):3514-25.
456. Aubry JP, Blaecke A, Lecoanet-Henchoz S, Jeannin P, Herbault N, Caron G, et al. Annexin V used for measuring apoptosis in the early events of cellular cytotoxicity. *Cytometry*. 1 de noviembre de 1999;37(3):197-204.
457. Wlodkowic D, Skommer J, Darzynkiewicz Z. Flow cytometry-based apoptosis detection. *Methods Mol Biol*. 2009;559:19-32.
458. Wollin L, Pieper MP. Tiotropium bromide exerts anti-inflammatory activity in a cigarette smoke mouse model of COPD. *Pulm Pharmacol Ther*. agosto de 2010;23(4):345-54.
459. Dey T, Kalita J, Weldon S, Taggart CC. Proteases and Their Inhibitors in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *J Clin Med*. 28 de agosto de 2018;7(9):244.
460. ProSense 680-NEV10003-NEV10001EX-NEV11171|PerkinElmer [Internet]. [citado 12 de abril de 2022]. Disponible en: <https://www.perkinelmer.com/product/ivisense-pan-cathepsin-680-nev10003>
461. Hou L, Zhang J, Liu Y, Fang H, Liao L, Wang Z, et al. MitoQ alleviates LPS-mediated acute lung injury through regulating Nrf2/Drp1 pathway. *Free Radical Biology and Medicine*. 1 de marzo de 2021;165:219-28.
462. Murakami K, McGuire R, Cox RA, Jodoin JM, Bjertnaes LJ, Katahira J, et al. Heparin Nebulization Attenuates Acute Lung Injury in Sepsis Following Smoke Inhalation in Sheep. *Shock*. septiembre de 2002;18(3):236-41.

463. Edwards SW. *Biochemistry and Physiology of the Neutrophil* [Internet]. Cambridge: Cambridge University Press; 1994 [citado 30 de mayo de 2022]. Disponible en: <https://www.cambridge.org/core/books/biochemistry-and-physiology-of-the-neutrophil/AF00EAE7D75EFEC76BBDFE23A5EB1DEB>
464. Guha P, Dey A, Sen R, Chatterjee M, Chattopadhyay S, Bandyopadhyay SK. Intracellular GSH depletion triggered mitochondrial Bax translocation to accomplish resveratrol-induced apoptosis in the U937 cell line. *J Pharmacol Exp Ther.* enero de 2011;336(1):206-14.
465. Jain SK, Micinski D. Vitamin D upregulates glutamate cysteine ligase and glutathione reductase, and GSH formation, and decreases ROS and MCP-1 and IL-8 secretion in high-glucose exposed U937 monocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 19 de julio de 2013;437(1):7-11.
466. Wu X, Kong Q, Zhan L, Qiu Z, Huang Q, Song X. TIPE2 ameliorates lipopolysaccharide-induced apoptosis and inflammation in acute lung injury. *Inflamm Res.* noviembre de 2019;68(11):981-92.
467. Ehrentraut H, Weisheit CK, Frede S, Hilbert T. Inducing Acute Lung Injury in Mice by Direct Intratracheal Lipopolysaccharide Instillation. *J Vis Exp.* 6 de julio de 2019;(149).
468. Honari N, Shaban P, Nasser S, Hosseini M. Ethanolic extract of *Achillea wilhelmsii* C. Koch improves pulmonary function and inflammation in LPS-induced acute lung injury mice. *J Complement Integr Med.* 6 de mayo de 2021;
469. Li B, Dong C, Wang G, Zheng H, Wang X, Bai C. Pulmonary epithelial CCR3 promotes LPS-induced lung inflammation by mediating release of IL-8. *J Cell Physiol.* septiembre de 2011;226(9):2398-405.
470. Huang WC, Wu SJ, Chen YL, Lin CF, Liou CJ. Tomatidine Improves Pulmonary Inflammation in Mice with Acute Lung Injury. *Mediators Inflamm.* 2021;2021:4544294.
471. Wang J, Luan Y, Fan EK, Scott MJ, Li Y, Billiar TR, et al. TBK1/IKK ϵ Negatively Regulate LPS-Induced Neutrophil Necroptosis and Lung Inflammation. *Shock.* 1 de marzo de 2021;55(3):338-48.
472. Gamble L, Bagby GJ, Quinton LJ, Happel KI, Mizgerd JP, Zhang P, et al. The systemic and pulmonary LPS binding protein response to intratracheal lipopolysaccharide. *Shock.* febrero de 2009;31(2):212-7.
473. Leermakers PA, Remels AHV, Langen RCJ, Schols AMWJ, Gosker HR. Pulmonary inflammation-induced alterations in key regulators of mitophagy and mitochondrial biogenesis in murine skeletal muscle. *BMC Pulm Med.* 21 de enero de 2020;20(1):20.
474. Bundschuh DS, Eltze M, Barsig J, Wollin L, Hatzelmann A, Beume R. In vivo efficacy in airway disease models of roflumilast, a novel orally active PDE4 inhibitor. *J Pharmacol Exp Ther.* abril de 2001;297(1):280-90.
475. Schymeinsky J, Mayer H, Tomsic C, Tilp C, Schuetz JD, Cui Y, et al. The Absence of Mrp4 Has No Effect on the Recruitment of Neutrophils and Eosinophils into the Lung after LPS, Cigarette Smoke or Allergen Challenge. *PLoS One.* 22 de abril de 2013;8(4):e61193.

