

**DEPARTAMENT DE FARMACOLOGIA**  
**DOCTORADO EN BIOMEDICINA Y FARMACIA**



**ESTIMULANTES Y ACTIVADORES DE LA GUANILATO CICLASA EN  
EL TRATAMIENTO DEL ASMA Y LA ENFERMEDAD PULMONAR  
OBSTRUCTIVA CRÓNICA**

**TESIS DOCTORAL**

**Presentada por:**

**MARÍA AMPARO BAYARRI CASTELLBLANCH**

**Dirigida por:**

**DR. D. JULIO CORTIJO GIMENO**

**VALÈNCIA, SEPTIEMBRE 2022**





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

**Certifica:**

Que la Tesis Doctoral presentada por Doña María Amparo Bayarri Castellblanch, con el título:

**“ESTIMULANTES Y ACTIVADORES DE LA GUANILATO CICLASA EN EL TRATAMIENTO DEL ASMA Y 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**



La presente Tesis Doctoral, realizada en la Universidad de Valencia, ha sido posible gracias a las siguientes ayudas:

- Ministerio Español de Economía, Industria y Competitividad: SAF2017–82913-R.
- Centro de Investigación en Red de Enfermedades Respiratorias: CIBERES apoyado por el Instituto Nacional de Salud Carlos III a través del Ministerio de Ciencia e Innovación y cofinanciado con fondos FEDER y FSE. (CIBERES; CB06/06/0027)
- Fondos de la Generalitat Valenciana: Prometeo 2017/023/UV



La presente Tesis Doctoral tampoco habría sido posible sin el apoyo y la ayuda que he recibido de una serie de personas a las que me gustaría mencionar y dar mis gracias más sinceras.

En primer lugar, me gustaría agradecer al Dr. Cortijo la oportunidad para formar parte de su grupo de investigación con una beca que me ha permitido crecer no sólo a nivel profesional, sino también a nivel personal. Gracias por todo el tiempo invertido.

También me gustaría agradecer a la Dra. Celia Sanz, que no sólo nos ha cuidado la piel, sino que siempre ha estado pendiente y preocupada por nosotras, dispuesta a ayudarnos y aconsejarnos siempre que se lo pedíamos.

Además, no puedo dejar tampoco de agradecer a todas las personas que han formado parte de mi día a día en el laboratorio: el 'Labteam'. Aunque hay momentos muy buenos, la realización de la tesis doctoral también lleva de la mano numerosos momentos de estrés, pero gracias al maravilloso grupo que hemos formado las penas cuando algún experimento no daba los resultados esperados eran menos penas. Aunque llegué la última al grupo, me recibieron con los brazos abiertos y en este tiempo se han convertido en personas imprescindibles en mi vida. GRACIAS.

Y por último y no menos importante a los pilares de mi vida: Víctor, Silvia y mis padres. Gracias y mil gracias. Os quiero con locura.

Gracias a Víctor porque desde que nos cogimos de la mano hace 5 años, no me la has soltado nunca. Gracias por quererme tanto. Me has apoyado siempre en todas las decisiones que he tomado en estos años y vinieran las dificultades que vinieran siempre estabas ahí para no dejarme caer. Fue una gran suerte que aparecieras en mi vida.

Gracias a Silvia, la persona más diferente a mí que el papá y la mamá podrían haber hecho, pero a la vez mi mejor amiga, la que más me ha entendido siempre. Gracias por soportarme y aguantarme, no solo en esta etapa si no desde que empecé biotecnología y me llamabas 'caralibro'. Gracias por ser mi mejor confidente y hacerme reír siempre.

Gracias, papá y mamá, porque sin vosotros no hubiera llegado hasta aquí. Gracias por ser mi mayor apoyo y mi hogar. Gracias papá por preocuparte tanto por mí, por llevarme siempre donde hiciera falta para que llegara a tiempo, por estar ahí para lo que necesitara y pidiese. Gracias mamá por todos los mimos, por entenderme siempre cuando estaba estresada y comprarme chocolate si lo necesitaba, por guiarme en muchos momentos y decisiones. Gracias por vuestra paciencia conmigo y por vuestra educación. Tengo la gran suerte de teneros como padres.



# ÍNDICE



<b>1</b>	<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>5</b>
<b>1.1</b>	<b>La ruta óxido nítrico – guanilato ciclasa soluble – guanosín 3',5'-monofosfato cíclico .....</b>	<b>3</b>
<b>1.1.1</b>	<b><i>Generación de óxido nítrico y las enzimas óxido nítrico sintasas.....</i></b>	<b>3</b>
<b>1.1.2</b>	<b><i>Guanilato ciclasa soluble –guanosín 3',5'-monofosfato cíclico .....</i></b>	<b>5</b>
<b>1.1.3</b>	<b><i>Fosfodiesterasa 5.....</i></b>	<b>7</b>
<b>1.2</b>	<b>Asma.....</b>	<b>8</b>
<b>1.2.1</b>	<b><i>Definición.....</i></b>	<b>8</b>
<b>1.2.2</b>	<b><i>Fisiopatología.....</i></b>	<b>9</b>
<b>1.2.3</b>	<b><i>Epidemiología .....</i></b>	<b>12</b>
<b>1.2.4</b>	<b><i>Diagnóstico .....</i></b>	<b>13</b>
<b>1.2.5</b>	<b><i>Clasificación del asma en función de su gravedad en adultos .....</i></b>	<b>14</b>
<b>1.2.6</b>	<b><i>Tratamiento .....</i></b>	<b>15</b>
	<b>1.2.6.1 FÁRMACOS BRONCODILATADORES.....</b>	<b>16</b>
	<b>1.2.6.2 FÁRMACOS ANTIINFLAMATORIOS .....</b>	<b>16</b>
<b>1.3</b>	<b>Enfermedad pulmonar obstructiva crónica .....</b>	<b>17</b>
<b>1.3.1</b>	<b><i>Definición.....</i></b>	<b>17</b>
<b>1.3.2</b>	<b><i>Fisiopatología.....</i></b>	<b>18</b>
<b>1.3.3</b>	<b><i>Epidemiología .....</i></b>	<b>20</b>
<b>1.3.4</b>	<b><i>Diagnóstico .....</i></b>	<b>21</b>
<b>1.3.5</b>	<b><i>Clasificación de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica en función de su gravedad.....</i></b>	<b>22</b>
<b>1.3.6</b>	<b><i>Tratamiento .....</i></b>	<b>23</b>
	<b>1.3.6.1 FÁRMACOS BRONCODILATADORES.....</b>	<b>24</b>
	<b>1.3.6.2 FÁRMACOS ANTIINFLAMATORIOS .....</b>	<b>24</b>
<b>1.4</b>	<b>Papel del guanosín 3',5'-monofosfato cíclico en el asma y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica .....</b>	<b>25</b>
<b>1.5</b>	<b>Modulación farmacológica del eje óxido nítrico – guanilato ciclasa soluble – guanosín 3',5'-monofosfato cíclico en el asma y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica .....</b>	<b>25</b>
<b>1.5.1</b>	<b><i>Fármacos dadores de óxido nítrico y fármacos inhibidores de la óxido nítrico sintasa inducible .....</i></b>	<b>26</b>
<b>1.5.2</b>	<b><i>Fármacos inhibidores de la fosfodiesterasa 5.....</i></b>	<b>27</b>
<b>1.5.3</b>	<b><i>Moduladores de la guanilato ciclasa soluble: estimuladores y activadores .....</i></b>	<b>27</b>
	<b>1.5.3.1 Estimuladores de la guanilato ciclasa soluble.....</b>	<b>27</b>
	<b>1.5.3.2 Activadores de la guanilato ciclasa soluble .....</b>	<b>29</b>
<b>2</b>	<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....</b>	<b>31</b>
<b>2.1</b>	<b>Hipótesis.....</b>	<b>33</b>

2.2	Objetivos .....	33
3	MATERIAL Y MÉTODOS.....	35
3.1	Material .....	37
3.1.1	<i>Fármacos</i> .....	37
3.1.2	<i>Estímulos</i> .....	37
3.1.3	<i>Reactivos utilizados</i> .....	38
3.1.4	<i>Pacientes</i> .....	43
3.2	Métodos .....	44
3.2.1	<i>Histología</i> .....	44
3.2.1.1	Fijación y deshidratación del tejido.....	44
3.2.1.2	Inmunohistoquímica .....	45
3.2.2	<i>Cultivo celular</i> .....	46
3.2.2.1	Aislamiento y cultivo primario de fibroblastos pulmonares humanos.....	46
3.2.2.2	Aislamiento y cultivo primario de células epiteliales de bronquio humanas .....	47
3.2.2.3	Aislamiento de neutrófilos humanos de sangre periférica .....	48
3.2.2.4	Cultivo de líneas celulares inmortalizadas.....	49
3.2.3	<i>Diseño experimental</i> .....	50
3.2.3.1	Preparación del extracto del humo del tabaco .....	50
3.2.3.2	Estimulación <i>in vitro</i> .....	51
3.2.4	<i>Silenciamiento génico mediante ARN interferente</i> .....	52
3.2.5	<i>Determinación del estado redox de la enzima guanilato ciclasa soluble</i> .....	53
3.2.6	<i>Ensayo ELISA para la cuantificación del guanosín 3',5'-monofosfato cíclico</i> .....	55
3.2.7	<i>Ensayo ELISA de IL-8, MMP-9, elastasa y TNF- <math>\alpha</math></i> .....	57
3.2.8	<i>Flow Chamber</i> .....	58
3.2.9	<i>Ensayo de proliferación</i> .....	60
3.2.10	<i>Medida de la producción intracelular de especies reactivas de oxígeno</i> .....	61
3.2.11	<i>Determinación de glutatión</i> .....	62
3.2.12	<i>Análisis de la expresión génica</i> .....	63
3.2.12.1	Extracción de ARN y cuantificación .....	63
3.2.12.2	Transcripción reversa.....	64
3.2.12.3	PCR a tiempo real.....	65
3.2.13	<i>Análisis de la expresión proteica mediante Western Blot</i> .....	70
3.2.14	<i>Análisis estadístico</i> .....	72
4	RESULTADOS.....	73
4.1	Estudios moleculares de la enzima guanilato ciclasa soluble .....	75
4.1.1	<i>Expresión de la guanilato ciclasa soluble en tejido pulmonar humano</i> .....	75
4.1.1.1	Pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica.....	75
4.1.1.2	Pacientes asmáticos.....	77
4.1.2	<i>Expresión de la enzima guanilato ciclasa soluble en fibroblastos pulmonares humanos y células epiteliales de bronquio humano</i> .....	79
4.1.2.1	Efecto de TGF- $\beta$ .....	79

4.1.2.2	Efecto del humo del tabaco.....	80
4.1.3	<i>Efecto del cinaciguat y el riociguat en presencia o ausencia del sildenafilo en los niveles de guanósín 3',5'-monofosfato cíclico.....</i>	<i>81</i>
4.1.3.1	En neutrófilos humanos .....	81
4.1.3.2	En fibroblastos pulmonares humanos .....	84
4.1.3.3	En células epiteliales de bronquio .....	86
4.1.4	<i>Influencia del estado redox de la enzima guanilato ciclasa soluble en la producción de guanósín 3',5'-monofosfato cíclico .....</i>	<i>88</i>
4.1.4.1	Efecto del tabaco en el estado de oxidación de la enzima .....	88
4.1.4.2	Producción de guanósín 3',5'-monofosfato cíclico por parte del cinaciguat y el riociguat en función del estado redox de la enzima .....	89
4.2	<b>Efecto de los fármacos moduladores de la guanilato ciclasa soluble sobre la inflamación .....</b>	<b>93</b>
4.2.1	<i>Efecto en la liberación de mediadores inflamatorios por parte de los neutrófilos.....</i>	<i>93</i>
4.2.1.1	Neutrófilos extraídos de voluntarios sanos y estimulados con LPS .....	93
4.2.1.2	Neutrófilos extraídos de voluntarios sanos y estimulados con extracto de humo de tabaco .....	96
4.2.1.3	Neutrófilos extraídos de pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica o asma y estimulados con LPS .....	99
4.2.2	<i>Efecto sobre la adhesión y la migración de las células inflamatorias.....</i>	<i>102</i>
4.3	<b>Efecto de los fármacos moduladores de la guanilato ciclasa soluble en el remodelado pulmonar.....</b>	<b>104</b>
4.3.1	<i>En fibroblastos pulmonares humanos.....</i>	<i>104</i>
4.3.1.1	Proliferación .....	104
4.3.1.2	Expresión de los marcadores de la transición fibroblasto mesenquimal .....	106
4.3.1.3	Fosforilación de ERK1/2 y SMAD3 .....	113
4.3.2	<i>En células epiteliales de bronquio humano .....</i>	<i>115</i>
4.3.2.1	Expresión de los marcadores de la transición epitelio mesenquimal.....	115
4.3.2.2	Fosforilación de ERK1/2 y SMAD3 .....	122
4.3.3	<i>Efecto del silenciamiento de la subunidad <math>\beta</math> de la enzima guanilato ciclasa soluble.....</i>	<i>124</i>
4.3.3.1	En la transición fibroblasto mesenquimal .....	124
4.3.3.2	En la transición epitelio mesenquimal .....	126
4.4	<b>Efecto de los fármacos moduladores de la guanilato ciclasa soluble sobre la producción de especies reactivas de oxígeno .....</b>	<b>128</b>
4.4.1	<i>En fibroblastos pulmonares humanos.....</i>	<i>128</i>
4.4.2	<i>En células epiteliales de bronquio.....</i>	<i>134</i>
5	<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>141</b>
6	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>151</b>
7	<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>155</b>