476. Milara J, Díaz-Platas L, Contreras S, Ribera P, Roger I, Ballester B, et al. MUC1 deficiency mediates corticosteroid resistance in chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Res.* 2018;19:226.
477. Pelgrim CE, Wang L, Peralta Marzal LN, Korver S, van Ark I, Leusink-Muis T, et al. Increased exploration and hyperlocomotion in a cigarette smoke and LPS induced murine model of COPD: linking pulmonary and systemic inflammation with the brain. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 14 de junio de 2022;
478. Zinellu E, Zinellu A, Pau MC, Piras B, Fois AG, Mellino S, et al. Glutathione Peroxidase in Stable Chronic Obstructive Pulmonary Disease: A Systematic Review and Meta-analysis. *Antioxidants (Basel).* 30 de octubre de 2021;10(11):1745.
479. Liao W, Lim AYH, Tan WSD, Abisheganaden J, Wong WSF. Restoration of HDAC2 and Nrf2 by andrographolide overcomes corticosteroid resistance in chronic obstructive pulmonary disease. *Br J Pharmacol.* agosto de 2020;177(16):3662-73.
480. Lee KH, Jeong J, Koo YJ, Jang AH, Lee CH, Yoo CG. Exogenous neutrophil elastase enters bronchial epithelial cells and suppresses cigarette smoke extract-induced heme oxygenase-1 by cleaving sirtuin 1. *J Biol Chem.* 14 de julio de 2017;292(28):11970-9.
481. Fratta Pasini AM, Ferrari M, Stranieri C, Vallerio P, Mozzini C, Garbin U, et al. Nrf2 expression is increased in peripheral blood mononuclear cells derived from mild-moderate ex-smoker COPD patients with persistent oxidative stress. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* 2016;11:1733-43.
482. Li D, Sun D, Zhu Y. Expression of nuclear factor erythroid-2-related factor 2, broad complex-tramtrack-bric a brac and Cap'n'collar homology 1 and γ -glutamic acid cysteine synthase in peripheral blood of patients with chronic obstructive pulmonary disease and its clinical significance. *Exp Ther Med.* mayo de 2021;21(5):516.
483. Carolan BJ, Harvey BG, Hackett NR, O'Connor TP, Cassano PA, Crystal RG. Disparate oxidant gene expression of airway epithelium compared to alveolar macrophages in smokers. *Respir Res.* 2009;10(1):111.
484. Hübner RH, Schwartz JD, De Bishnu P, Ferris B, Omberg L, Mezey JG, et al. Coordinate control of expression of Nrf2-modulated genes in the human small airway epithelium is highly responsive to cigarette smoking. *Mol Med.* agosto de 2009;15(7-8):203-19.
485. Zhao YZ, Chang MY, Xu GC, Li HB, Wang YB, Yao SQ. [Expression of LIAS and NRF2 in PBMCs from patients with silicosis and their correlation with silicosis]. *Zhonghua Lao Dong Wei Sheng Zhi Ye Bing Za Zhi.* 20 de diciembre de 2021;39(12):893-8.
486. Moussa SB, Sfaxi I, Tabka Z, Saad HB, Rouatbi S. Oxidative stress and lung function profiles of male smokers free from COPD compared to those with COPD: a case-control study. *Libyan Journal of Medicine.* 1 de enero de 2014;9(1):23873.
487. Harvey CJ, Thimmulappa RK, Singh A, Blake DJ, Ling G, Wakabayashi N, et al. Nrf2-regulated glutathione recycling independent of biosynthesis is critical for cell survival during oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 15 de febrero de 2009;46(4):443-53.
488. Abel EL, Bubel JD, Simper MS, Powell L, McClellan SA, Andreeff M, et al. Protection against 2-chloroethyl ethyl sulfide (CEES)-induced cytotoxicity in human keratinocytes by

- an inducer of the glutathione detoxification pathway. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1 de septiembre de 2011;255(2):176-83.
489. Siracusa R, D'Amico R, Cordaro M, Peritore AF, Genovese T, Gugliandolo E, et al. The Methyl Ester of 2-Cyano-3,12-Dioxooleana-1,9-Dien-28-Oic Acid Reduces Endometrial Lesions Development by Modulating the NF κ B and Nrf2 Pathways. *Int J Mol Sci.* 13 de abril de 2021;22(8):3991.
490. Abeti R, Baccaro A, Esteras N, Giunti P. Novel Nrf2-Inducer Prevents Mitochondrial Defects and Oxidative Stress in Friedreich's Ataxia Models. *Front Cell Neurosci.* 17 de julio de 2018;12:188.
491. Han P, Qin Z, Tang J, Xu Z, Li R, Jiang X, et al. RTA-408 Protects Kidney from Ischemia-Reperfusion Injury in Mice via Activating Nrf2 and Downstream GSH Biosynthesis Gene. *Oxid Med Cell Longev.* 2017;2017:7612182.
492. Dang X, He B, Ning Q, Liu Y, Guo J, Niu G, et al. Alantolactone suppresses inflammation, apoptosis and oxidative stress in cigarette smoke-induced human bronchial epithelial cells through activation of Nrf2/HO-1 and inhibition of the NF- κ B pathways. *Respir Res.* 2020;21:95.
493. Pace E, Ferraro M, Di Vincenzo S, Cipollina C, Gerbino S, Cigna D, et al. Comparative cytoprotective effects of carbocysteine and fluticasone propionate in cigarette smoke extract-stimulated bronchial epithelial cells. *Cell Stress Chaperones.* noviembre de 2013;18(6):733-43.
494. Huang C, Wang JJ, Ma JH, Jin C, Yu Q, Zhang SX. Activation of the UPR protects against cigarette smoke-induced RPE apoptosis through up-regulation of Nrf2. *J Biol Chem.* 27 de febrero de 2015;290(9):5367-80.
495. Reis R, Orak D, Yilmaz D, Cimen H, Sipahi H. Modulation of cigarette smoke extract-induced human bronchial epithelial damage by eucalyptol and curcumin. *Hum Exp Toxicol.* septiembre de 2021;40(9):1445-62.
496. Zhu S, Aspera-Werz RH, Chen T, Weng W, Braun B, Histing T, et al. Maqui berry extract prevents cigarette smoke induced oxidative stress in human osteoblasts in vitro. *EXCLI J.* 9 de febrero de 2021;20:281-96.
497. Khurana N, Chandra PK, Kim H, Abdel-Mageed AB, Mondal D, Sikka SC. Bardoxolone-Methyl (CDDO-Me) Suppresses Androgen Receptor and Its Splice-Variant AR-V7 and Enhances Efficacy of Enzalutamide in Prostate Cancer Cells. *Antioxidants (Basel).* 12 de enero de 2020;9(1):68.
498. Tran TA, McCoy MK, Sporn MB, Tansey MG. The synthetic triterpenoid CDDO-methyl ester modulates microglial activities, inhibits TNF production, and provides dopaminergic neuroprotection. *J Neuroinflammation.* 12 de mayo de 2008;5:14.
499. Hermann C, Lang S, Popp T, Hafner S, Steinritz D, Rump A, et al. Bardoxolone-Methyl (CDDO-Me) Impairs Tumor Growth and Induces Radiosensitization of Oral Squamous Cell Carcinoma Cells. *Front Pharmacol.* 29 de enero de 2021;11:607580.
500. Thimmulappa RK, Fuchs RJ, Malhotra D, Scollick C, Traore K, Bream JH, et al. Preclinical evaluation of targeting the Nrf2 pathway by triterpenoids (CDDO-Im and CDDO-Me) for