<b>ANEXOS .....</b>	<b>171</b>
<b>ANEXO 1. Aprobación del comité ético para el estudio con pacientes.....</b>	<b>173</b>

## **ABREVIATURAS**



$\alpha$ -SMA	Actina de músculo liso
ADNc	ADN complementario
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
AP-1	Proteína activadora 1
ARLT	Inhibidores de leucotrienos
ARNm	ARN mensajero
Asma T2	Asma Tipo 2
BCA	Ácido bicinconínico
BrdU	Bromodesoxiuridina
BSA	Albúmina de suero bovino
C/EBP	CAAT/proteína reforzadora de unión
CHGUV	Consorcio Hospital General Universitario de Valencia
CM-H <sub>2</sub> DCFDA	6-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
COL1	Colágeno tipo I
CREB	Proteína de unión al elemento de respuesta de al adenosín monofosfato cíclico
Ct	Ciclo umbral
CTGF	Factor de crecimiento del tejido conectivo
CVF	Capacidad vital forzada
DCF	2',7'-diclorofluoresceína
DEPC	dietilpirocarbonato
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGTA	Ácido etilenglicol tetraacético
EHT	Extracto de humo de tabaco
eNOS/NOS3	Óxido nítrico sintasa endotelial
EPOC	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
ERO	Especies reactivas de oxígeno
FCEV	Factor de crecimiento vascular endotelial
F <sub>E</sub> NO	Óxido nítrico en el aire exhalado
GCI	Glucocorticoides inhalados
GCp	Guanilato ciclasas particuladas
GCS	Guanilato ciclasa soluble
GesEPOC	Guía Española de la EPOC
GMPc	Guanosín 3,5-monofosfato cíclico
GOLD	'Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease'
GSH	Glutatión
GTP	Guanosín 5'-trifosfato
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno
HCl	Ácido clorhídrico

HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazino etanosulfónico
HIF	Factor inducible por hipoxia
IL	Interleucina
iNOS/NOS2	Óxido nítrico sintasa inducible
IRF-1	Factor regulador del interferón 1
LABA	Agonistas $\beta_2$ adrenérgicos de acción prolongada
Linfocitos Th2	Linfocitos T-helper 2
LPS	Lipopolisacárido
Medio DMEM	Medio 'Eagle Dulbecco's Modified'
Medio EBM-2	Medio 'Endothelial Cell Basal Medium-2'
Medio F-12K	Medio 'Ham's F-12K (Kaighn's Modification)'
Medio RPMI	Medio 'Roswell Park Memorial Institute'
MMPs	Metaloproteinasas
NAC	N-acetilcisteína
NaCl	Cloruro de Sodio
NaHCO <sub>3</sub>	Bicarbonato de sodio
NF- $\kappa$ B	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
NF-AT	Factor nuclear de células T activadas
NF-IL6	Factor nuclear para la expresión de IL-6
NH <sub>4</sub> Cl	Cloruro de amonio
nNOS/NOS1	Óxido nítrico sintasa neuronal
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintasa
NOX4	NADPH oxidasa 4
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Superóxido
Oct-1	Factor de transcripción-1 de unión a octámero
ODQ	1H-[1,2,4] Oxadiazolo [4,3-a] quinoxalin-1-one
OMS	Organización Mundial de la Salud
ONOO <sup>-</sup>	Peroxinitrito
PACO <sub>2</sub>	Presión del dióxido de carbono en sangre arterial
PaO <sub>2</sub>	Presión arterial de oxígeno
PARP1	Poli ADP-Ribosa polimerasa 1
PBS	Tampón salino fosfato
PDEs	Fosfodiesterasas
PEA3	Activador 3 potenciador del poliomavirus
PEF	Flujo espiratorio máximo
PKGs	Proteínas kinasas dependientes de GMPc
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PVDF	Difluoruro de polivinilideno
qPCR	PCR a tiempo real

RISC	Complejo proteico de silenciamiento-inducido por ARN
RT	Transcripción reversa
SABA	Agonistas $\beta_2$ adrenérgicos de acción corta
SD	Desviación estándar
SFB	Suero fetal bovino
siRNA	ARN de interferencia
Sp1	Proteína específica 1
SRF	Factor de respuesta al suero
STAT-1a	Transductor de señal y activador de la transcripción 1a
TBE	Elemento de unión a TATA
TCF	Factor de complejo ternario
TEM	Transición epitelio mesenquimal
TFM	Transición fibroblasto mesenquimal
TGF- $\beta$	Factor de crecimiento transformante $\beta$
Tm	Temperatura de 'melting'
TMB	Tetrametilbencidina
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral $\alpha$
TSLP	Linfopoyetina del estroma tímico
VEF1	Volumen espiratorio forzado en un segundo
YY1	Factor yin yang 1



## **ÍNDICE DE FIGURAS**



Figura 1. Esquema de la ruta del óxido nítrico (NO) en las vías aéreas. ....	5
Figura 2. Representación de la enzima guanilato ciclasa soluble (GCs). ....	6
Figura 3. Representación del dominio catalítico de la enzima fosfodiesterasa 5 (PDE5) unido al guanósín 3',5'-monofosfato cíclico (GMPc). ....	8
Figura 4. Vista esquemática de la inflamación eosinofílica de tipo T2 en la enfermedad de asma. ....	10
Figura 5. Esquema del algoritmo para el diagnóstico del asma propuesto por la Guía Española para el manejo del asma <sup>66</sup> . ....	13
Figura 6. Factores para la determinación del control de asma en el paciente. ....	15
Figura 7. Esquema de los escalones terapéuticos del tratamiento del asma en adultos. ....	16
Figura 8. Representación esquemática de la inflamación neutrofílica pulmonar característica de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). ....	20
Figura 9. Esquema del estado redox de la enzima guanilato ciclasa soluble (GCs) y de los fármacos que actúan sobre el eje: óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) – óxido nítrico (NO) – GCs – guanósín 3,5-monofosfato cíclico (GMPc). ....	26
Figura 10. Estructura química de los fármacos utilizados. ....	37
Figura 11. Aislamiento y cultivo primario de fibroblastos pulmonares humanos (FPH). ....	47
Figura 12. Aislamiento y cultivo primario de células epiteliales de bronquio humano (CEBH). ....	48
Figura 13. Separación de los elementos celulares sanguíneos por gradiente de densidad con Ficoll- Parque. ....	49
Figura 14. Morfología de las líneas celulares inmortalizadas. ....	50
Figura 15. Preparación del extracto de humo de tabaco (EHT) utilizado como estímulo en los experimentos <i>in vitro</i> . ....	51
Figura 16. Silenciamiento génico mediante ARN interferente (siRNA). ....	53
Figura 17. Mapa del plásmido pReceiver-M95. ....	54
Figura 18. Esquema del ensayo ELISA para la detección de guanósín 3,5-monofosfato cíclico (GMPc). ....	57
Figura 19. Esquema de la técnica ELISA para la cuantificación de IL-8, MMP-9, elastasa y TNF- $\alpha$ . ....	58
Figura 20. Componentes y montaje de la 'Flow Chamber'. ....	59
Figura 21. Sistema de perfusión y visualización del sistema 'Flow Chamber'. ....	60
Figura 22. Esquema del ensayo de proliferación basado en la incorporación de bromodesoxiuridina (BrdU). ....	61
Figura 23. Generación de 2',7'-diclorofluoresceína (DCF) (fluorescente) a partir del 6-chloromethyl- 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, acetyl ester (CM-H <sub>2</sub> DCFDA) (no fluorescente) en presencia de especies reactivas de oxígeno (ERO). ....	62
Figura 24. Reacción de conversión de un derivado de la luciferina a luciferina en presencia de glutatión (GSH) por la enzima GSH S-transferasa. ....	63
Figura 25. Funcionamiento de las sondas Taqman <sup>®</sup> . ....	66
Figura 26. Curva obtenida mediante PCR a tiempo real. ....	69
Figura 27. Esquema de la técnica de Western Blot para la detección y cuantificación de proteínas. ....	71
Figura 28. La expresión de las subunidades $\alpha_1$ y $\beta_1$ de la enzima guanilato ciclasa soluble (GCs) está disminuida en pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). ....	75
Figura 29. La disminución de la expresión génica y proteica de las subunidades $\alpha_1$ y $\beta_1$ de la guanilato ciclasa soluble (GCs) está relacionada con la gravedad de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). ....	76
Figura 30. La expresión de las subunidades $\alpha_1$ y $\beta_1$ de la guanilato ciclasa soluble (GCs) está disminuida en el tejido pulmonar de pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) respecto al grupo de voluntarios sanos. ....	77
Figura 31. La expresión de las subunidades $\alpha_1$ y $\beta_1$ de la enzima guanilato ciclasa soluble (GCs) está disminuida en pacientes asmáticos. ....	78
Figura 32. La expresión de las subunidades $\alpha_1$ y $\beta_1$ de la guanilato ciclasa soluble (GCs) está disminuida en el tejido pulmonar de pacientes asmáticos respecto al grupo de voluntarios sanos. ....	79

Figura 33. TGF- $\beta$ provoca una disminución de la expresión génica de la enzima guanilato ciclasa soluble (GCs) en fibroblastos pulmonares humanos (FPH) y células epiteliales de bronquio humano (CEBH).....	80
Figura 34. El EHT provoca una disminución de la expresión génica de la enzima guanilato ciclasa soluble (GCs) en fibroblastos pulmonares humanos (FPH) y células epiteliales de bronquio humano (CEBH). .....	81
Figura 35. Los niveles de guanosín 3,5-monofosfato cíclico (GMPc) aumentan al tratar los neutrófilos extraídos a partir de sangre de pacientes voluntarios sanos 1 hora o 24 horas con cinaciguat y riociguat en presencia o ausencia de sildenafil. ....	83
Figura 36. Los niveles de guanosín 3,5-monofosfato cíclico (GMPc) aumentan al tratar fibroblastos pulmonares humanos (FPH) con cinaciguat o riociguat en presencia o ausencia de sildenafil. .	85
Figura 37. Los niveles de guanosín 3,5-monofosfato cíclico (GMPc) aumentan al tratar células epiteliales bronquiales con cinaciguat o riociguat en presencia o ausencia de sildenafil. ....	87
Figura 38. El ODQ y el extracto de humo de tabaco (EHT) provocan la oxidación de la enzima guanilato ciclasa soluble (GCs).....	88
Figura 39. La oxidación de la enzima guanilato ciclasa soluble (GCs) provocada por el extracto de humo de tabaco (EHT) atenúa el efecto del riociguat en la estimulación de la GCs. Sin embargo, no afecta a la activación de la GCs producida por el cinaciguat.....	90
Figura 40. En presencia de sildenafil, el cinaciguat y el riociguat provocan un aumento del guanosín 3,5-monofosfato cíclico (GMPc) que se incrementa con el extracto de humo de tabaco (EHT). ..	92
Figura 41. Protocolo para los experimentos in vitro en neutrófilos extraídos a partir de sangre de voluntarios sanos, tratados con cinaciguat o riociguat, con o sin sildenafil, y estimulados con LPS. ....	93
Figura 42. Protocolo para los experimentos in vitro en neutrófilos extraídos a partir de sangre de voluntarios sanos, tratados con cinaciguat o riociguat, con o sin sildenafil, y estimulados con extracto de humo de tabaco (EHT). ....	96
Figura 43. Protocolo para los experimentos in vitro en neutrófilos extraídos a partir de sangre de pacientes EPOC o asmáticos, tratados con cinaciguat o riociguat, con o sin sildenafil, y estimulados con LPS. ....	99
Figura 44. Protocolo de la cuantificación de la adhesión de monocitos a una monocapa de células endoteliales (HMVEC-L) tratadas con cinaciguat o riociguat, con o sin sildenafil, y estimuladas con extracto de humo de tabaco (EHT). ....	103
Figura 45. El tratamiento de las células endoteliales HMVEC-L con cinaciguat o riociguat, tanto en presencia como en ausencia de sildenafil, revierte la adhesión celular provocada por el extracto del humo de tabaco (EHT).....	104
Figura 46. Protocolo para la medida de la proliferación de fibroblastos pulmonares humanos (FPH) tratados con cinaciguat o riociguat, con o sin sildenafil, y estimulados con TGF- $\beta$ . ....	105
Figura 47. El Cinaciguat y el riociguat en presencia de sildenafil inhiben la hiperproliferación de los fibroblastos pulmonares humanos (FPH). ....	106
Figura 48. El extracto de humo de tabaco (EHT) aumenta la expresión de los marcadores mesenquimales en fibroblastos pulmonares humanos (FPH) de manera dosis dependiente. ...	107
Figura 49. Protocolo para la medida de los marcadores de la transición fibroblasto mesenquimal (TFM) en fibroblastos pulmonares humanos (FPH) tratados con cinaciguat o riociguat, con o sin sildenafil, y estimulados con extracto de humo de tabaco (EHT). ....	107
Figura 50. Protocolo para la medida de los marcadores de la transición fibroblasto mesenquimal (TFM) en fibroblastos pulmonares humanos (FPH) tratados con cinaciguat o riociguat, con o sin sildenafil, y estimulados con TGF- $\beta$ .....	108
Figura 51. Cinaciguat y riociguat en presencia y ausencia de sildenafil disminuyen el incremento de la expresión génica de los marcadores de la transición fibroblasto mesénquima (TFM) provocado por el extracto de humo de tabaco (EHT) en fibroblastos pulmonares humanos (FPH). ....	109