- protection from LPS-induced inflammatory response and reactive oxygen species in human peripheral blood mononuclear cells and neutrophils. *Antioxid Redox Signal*. noviembre de 2007;9(11):1963-70.
501. Xu D, Chen L, Chen X, Wen Y, Yu C, Yao J, et al. The triterpenoid CDDO-imidazolidine ameliorates mouse liver ischemia-reperfusion injury through activating the Nrf2/HO-1 pathway enhanced autophagy. *Cell Death Dis*. 10 de agosto de 2017;8(8):e2983.
502. Zhang CX, Wang T, Ma JF, Liu Y, Zhou ZG, Wang DC. Protective effect of CDDO-ethyl amide against high-glucose-induced oxidative injury via the Nrf2/HO-1 pathway. *Spine J*. julio de 2017;17(7):1017-25.
503. Yang L, Calingasan NY, Thomas B, Chaturvedi RK, Kiaei M, Wille EJ, et al. Neuroprotective effects of the triterpenoid, CDDO methyl amide, a potent inducer of Nrf2-mediated transcription. *PLoS One*. 1 de junio de 2009;4(6):e5757.
504. Deeb D, Gao X, Liu YB, Gautam SC. Inhibition of cell proliferation and induction of apoptosis by CDDO-Me in pancreatic cancer cells is ROS-dependent. *J Exp Ther Oncol*. 2012;10(1):51-64.
505. Deeb D, Gao X, Jiang H, Janic B, Arbab AS, Rojanasakul Y, et al. Oleanane triterpenoid CDDO-Me inhibits growth and induces apoptosis in prostate cancer cells through a ROS-dependent mechanism. *Biochem Pharmacol*. 1 de febrero de 2010;79(3):350-60.
506. GAO X, LIU Y, DEEB D, LIU P, LIU A, ARBAB AS, et al. ROS Mediate Proapoptotic and Antisurvival Activity of Oleanane Triterpenoid CDDO-Me in Ovarian Cancer Cells. *Anticancer Res*. enero de 2013;33(1):215-21.
507. Beinke C, Scherthan H, Port M, Popp T, Hermann C, Eder S. Triterpenoid CDDO-Me induces ROS generation and up-regulates cellular levels of antioxidative enzymes without induction of DSBs in human peripheral blood mononuclear cells. *Radiat Environ Biophys*. agosto de 2020;59(3):461-72.
508. Jin UH, Cheng Y, Zhou B, Safe S. Bardoxolone Methyl and a Related Triterpenoid Downregulate cMyc Expression in Leukemia Cells. *Mol Pharmacol*. mayo de 2017;91(5):438-50.
509. Jutooru I, Guthrie AS, Chadalapaka G, Pathi S, Kim K, Burghardt R, et al. Mechanism of Action of Phenethylisothiocyanate and Other Reactive Oxygen Species-Inducing Anticancer Agents. *Mol Cell Biol*. julio de 2014;34(13):2382-95.
510. Hu L, Cao Y, Chen H, Xu L, Yang Q, Zhou H, et al. The Novel Nrf2 Activator Omaveloxolone Regulates Microglia Phenotype and Ameliorates Secondary Brain Injury after Intracerebral Hemorrhage in Mice. *Oxid Med Cell Longev*. 2022;2022:4564471.
511. Rabbani PS, Ellison T, Waqas B, Sultan D, Abdou S, David JA, et al. Targeted Nrf2 activation therapy with RTA 408 enhances regenerative capacity of diabetic wounds. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 1 de mayo de 2018;139:11-23.
512. Bai Y, Wang W, Wang L, Ma L, Zhai D, Wang F, et al. Obacunone Attenuates Liver Fibrosis with Enhancing Anti-Oxidant Effects of GPx-4 and Inhibition of EMT. *Molecules*. 9 de enero de 2021;26(2):E318.