Figura 52. Cinaciguat y riociguat en presencia y ausencia de sildenafil disminuyen el incremento de la expresión génica de los marcadores de la transición fibroblasto mesénquima (TFM) provocada por TGF- $\beta$ en fibroblastos pulmonares humanos (FPH). .....	110
Figura 53. Cinaciguat y riociguat en presencia y ausencia de sildenafil disminuyen el incremento de la expresión proteica de los marcadores de la transición fibroblasto mesénquima (TFM) provocada por TGF- $\beta$ en fibroblastos pulmonares humanos (FPH). .....	112
Figura 54. Protocolo para la medida de la fosforilación de ERK1/2 y SMAD3 en fibroblastos pulmonares humanos (FPH) tratados con cinaciguat o riociguat, con o sin sildenafil, y estimulados con TGF- $\beta$ . .....	113
Figura 55. Cinaciguat y riociguat en presencia y ausencia de sildenafil evitan la fosforilación de ERK1/2 y SMAD3 producida por TGF- $\beta$ en fibroblastos pulmonares humanos (FPH). .....	114
Figura 56. El extracto de humo de tabaco (EHT) aumenta la expresión de los marcadores mesenquimales en células epiteliales de bronquio humano (CEBH) de manera dosis dependiente. ....	115
Figura 57. Protocolo para la medida de los marcadores de la transición epitelio mesenquimal (TEM) en células epiteliales de bronquio humano (CEBH) tratadas con cinaciguat o riociguat, con o sin sildenafil, y estimuladas con extracto de humo de tabaco (EHT).. ....	116
Figura 58. Protocolo para la medida de los marcadores de la transición epitelio mesenquimal (TEM) en células epiteliales de bronquio humano (CEBH) tratadas con cinaciguat o riociguat, con o sin sildenafil, y estimuladas con TGF- $\beta$ . .....	116
Figura 59. Cinaciguat y riociguat en presencia y ausencia de sildenafil atenúan la transición epitelio mesenquimal (TEM) provocada por el extracto de humo de tabaco (EHT) en células epiteliales de bronquio humano (CEBH). ....	118
Figura 60. Cinaciguat y riociguat en presencia y ausencia de sildenafil atenúan la transición epitelio mesenquimal (TEM) provocada por TGF- $\beta$ en células epiteliales de bronquio humano (CEBH). ....	119
Figura 61. Cinaciguat y riociguat en presencia y ausencia de sildenafil atenúan la transición epitelio mesenquimal (TEM) provocada por TGF- $\beta$ en células epiteliales de bronquio humano (CEBH). ....	121
Figura 62. Protocolo para la medida de la fosforilación de ERK1/2 y SMAD3 en células epiteliales de bronquio humano (CEBH) tratadas con cinaciguat o riociguat, con o sin sildenafil, y estimuladas con TGF- $\beta$ . ....	122
Figura 63. Cinaciguat y riociguat en presencia y ausencia de sildenafil evitan la fosforilación de ERK1/2 y SMAD3 producida por TGF- $\beta$ en células epiteliales de bronquio humano (CEBH). ....	123
Figura 64. El efecto de los fármacos cinaciguat y riociguat en la transición fibroblasto mesenquimal (TFM) está mediado por la modulación de la enzima guanilato ciclasa soluble (GCs). .....	125
Figura 65. El efecto de los fármacos cinaciguat y riociguat en la transición epitelio mesenquimal (TEM) está mediado por la modulación de la enzima guanilato ciclasa soluble (GCs). .....	127
Figura 66. Protocolo para la medida de la expresión génica de la NADPH oxidasa 4 (NOX4) en fibroblastos pulmonares humanos (FPH) tratados con cinaciguat o riociguat, con o sin sildenafil, y estimulados con extracto de humo de tabaco (EHT). ....	128
Figura 67. Cinaciguat y riociguat en presencia y ausencia de sildenafil atenúan el incremento de la expresión génica de la NADPH oxidasa 4 (NOX4) provocado por el extracto de humo de tabaco (EHT) en fibroblastos pulmonares humanos (FPH). .....	129
Figura 68. Protocolo para la cuantificación de glutatión (GSH) en fibroblastos pulmonares humanos (FPH) tratados con cinaciguat o riociguat, con o sin sildenafil, y estimulados con extracto de humo de tabaco (EHT). ....	130
Figura 69. Cinaciguat y riociguat no revierten la disminución de glutatión (GSH) provocado por el extracto de humo de tabaco (EHT) en fibroblastos pulmonares humanos (FPH). ....	131
Figura 70. Protocolo para la medida de la liberación de especies reactivas de oxígeno (ERO) en fibroblastos pulmonares humanos (FPH) tratados con cinaciguat o riociguat, con o sin sildenafil, y estimulados con extracto de humo de tabaco (EHT). ....	132

Figura 71. Cinaciguat y riociguat atenúan la liberación de especies reactivas de oxígeno (ERO) provocada por el extracto de humo de tabaco (EHT) en fibroblastos pulmonares humanos (FPH). .....	133
Figura 72. Protocolo para la medida de la expresión génica de la NADPH oxidasa 4 (NOX4) en células epiteliales de bronquio humano (CEBH) tratadas con cinaciguat o riociguat, con o sin sildenafil, y estimuladas con extracto de humo de tabaco (EHT). ....	134
Figura 73. Cinaciguat y riociguat en presencia y ausencia de sildenafil atenúan el incremento de la expresión génica de la NADPH oxidasa 4 (NOX4) provocado por el extracto de humo de tabaco (EHT) en células epiteliales de bronquio humano (CEBH).....	135
Figura 74. Protocolo para la cuantificación de glutatión (GSH) en células epiteliales de bronquio humano (CEBH) tratadas con cinaciguat o riociguat, con o sin sildenafil, y estimuladas con extracto de humo de tabaco (EHT).....	136
Figura 75. Cinaciguat y riociguat atenúan la disminución de glutatión (GSH) provocado por el extracto de humo de tabaco (EHT) en células epiteliales de bronquio humano (CEBH). ....	137
Figura 76. Protocolo para la medida de la liberación de especies reactivas de oxígeno (ERO) en células epiteliales de bronquio humano (CEBH) tratadas con cinaciguat o riociguat, con o sin sildenafil, y estimuladas con extracto de humo de tabaco (EHT). ....	138
Figura 77. Cinaciguat y riociguat atenúan la liberación de especies reactivas de oxígeno (ERO) provocada por el extracto de humo de tabaco (EHT) en células epiteliales de bronquio humano (CEBH). ....	139
Figura 78. Interacción de las enzimas guanilato ciclasa soluble (GCs) y la NADPH Oxidasa 4 (NOX4) y su participación en la transición fibroblasto-miofibroblasto (TFM). ....	147

## **ÍNDICE DE TABLAS**



Tabla 1. Clasificación de la gravedad de la EPOC según los criterios GOLD. ....	23
Tabla 2. Marca comercial y referencia de los reactivos y kits utilizados en los ensayos. ....	43
Tabla 3. Datos clínicos de los voluntarios sanos, pacientes EPOC y pacientes asmáticos incluidos en el presente estudio.....	44
Tabla 4. Protocolo de deshidratación.....	45
Tabla 5. Protocolo de desparafinado e hidratación del ensayo inmunohistoquímico.....	45
Tabla 6. Anticuerpos utilizados en la inmunohistoquímica. ....	46
Tabla 7. Protocolo de deshidratación del ensayo inmunohistoquímico. ....	46
Tabla 8. Componentes de la reacción de retrotranscripción reversa. ....	64
Tabla 9. Componentes de la reacción de PCR a tiempo real con los reactivos Taqman®. ....	66
Tabla 10. Mezcla de cebadores y sonda utilizados para la detección de cada gen.....	67
Tabla 11. Componentes de la reacción de PCR a tiempo real con los reactivos de SYBR™. ....	68
Tabla 12. Secuencia de los cebadores utilizados para la detección de los genes de interés mediante PCR a tiempo real con los reactivos SYBR™. ....	69
Tabla 13. Anticuerpos utilizados en el ensayo de Western Blot. ....	72
Tabla 14. El tratamiento de los neutrófilos obtenidos a partir de sangre de voluntarios sanos con cinaciguat y riociguat en presencia o no de sildenafil no impide el incremento de la concentración de IL-8 producido por el LPS. ....	94
Tabla 15. El tratamiento de los neutrófilos obtenidos a partir de sangre de voluntarios sanos con cinaciguat y riociguat en presencia o no de sildenafil no impide el incremento de la concentración de MMP-9 producido por el LPS. ....	95
Tabla 16. El tratamiento de los neutrófilos obtenidos a partir de sangre de voluntarios sanos con cinaciguat y riociguat en presencia o no de sildenafil no impide el incremento de la concentración de TNF- $\alpha$ producido por el LPS. ....	95
Tabla 17. El tratamiento de los neutrófilos obtenidos a partir de sangre de voluntarios sanos con cinaciguat y riociguat en presencia o no de sildenafil no impide el incremento de la concentración de elastasa producido por el LPS. ....	96
Tabla 18. El tratamiento de los neutrófilos obtenidos a partir de sangre de voluntarios sanos con cinaciguat 10 $\mu$ M en presencia de sildenafil 1 $\mu$ M atenúa el incremento de la concentración de IL-8 producido por el EHT. Sin embargo, ninguna concentración de riociguat en presencia o ausencia de sildenafil consigue disminuir dicho incremento.....	97
Tabla 19. El tratamiento de los neutrófilos obtenidos a partir de sangre de voluntarios sanos con cinaciguat 10 $\mu$ M en presencia de sildenafil 1 $\mu$ M atenúa el incremento de la concentración de TNF- $\alpha$ producido por el EHT. Sin embargo, ninguna concentración de riociguat en presencia o ausencia de sildenafil consigue disminuir dicho incremento. ....	98
Tabla 20. El tratamiento de los neutrófilos obtenidos a partir de sangre de voluntarios sanos con cinaciguat y riociguat en presencia o no de sildenafil no impide el incremento de la concentración de MMP-9 producido por el EHT. ....	99
Tabla 21. El tratamiento de los neutrófilos obtenidos a partir de sangre de pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) con cinaciguat y riociguat en presencia o no de sildenafil no impide el incremento de la concentración de IL-8 producido por el LPS. ....	100
Tabla 22. El tratamiento de los neutrófilos obtenidos a partir de sangre de pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) con cinaciguat y Riociguat en presencia o no de sildenafil no impide el incremento de la concentración de MMP-9 producido por el LPS.....	101
Tabla 23. El tratamiento de los neutrófilos obtenidos a partir de sangre de pacientes asmáticos con cinaciguat y riociguat en presencia o no de sildenafil no impide el incremento de la concentración de IL-8 producido por el LPS. ....	102
Tabla 24. El tratamiento de los neutrófilos obtenidos a partir de sangre de pacientes asmáticos con cinaciguat y riociguat en presencia o no de sildenafil no impide el incremento de la concentración de MMP-9 producido por el LPS. ....	102