513. Jeong GS, Byun E, Li B, Lee DS, Kim YC, An RB. Neuroprotective effects of constituents of the root bark of *Dictamnus dasycarpus* in mouse hippocampal cells. *Arch Pharm Res.* agosto de 2010;33(8):1269-75.
514. Li J, Deng S hua, Li J, Li L, Zhang F, Zou Y, et al. Obacunone alleviates ferroptosis during lipopolysaccharide-induced acute lung injury by upregulating Nrf2-dependent antioxidant responses. *Cell Mol Biol Lett.* 19 de marzo de 2022;27:29.
515. Zhang M, Wang S, Wang X, Xu X, Yao Z, Fang W, et al. Allyl isothiocyanate increases MRP1 expression in cigarette smoke extract-stimulated human bronchial epithelial cells via the JNK/Nrf2 pathway. *Exp Ther Med.* abril de 2021;21(4):409.
516. Knörr-Wittmann C, Hengstermann A, Gebel S, Alam J, Müller T. Characterization of Nrf2 activation and heme oxygenase-1 expression in NIH3T3 cells exposed to aqueous extracts of cigarette smoke. *Free Radic Biol Med.* 1 de diciembre de 2005;39(11):1438-48.
517. Adair-Kirk TL, Atkinson JJ, Griffin GL, Watson MA, Kelley DG, DeMello D, et al. Distal airways in mice exposed to cigarette smoke: Nrf2-regulated genes are increased in Clara cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* octubre de 2008;39(4):400-11.
518. Radan M, Dianat M, Badavi M, Mard SA, Bayati V, Ahmadizadeh M. The Association of Cigarette Smoke Exposure with Lung Cellular Toxicity and Oxidative Stress: the Protective Role of Crocin. *Inflammation.* 1 de febrero de 2020;43(1):135-45.
519. Auletta JJ, Alabran JL, Kim BG, Meyer CJ, Letterio JJ. The synthetic triterpenoid, CDDO-Me, modulates the proinflammatory response to in vivo lipopolysaccharide challenge. *J Interferon Cytokine Res.* julio de 2010;30(7):497-508.
520. Noel S, Zheng L, Navas-Acien A, Fuchs RJ. The effect of ex vivo CDDO-Me activation on nuclear factor erythroid 2-related factor 2 pathway in white blood cells from patients with septic shock. *Shock.* noviembre de 2014;42(5):392-9.
521. Nakamura S, Noguchi T, Inoue Y, Sakurai S, Nishinaka A, Hida Y, et al. Nrf2 Activator RS9 Suppresses Pathological Ocular Angiogenesis and Hyperpermeability. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 3 de mayo de 2019;60(6):1943.
522. Pang Z, Jiang Z, Zhu R, Song C, Tang H, Cao L, et al. Bardoxolone-Methyl Prevents Oxidative Stress-Mediated Apoptosis and Extracellular Matrix Degradation in vitro and Alleviates Osteoarthritis in vivo. *Drug Des Devel Ther.* 2021;15:3735-47.
523. Wu QQ, Wang Y, Senitko M, Meyer C, Wigley WC, Ferguson DA, et al. Bardoxolone methyl (BARD) ameliorates ischemic AKI and increases expression of protective genes Nrf2, PPAR γ , and HO-1. *Am J Physiol Renal Physiol.* mayo de 2011;300(5):F1180-1192.
524. Wu J, Liu X, Fan J, Chen W, Wang J, Zeng Y, et al. Bardoxolone methyl (BARD) ameliorates aristolochic acid (AA)-induced acute kidney injury through Nrf2 pathway. *Toxicology.* 6 de abril de 2014;318:22-31.
525. Reisman SA, Gahir SS, Lee CYI, Proksch JW, Sakamoto M, Ward KW. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the novel Nrf2 activator omaxeloxolone in primates. *Drug Des Devel Ther.* 2019;13:1259-70.

526. Zhang L, Zou L, Jiang X, Cheng S, Zhang J, Qin X, et al. Stabilization of Nrf2 leading to HO-1 activation protects against zinc oxide nanoparticles-induced endothelial cell death. *Nanotoxicology*. agosto de 2021;15(6):779-97.
527. Tsai TH, Lin SH, Wu CH, Tsai YC, Yang SF, Lin CL. Mechanisms and therapeutic implications of RTA 408, an activator of Nrf2, in subarachnoid hemorrhage-induced delayed cerebral vasospasm and secondary brain injury. *PLoS One*. 2020;15(10):e0240122.
528. Wei HJ, Pareek TK, Liu Q, Letterio JJ. A unique tolerizing dendritic cell phenotype induced by the synthetic triterpenoid CDDO-DFPA (RTA-408) is protective against EAE. *Sci Rep*. 29 de agosto de 2017;7(1):9886.
529. Hu B, Zhao S, Huang M, Ren J. Nuclear factor E2 related factor (NRF2) inhibits mast cell-mediated allergic inflammation via SIRT4-mediated mitochondrial metabolism. *Ann Palliat Med*. noviembre de 2020;9(6):3839-47.
530. Liang Y, Fan C, Yan X, Lu X, Jiang H, Di S, et al. Berberine ameliorates lipopolysaccharide-induced acute lung injury via the PERK-mediated Nrf2/HO-1 signaling axis. *Phytotherapy Research*. 2019;33(1):130-48.
531. Lee G, Kim JH, Jang HJ, Park JW, Lee JW, Kwon OK, et al. Anti-Inflammatory Effects of the Fraction from the Leaves of *Pyrus pyrifolia* on LPS-Stimulated THP-1 Cells. *Evid Based Complement Alternat Med*. 25 de agosto de 2021;2021:4946241.
532. Song X, Chen G, Li C, Yang C, Deng Y. Tadalafil Alleviates LPS-Induced Inflammation and Oxidative Stress of RWPE-1 Cell by Regulating the Akt/Nrf2 Signaling Pathway. *Inflammation*. 1 de junio de 2021;44(3):890-8.
533. Li J, Hu X, Liang F, Liu J, Zhou H, Liu J, et al. Therapeutic effects of moxibustion simultaneously targeting Nrf2 and NF- κ B in diabetic peripheral neuropathy. *Appl Biochem Biotechnol*. diciembre de 2019;189(4):1167-82.
534. Tsuji G, Takahara M, Uchi H, Matsuda T, Chiba T, Takeuchi S, et al. Identification of ketoconazole as an AhR-Nrf2 activator in cultured human keratinocytes: the basis of its anti-inflammatory effect. *J Invest Dermatol*. enero de 2012;132(1):59-68.
535. Zhao B, Li GP, Peng JJ, Ren LH, Lei LC, Ye HM, et al. Schizandrin B attenuates hypoxia/reoxygenation injury in H9c2 cells by activating the AMPK/Nrf2 signaling pathway. *Exp Ther Med*. marzo de 2021;21(3):220.
536. Gu L, Lin J, Wang Q, Li C, Peng X, Fan Y, et al. Dimethyl itaconate protects against fungal keratitis by activating the Nrf2/HO-1 signaling pathway. *Immunol Cell Biol*. marzo de 2020;98(3):229-41.
537. Khan NM, Haseeb A, Ansari MY, Devarapalli P, Haynie S, Haqqi TM. Wogonin, a plant derived small molecule, exerts potent anti-inflammatory and chondroprotective effects through the activation of ROS/ERK/Nrf2 signaling pathways in human Osteoarthritis chondrocytes. *Free Radic Biol Med*. mayo de 2017;106:288-301.
538. Wu XX, Huang XL, Chen RR, Li T, Ye HJ, Xie W, et al. Paeoniflorin Prevents Intestinal Barrier Disruption and Inhibits Lipopolysaccharide (LPS)-Induced Inflammation in Caco-2 Cell Monolayers. *Inflammation*. diciembre de 2019;42(6):2215-25.