# **1 INTRODUCCIÓN**



## 1.1 La ruta óxido nítrico – guanilato ciclasa soluble – guanosín 3',5'-monofosfato cíclico

### 1.1.1 Generación de óxido nítrico y las enzimas óxido nítrico sintasas

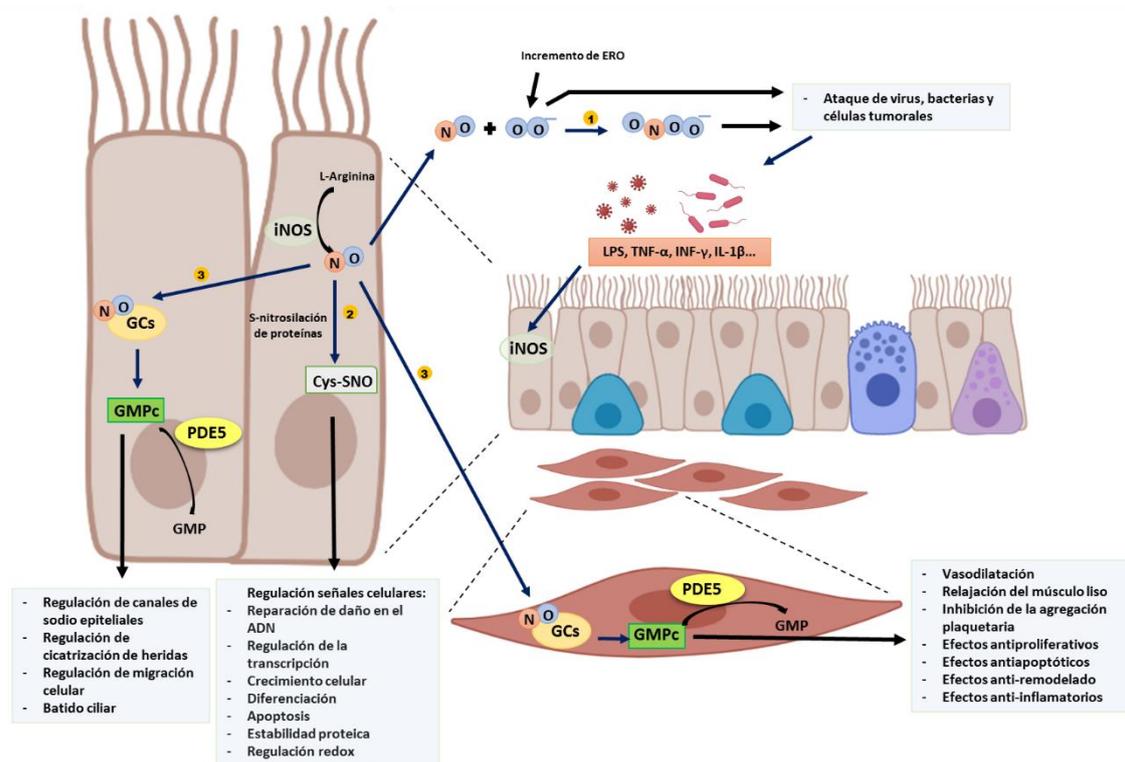
El óxido nítrico (NO) es un transmisor gaseoso involucrado en una gran cantidad de procesos fisiológicos de señalización y regulación, entre los que se incluye la vasodilatación, la relajación del músculo liso, la regulación de la neurotransmisión y diversos procesos inflamatorios como la inhibición de la agregación de plaquetas <sup>1-3</sup>.

A partir del aminoácido L-arginina, la familia de enzimas NO sintasas (NOS), producen NO y L-citrulina <sup>4</sup>. Se pueden diferenciar 3 isoformas de la NO sintasa, la NOS neuronal (nNOS o NOS1), la NOS inducible (iNOS o NOS2) y la NOS endotelial (eNOS o NOS3). La nNOS y la eNOS son consideradas NO sintasas constitutivas y su activación es dependiente de la concentración de calcio intracelular. Por otro lado, la iNOS se expresa principalmente en células epiteliales y macrófagos en respuesta a estímulos proinflamatorios y citoquinas y produce NO independientemente de la concentración de calcio <sup>1,4</sup>. Sin embargo, en algunas circunstancias, la expresión de la nNOS y la eNOS puede ser inducible y la expresión de la iNOS constitutiva. Específicamente, en el epitelio bronquial, hay una expresión constitutiva de la iNOS. Esto puede ser debido a que el NO es esencial para mantener la integridad de la barrera epitelial, evitar la entrada de patógenos y regular el batido ciliar, entre otras de sus funciones <sup>5</sup>. La expresión de la iNOS se regula principalmente a nivel transcripcional, aunque también hay mecanismos que actúan sobre la traducción de la iNOS o a nivel postraducciona l y regulan tanto su expresión como su función. El promotor del gen de la iNOS es muy complejo y se activa por el efecto aditivo de varios factores de transcripción como la proteína activadora (AP-1), la CAAT/proteína reforzadora de unión (C/EBP), la proteína de unión al elemento de respuesta de al adenosín monofosfato cíclico (CREB), el factor de unión a la secuencia de ADN 'GATA', el factor inducible por hipoxia (HIF), el factor regulador del interferón 1 (IRF-1), el factor nuclear de células T activadas (NF-AT), el factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF-kB), el factor nuclear para la expresión de IL-6 (NF-IL6), el factor de transcripción-1 de unión a octámero (Oct-1), la poli ADP-Ribosa polimerasa 1 (PARP1), el activador 3 potenciador del poliomavirus (PEA3), el factor p53, la proteína específica 1 (Sp1), el factor de respuesta al suero (SRF), el transductor de señal y activador de la transcripción 1a (STAT-1a), el elemento de unión a TATA (TBE), el factor de complejo ternario (TCF) y el factor yin yang 1 (YY1) <sup>6,7</sup>. En las células epiteliales, la combinación de varias citoquinas, principalmente la interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interferón  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) y el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), así como estímulos proinflamatorios como lipopolisacáridos (LPS) provocan la activación de factores de traducción involucrados en la inducción de la expresión génica de la iNOS <sup>7-10</sup>. Por otro lado, análogos de la L-arginina con el grupo guanidina sustituido o metilargininas como la dimetilarginina simétrica (ADMA), inhiben la síntesis de NO

compitiendo con la L-arginina por el sitio activo de las NO sintasas. Además, la ruta de la arginasa, puede limitar la disponibilidad de la L-arginina para la síntesis del NO por las NO sintasas <sup>11,12</sup>.