539. Cai D, Yan H, Liu J, Chen S, Jiang L, Wang X, et al. Ergosterol limits osteoarthritis development and progression through activation of Nrf2 signaling. *Exp Ther Med*. marzo de 2021;21(3):194.
540. Hilliard A, Mendonca P, Russell TD, Soliman KFA. The Protective Effects of Flavonoids in Cataract Formation through the Activation of Nrf2 and the Inhibition of MMP-9. *Nutrients*. 27 de noviembre de 2020;12(12):E3651.
541. Petkovic M, Leal EC, Alves I, Bose C, Palade PT, Singh P, et al. Dietary supplementation with sulforaphane ameliorates skin aging through activation of the Keap1-Nrf2 pathway. *J Nutr Biochem*. diciembre de 2021;98:108817.
542. Li H, Li Z, Peng L, Jiang N, Liu Q, Zhang E, et al. Lycium barbarum polysaccharide protects human keratinocytes against UVB-induced photo-damage. *Free Radic Res*. febrero de 2017;51(2):200-10.
543. Liu M, Liu S, Zhang Q, Fang Y, Yu Y, Zhu L, et al. Curculigoside attenuates oxidative stress and osteoclastogenesis via modulating Nrf2/NF- κ B signaling pathway in RAW264.7 cells. *J Ethnopharmacol*. 15 de julio de 2021;275:114129.
544. Bao H, Qu Q, Zhang W, Wang X, Fang J, Xue J, et al. NRF2 Exerts Anti-Inflammatory Effects in LPS-Induced gEECs by Inhibiting the Activation of the NF- κ B. *Mediators Inflamm*. 2021;2021:9960721.
545. Demedts IK, Demoor T, Bracke KR, Joos GF, Brusselle GG. Role of apoptosis in the pathogenesis of COPD and pulmonary emphysema. *Respir Res*. 30 de marzo de 2006;7:53.
546. Liu X, Wang J, Luo H, Xu C, Chen X, Zhang R. MiR-218 Inhibits CSE-Induced Apoptosis and Inflammation in BEAS-2B by Targeting BRD4. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2020;15:3407-16.
547. Chen P, Jiang P, Chen J, Yang Y, Guo X. XIST promotes apoptosis and the inflammatory response in CSE-stimulated cells via the miR-200c-3p/EGR3 axis. *BMC Pulm Med*. 9 de julio de 2021;21(1):215.
548. Sun X, Feng X, Zheng D, Li A, Li C, Li S, et al. Ergosterol attenuates cigarette smoke extract-induced COPD by modulating inflammation, oxidative stress and apoptosis in vitro and in vivo. *Clin Sci (Lond)*. 15 de julio de 2019;133(13):1523-36.
549. Wu G, Yuan T, Zhu H, Zhang H, Su J, Guo L, et al. Chrysophanol protects human bronchial epithelial cells from cigarette smoke extract (CSE)-induced apoptosis. *Int J Mol Epidemiol Genet*. 2020;11(3):39-45.
550. Liu Q, Zhao M, Chen W, Xu K, Huang F, Qu J, et al. Mainstream cigarette smoke induces autophagy and promotes apoptosis in oral mucosal epithelial cells. *Arch Oral Biol*. marzo de 2020;111:104646.
551. Wang L, Jiang W, Wang J, Xie Y, Wang W. Puerarin inhibits FUNDC1-mediated mitochondrial autophagy and CSE-induced apoptosis of human bronchial epithelial cells by activating the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. *Aging (Albany NY)*. 8 de febrero de 2022;14(3):1253-64.

552. Vij N, Chandramani-Shivalingappa P, Van Westphal C, Hole R, Bodas M. Cigarette smoke-induced autophagy impairment accelerates lung aging, COPD-emphysema exacerbations and pathogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol*. 1 de enero de 2018;314(1):C73-87.
553. Cui Y, Liang Y, Ip MSM, Mak JCW. Cigarette smoke induces apoptosis via 18 kDa translocator protein in human bronchial epithelial cells. *Life Sci*. 15 de enero de 2021;265:118862.
554. Borella R, Forti L, Gibellini L, De Gaetano A, De Biasi S, Nasi M, et al. Synthesis and Anticancer Activity of CDDO and CDDO-Me, Two Derivatives of Natural Triterpenoids. *Molecules*. 13 de noviembre de 2019;24(22):4097.
555. Wang XY, Zhang XH, Peng L, Liu Z, Yang YX, He ZX, et al. Bardoxolone methyl (CDDO-Me or RTA402) induces cell cycle arrest, apoptosis and autophagy via PI3K/Akt/mTOR and p38 MAPK/Erk1/2 signaling pathways in K562 cells. *Am J Transl Res*. 2017;9(10):4652-72.
556. Konopleva M, Tsao T, Ruvolo P, Stiouf I, Estrov Z, Leysath CE, et al. Novel triterpenoid CDDO-Me is a potent inducer of apoptosis and differentiation in acute myelogenous leukemia. *Blood*. 1 de enero de 2002;99(1):326-35.
557. Kim JE, Park H, Kang TC. CDDO-Me Distinctly Regulates Regional Specific Astroglial Responses to Status Epilepticus via ERK1/2-Nrf2, PTEN-PI3K-AKT and NFκB Signaling Pathways. *Antioxidants (Basel)*. 21 de octubre de 2020;9(10):1026.
558. Kocak C, Kocak FE, Akcilar R, Bayat Z, Aras B, Metineren MH, et al. Effects of captopril, telmisartan and bardoxolone methyl (CDDO-Me) in ischemia-reperfusion-induced acute kidney injury in rats: an experimental comparative study. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. febrero de 2016;43(2):230-41.
559. Alexeev V, Lash E, Aguilard A, Corsini L, Bitterman A, Ward K, et al. Radiation protection of the gastrointestinal tract and growth inhibition of prostate cancer xenografts by a single compound. *Mol Cancer Ther*. diciembre de 2014;13(12):2968-77.
560. Chidambara Murthy KN, Jayaprakasha GK, Patil BS. Apoptosis mediated cytotoxicity of citrus obacunone in human pancreatic cancer cells. *Toxicol In Vitro*. junio de 2011;25(4):859-67.
561. Chidambara Murthy KN, Jayaprakasha GK, Patil BS. Obacunone and obacunone glucoside inhibit human colon cancer (SW480) cells by the induction of apoptosis. *Food Chem Toxicol*. julio de 2011;49(7):1616-25.
562. Kim J, Jayaprakasha GK, Patil BS. Obacunone exhibits anti-proliferative and anti-aromatase activity in vitro by inhibiting the p38 MAPK signaling pathway in MCF-7 human breast adenocarcinoma cells. *Biochimie*. octubre de 2014;105:36-44.
563. Li Y, Huang J, Foley NM, Xu Y, Li YP, Pan J, et al. B7H3 ameliorates LPS-induced acute lung injury via attenuation of neutrophil migration and infiltration. *Sci Rep*. 12 de agosto de 2016;6:31284.
564. Abraham E. Neutrophils and acute lung injury. *Crit Care Med*. abril de 2003;31(4 Suppl):S195-199.

565. Grommes J, Soehnlein O. Contribution of neutrophils to acute lung injury. *Mol Med*. abril de 2011;17(3-4):293-307.
566. Bhattacharya J, Matthay MA. Regulation and repair of the alveolar-capillary barrier in acute lung injury. *Annu Rev Physiol*. 2013;75:593-615.
567. Płóciennikowska A, Hromada-Judycka A, Borzęcka K, Kwiatkowska K. Co-operation of TLR4 and raft proteins in LPS-induced pro-inflammatory signaling. *Cell Mol Life Sci*. 2015;72(3):557-81.
568. Ciesielska A, Matyjek M, Kwiatkowska K. TLR4 and CD14 trafficking and its influence on LPS-induced pro-inflammatory signaling. *Cell Mol Life Sci*. 2021;78(4):1233-61.
569. Lai JL, Liu YH, Liu C, Qi MP, Liu RN, Zhu XF, et al. Indirubin Inhibits LPS-Induced Inflammation via TLR4 Abrogation Mediated by the NF- κ B and MAPK Signaling Pathways. *Inflammation*. febrero de 2017;40(1):1-12.
570. Ai M, Lin S, Zhang M, Wu T, Yang N, Li Y, et al. Cirsilineol attenuates LPS-induced inflammation in both in vivo and in vitro models via inhibiting TLR-4/NF κ B/IKK signaling pathway. *J Biochem Mol Toxicol*. agosto de 2021;35(8):e22799.
571. Vlahos R, Bozinovski S. Recent advances in pre-clinical mouse models of COPD. *Clin Sci (Lond)*. febrero de 2014;126(4):253-65.
572. Du ZA, Sun MN, Hu ZS. Saikosaponin a Ameliorates LPS-Induced Acute Lung Injury in Mice. *Inflammation*. febrero de 2018;41(1):193-8.
573. Yuan C bo, Tian L, Yang B, Zhou H yan. Isoalantolactone protects LPS-induced acute lung injury through Nrf2 activation. *Microbial Pathogenesis*. 1 de octubre de 2018;123:213-8.
574. Zhang Z, Zhou J, Song D, Sun Y, Liao C, Jiang X. Gastrodin protects against LPS-induced acute lung injury by activating Nrf2 signaling pathway. *Oncotarget*. 31 de marzo de 2017;8(19):32147-56.
575. Kim KH, Kwun MJ, Han CW, Ha KT, Choi JY, Joo M. Suppression of lung inflammation in an LPS-induced acute lung injury model by the fruit hull of *Gleditsia sinensis*. *BMC Complement Altern Med*. 15 de octubre de 2014;14:402.
576. Cheng L, Li F, Ma R, Hu X. Forsythiaside inhibits cigarette smoke-induced lung inflammation by activation of Nrf2 and inhibition of NF- κ B. *International Immunopharmacology*. 1 de septiembre de 2015;28(1):494-9.
577. Zhang DF, Zhang J, Li R. Salvianolic acid B attenuates lung inflammation induced by cigarette smoke in mice. *European Journal of Pharmacology*. 15 de agosto de 2015;761:174-9.
578. Yang H, Lv H, Li H, Ci X, Peng L. Oridonin protects LPS-induced acute lung injury by modulating Nrf2-mediated oxidative stress and Nrf2-independent NLRP3 and NF- κ B pathways. *Cell Commun Signal*. 11 de junio de 2019;17:62.
579. Li Y, Chen X, Zhang H, Xiao J, Yang C, Chen W, et al. 4-Octyl Itaconate Alleviates Lipopolysaccharide-Induced Acute Lung Injury in Mice by Inhibiting Oxidative Stress and Inflammation. *Drug Des Devel Ther*. 17 de diciembre de 2020;14:5547-58.

580. Posso SV, Quesnot N, Moraes JA, Brito-Gitirana L, Kennedy-Feitosa E, Barroso MV, et al. AT-RVD1 repairs mouse lung after cigarette smoke-induced emphysema via downregulation of oxidative stress by NRF2/KEAP1 pathway. *International Immunopharmacology*. 1 de marzo de 2018;56:330-8.
581. Medina MV, Sapochnik D, Solá MG, Coso O. Regulation of the Expression of Heme Oxygenase-1: Signal Transduction, Gene Promoter Activation, and Beyond. *Antioxidants & Redox Signaling* [Internet]. 31 de marzo de 2020 [citado 12 de julio de 2022]; Disponible en: <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/ars.2019.7991>
582. Puentes-Pardo J, Moreno-Sanjuan S, Carazo Á, Leon J. Heme Oxygenase-1 in Gastrointestinal Tract Health and Disease. *Antioxidants*. 2 de diciembre de 2020;9:1214.
583. Jaiswal AK. Regulation of genes encoding NAD(P)H:quinone oxidoreductases. *Free Radical Biology and Medicine*. 1 de agosto de 2000;29(3):254-62.
584. Farombi EO, Surh YJ. Heme oxygenase-1 as a potential therapeutic target for hepatoprotection. *J Biochem Mol Biol*. 30 de septiembre de 2006;39(5):479-91.
585. Ng DSW, Liao W, Tan WSD, Chan TK, Loh XY, Wong WSF. Anti-malarial drug artesunate protects against cigarette smoke-induced lung injury in mice. *Phytomedicine*. 15 de octubre de 2014;21(12):1638-44.
586. Ansari MN, Aloliet RI, Ganaie MA, Khan TH, Najeeb-Ur-Rehman null, Imam F, et al. Roflumilast, a phosphodiesterase 4 inhibitor, attenuates cadmium-induced renal toxicity via modulation of NF- κ B activation and induction of NQO1 in rats. *Hum Exp Toxicol*. mayo de 2019;38(5):588-97.
587. Baigent C, Lennon R. Should We Increase GFR with Bardoxolone in Alport Syndrome? *J Am Soc Nephrol*. febrero de 2018;29(2):357-9.

ANEXOS

Anexo I – Documentación comité ético de investigación clínica (CEIC) del Consorcio Hospital General Universitario de Valencia



Consorcio Hospital General Universitario de Valencia

Comité Ético de Investigación Clínica

APROBACIÓN PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN

- ANEXO 11 -

Este CEIm tras evaluar en su reunión de 21 de Diciembre de 2017 el Proyecto de Investigación:

Título:	Activación del factor eritroide nuclear 2 como terapia antioxidante en la EPOC y el SDRA: estudios en tejidos humanos in vitro y en modelos animales in vivo		
I.P.:	Julio Cortijo Gimeno	Servicio/Unidad	Investigación y Docencia

Acuerda respecto a esta documentación:

Que se cumplen los requisitos éticos y metodológicos y la Hoja de Información al Paciente y Consentimiento Informado presentado reúnen las condiciones exigidas por este CEIC, por tanto se decide su APROBACIÓN.

COMPOSICIÓN DEL CEIm

Presidente: Dra. Elena Rubio Gomis (Unidad de Farmacología Clínica)

Vocales:

- Dr. Francisco Antón García (Att primaria)
- Dra. Pilar Blasco Segura (Servicio de Farmacia)
- Dr. Ernesto Bataller Alonso (Director Económico del CHGUV)
- Dña. Pepa Balaguer Cusi (Miembro independiente de la organización asistencial)
- Dr. Enrique Ortega Gonzalez (Gerente Chguv)
- Dra. Dolores Ocete Mochón (Servicio de Microbiología)
- Dr. Miguel Garcia del Toro (Unidad de Infecciosos)
- D. Fráncico Javier Gracia Pérez (Servicio de Reanimación)
- Dr. Julio Cortijo Gimeno (Unidad de Docencia e Investigación)
- Dña. María Teresa Jareño (Unidad de Reanimación Cardiaca)
- D. Alejandro Moner González (Gerencia CHGUV – Asesoría Jurídica)
- Dr. Alberto Berenguer Jofresa (Servicio de Cardiología)
- Dra. Ana Blasco Cordellat (Servicio de Oncología)
- Dr. Antonio Martorell Aragonés (Unidad de Alergología)



Consorcio Hospital General Universitario de Valencia

Comité Ético de Investigación Clínica

- Dr. Aurelio Quesada Dorador (Servicio de Cardiología)
- Dra. M^a José Safont Aguilera (Servicio de Oncología)
- Dr. Javier Millara Payá (Servicio de Farmacia)
- Dra. Goitzane Marcaida Benito (Servicio de Análisis Clínicos)
- Dr. Pedro Polo Martín (Servicio de Pediatría- Atención Primaria)
- Dña. Carmen Sarmiento Cabañes (Miembro independiente de la organización asistencial)
- Dr. Enrique Zapater Latorre (Servicio de Otorrino)

Secretario: Dr. Elias Ruiz Rojo (Farmacéutico Att Primaria)

El CEIm del Consorcio Hospital General Universitario de Valencia, cumple con las normas de BPC (CPMP/ICH/135/95) tanto en su composición como en sus procedimientos y con la legislación vigente que regula su funcionamiento, y que la composición del CEIm es la indicada en el anexo I, teniendo en cuenta que en el caso de que algún miembro participe en el ensayo o declare algún conflicto de interés no habrá participado en la evaluación ni en el dictamen de la solicitud de autorización del ensayo clínico

Lo que comunico a efectos oportunos:

Valencia a 28 de diciembre de 2017

Fdo. Dra. Elena Rubio Gomis (Presidenta CEIC CHGV)


Anexo I – Documentación comité ético de la investigación con medicamentos (CEIm) del Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia



FPNT-CEIB-04 (B)

DICTAMEN DEL COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN CON MEDICAMENTOS

Dña. María Tordera Baviera, titular de la Secretaría Técnica del Comité de Ética de la Investigación con medicamentos del Hospital Universitario y Politécnico La Fe,

CERTIFICA

Que este Comité ha evaluado en su sesión de fecha **27 de Junio de 2018**, el Proyecto de Investigación:

Título: **“ACTIVATION OF NUCLEAR FACTOR ERYTHROID 2-RELATED (NRF2) SYSTEM AS AN ANTI-OXIDANT THERAPY IN COPD AND ARDS PATIENTS: INSIGHTS IN HUMAN AND ANIMAL MODELS.”**

Nº de registro: **2017/0583**

Versión/fecha de la memoria del proyecto: **PROYECTOS EXCELENCIA Y PROYECTOS RETOS – CONVOCATORIA 2017**

Versión/fecha de la Hoja de Información al Paciente y Consentimiento Informado: **1/ 04 de junio de 2018**

Versión/fecha de la Hoja de Información al Paciente y Consentimiento Informado para Individuos Sanos: **1/ 04 de junio de 2018**

Que dicho proyecto se ajusta a las normativas éticas sobre investigación biomédica con sujetos humanos y es viable en cuanto al planteamiento científico, objetivos, material y métodos, etc, descritos en la solicitud, así como la Hoja de Información al Paciente y el Consentimiento Informado.

En consecuencia, este Comité acuerda emitir **INFORME FAVORABLE** de dicho Proyecto de Investigación que será realizado en el Hospital Universitario y Politécnico La Fe por el/la **Dr. / Dra. Alfredo De Diego Damiá** del servicio/unidad/grupo de investigación de **NEUMOLOGÍA** como Investigador Principal.

Que el CEIm del Hospital Universitario y Politécnico **La Fe**, tanto en su composición como en sus procedimientos, cumple con las normas de BPC (CPMP/ICH/135/95) y con la legislación vigente que regula su funcionamiento, y que la composición del CEIm del Hospital Universitario y Politécnico La Fe es la indicada en el anexo I, teniendo en cuenta que, en el caso de que algún miembro participe en el estudio o declare algún conflicto de interés, no habrá participado en la evaluación ni en el dictamen de la solicitud de autorización del estudio clínico.

Lo que firmo en Valencia, a **27 de junio de 2018**



Fdo.: **Dra. María Tordera Baviera**
Secretaría Técnica del Comité de Ética de la Investigación con medicamentos



FPNT-CEIB-04 (B)

ANEXO I COMPOSICIÓN CEIm

Presidente:

Dra. Adela Cañete Nieto (Oncología Pediátrica)

Vicepresidente:

Dr. Salvador Aliño Pellicer (Catedrático Farmacólogo Clínico)

Secretaria Técnica:

Dra. María Tordera Baviera (Farmacéutica del Hospital)

Miembros:

Dr. Bonaventura Casanova Estruch (Neurología)

Dra. M^a Isabel Izquierdo Macián (Neonatología)

Dr. Luis Vicente Martínez Dolz (Cardiología)

Dra. Paula Ramírez Gallego (Medicina Intensiva - Miembro de la Comisión de Investigación)

Dra. Sara Brugger Frigols (Radiodiagnóstico)

D. Serafín Rodríguez Capellán (Licenciado en derecho - Ajeno a las profesiones sanitarias)

Dña. María Victoria Paricio Gómez (Enfermería)

Dr. José María Canelles Gamir (Farmacéutico de Atención Primaria)

Dr. Matteo Frasson (Cirugía General y Aparato Digestivo)

Dr. José Vicente Solanas Prats (Atención Primaria)

Dña. Pilar Robles Villalba (Vicepresidenta de la asociación de Miastenia - Miembro ajeno a las profesiones sanitarias)

Dr. Javier Lluna González (Cirugía Pediátrica - Miembro del Comité de Ética Asistencial - Formación acreditada en Bioética)

D. Miguel Ángel Cano Torres (Secretario de ASLEUVAL - Miembro Lego - Ajeno a las profesiones sanitarias)

Anexo II – Autorización procedimiento “Activation of Nuclear Factor Erythroid 2-related (Nrf2) system as an antioxidant therapy in COPD and ARDS patients: insights in human and animal models”



Dirección General de Agricultura, Ganadería y Pesca
Ciudad Administrativa 9 de Octubre
Calle de La Democracia, 77 - 46018 Valencia
www.gva.es



AUTORIZACION PROCEDIMIENTO 2020/VSC/PEA/0213

Vista la solicitud realizada en fecha 02/11/20 con nº reg. entrada 1616772 por D/D^a. Carlos Hermenegildo Caudevilla, Vicerrector de Investigación y Política Científica, centro usuario ES462500001003, para realizar el procedimiento:

“Activation of Nuclear Factor Erythroid 2-related (Nrf2) system as an antioxidant therapy in COPD and ARDS patients: insights in human and animal models.”

Teniendo en cuenta la documentación aportada, según se indica en el artículo 33, punto 5 y 6, y puesto que dicho procedimiento se halla sujeto a autorización en virtud de lo dispuesto en el artículo 31 del Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero,

Vista la propuesta del jefe del servicio de Producción y Sanidad Animal.

AUTORIZO:

la realización de dicho procedimiento al que se le asigna el código: 2020/VSC/PEA/0213 tipo 2, de acuerdo con las características descritas en la propia documentación para el número de animales, especie y periodo de tiempo solicitado. Todo ello sin menoscabo de las autorizaciones pertinentes, por otras Administraciones y entidades, y llevándose a cabo en las siguientes condiciones:

Usuario: Universidad de Valencia-Estudio General

Responsable del proyecto: Julio Cortijo Gimeno

Establecimiento: Animalario Unidad Central de Investigación (Fac. Medicina y Odontología) Valencia

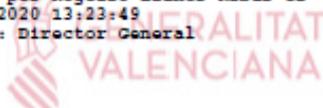
Necesidad de evaluación retrospectiva:

Condiciones específicas:

Observaciones:

Valencia a, fecha de la firma electrónica
El director general de Agricultura, Ganadería y Pesca

Firmat per Rogelio Llanes Ribas el
08/11/2020 13:23:49
Càrrec: Director General



Anexo III – Autorización procedimiento “Activación del Factor Nuclear Eritroide 2 (Nrf2) como terapia antioxidante en pacientes EPOC”



Dirección General de Agricultura, Ganadería y Pesca
Ciudad Administrativa 9 de Octubre
Calle de La Democracia, 77 - 46018 Valencia
www.gva.es



AUTORIZACION PROCEDIMIENTO 2020/VSC/PEA/0212

Vista la solicitud realizada en fecha 02/11/20 con nº reg. entrada 1616683 por D/D^a. Carlos Hermenegildo Caudevilla, Vicerrector de Investigación y Política Científica, centro usuario ES462500001003, para realizar el procedimiento:

“Activación del Factor Nuclear Eritroide 2 (Nrf2) como terapia antioxidante en pacientes EPOC.”

Teniendo en cuenta la documentación aportada, según se indica en el artículo 33, punto 5 y 6, y puesto que dicho procedimiento se halla sujeto a autorización en virtud de lo dispuesto en el artículo 31 del Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero,

Vista la propuesta del jefe del servicio de Producción y Sanidad Animal.

AUTORIZO:

la realización de dicho procedimiento al que se le asigna el código: 2020/VSC/PEA/0212 tipo 2, de acuerdo con las características descritas en la propia documentación para el número de animales, especie y periodo de tiempo solicitado. Todo ello sin menoscabo de las autorizaciones pertinentes, por otras Administraciones y entidades, y llevándose a cabo en las siguientes condiciones:

Usuario: Universidad de Valencia-Estudio General

Responsable del proyecto: Julio Cortijo Gimeno

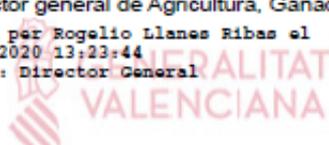
Establecimiento: Animalario Unidad Central de Investigación (Fac. Medicina y Odontología) Valencia

Necesidad de evaluación retrospectiva:

Condiciones específicas:

Observaciones:

Valencia a, fecha de la firma electrónica
El director general de Agricultura, Ganadería y Pesca
Firmat per Rogelio Llanes Ribas el
08/11/2020 13:23:44
Càrrec: Director General



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