La expresión de iNOS tras los estímulos proinflamatorios, genera grandes cantidades de NO necesarios para atacar bacterias o células tumorales, ya que el NO reacciona con el superóxido ( $O_2^-$ ) generando peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), que junto con otras especies reactivas de oxígeno (ERO) daña múltiples orgánulos intracelulares y modifica proteínas y ácidos nucleicos involucradas en la replicación de células tumorales, virus y bacterias, participando en la defensa innata del organismo <sup>13</sup>.

Finalmente, el NO está involucrado en muchos procesos fisiológicos principalmente por dos tipos de rutas: las dependientes y las independientes del guanósín 3',5'-monofosfato cíclico (GMPc). Las acciones independientes del GMPc son frecuentemente mediadas por una modificación postraducciona de proteínas denominada S-nitrosilación, que consiste en la adición de un grupo NO a un tiol una cisteína de la proteína. Mediante esta modificación se regulan la conformación de proteínas, interacciones proteicas y otras regulaciones postraduccionales que activan o inhiben la función proteica <sup>14</sup>. Por otro lado, el NO está involucrado en muchos procesos fisiológicos a través de la generación de GMPc tras su unión a la enzima guanilato ciclasa soluble <sup>15</sup> (**Figura 1**). El NO una vez es sintetizado, difunde hasta las células diana donde se une al grupo hemo del sitio activo de la GCs con afinidad picomolar, aumentando entre 100-200 veces la actividad catalítica de la enzima y por tanto, la formación de GMPc <sup>16,17</sup>.



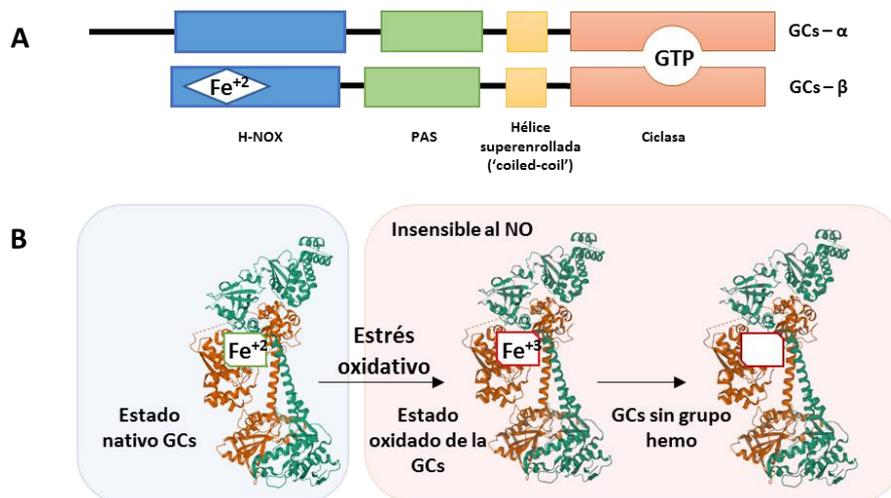
**Figura 1. Esquema de la ruta del óxido nítrico (NO) en las vías aéreas.** Estímulos proinflamatorios y ciertas citocinas inducen la expresión de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) en las células epiteliales que producen un incremento del NO. 1) El NO reacciona con el superóxido ( $O_2^-$ ) y genera peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) que junto con otras especies reactivas de oxígeno (ERO) daña células tumorales y orgánulos intracelulares de patógenos. 2) El NO está involucrado en varias rutas de señalización celular mediante la S-nitrosilación de proteínas. 3) El NO se une a la enzima guanilato ciclasa soluble (GCs) de las células epiteliales o de otras células diana como las células musculares, las células endoteliales o los fibroblastos entre otras y produce guanosín 3',5'-monofosfato cíclico (GMPc). La fosfodiesterasa 5 (PDE5) degrada el GMPc a GMP. Imagen creada con Biorender.

### 1.1.2 Guanilato ciclasa soluble –guanosín 3',5'-monofosfato cíclico

Las guanilato ciclasas son enzimas que catalizan la conversión del guanosín 5'-trifosfato (GTP) en GMPc, un segundo mensajero que participa en diversos procesos de señalización<sup>18</sup>. Existen dos tipos de enzimas guanilato ciclasa, las enzimas guanilato ciclasas particuladas (GCp), asociadas a la membrana plasmática, que reconocen diferentes péptidos natriuréticos transmembrana y las enzimas guanilato ciclasa solubles (GCs), que se encuentran en el citoplasma y son receptores de ligandos gaseosos, principalmente del óxido nítrico<sup>19</sup>. Las enzimas GCs son dímeros de proteínas de formados principalmente por una subunidad  $\alpha$  (82 Kda) y una subunidad  $\beta$  (70 Kda)<sup>19</sup>. En las células humanas, existen 2 formas de la subunidad  $\alpha$  ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ) y dos formas de la subunidad  $\beta$  ( $\beta_1$  y  $\beta_2$ ), siendo las formas activas y mejor caracterizadas los heterodímeros  $\alpha_1/\beta_1$  y  $\alpha_2/\beta_1$ <sup>20</sup>. Ambos heterodímeros están presentes en el cerebro en proporciones similares, sin embargo, el heterodímero  $\alpha_1/\beta_1$  es el predominante en el resto de los tejidos, siendo el más abundante de los pulmones<sup>21</sup>. Se ha visto que las subunidades  $\alpha_1$  y  $\beta_1$  se encuentran principalmente en las células epiteliales de bronquio y alveolares y en las células de músculo liso de las vías aéreas<sup>22</sup>.

## INTRODUCCIÓN

Tanto el polipéptido de la unidad  $\alpha$  como el de la  $\beta$ , tienen 4 dominios, un dominio N-terminal NO sensor (H-NOX), un dominio PAS, un dominio de hélice superenrollada (denominado 'coiled-coil') y un dominio catalítico C-terminal. Los dominios catalíticos del extremo C-terminal de ambas subunidades son necesarios para la unión y conversión del GTP en GMPc <sup>18</sup>. En el dominio N-terminal de la subunidad  $\beta$ , unido a la histidina 105, se encuentra el grupo hemo, formado por una protoporfirina IX a la que está unida un ion ferroso en su forma redox reducida ( $\text{Fe}^{+2}$ ) (**Figura 2**) <sup>16,23</sup>. La unión del NO al grupo hemo en su forma reducida ( $\text{Fe}^{+2}$ ) provoca un cambio conformacional en las estructuras de las subunidades de la enzima, de manera que queda activado su efecto catalítico <sup>24</sup>. Si el grupo hemo está oxidado ( $\text{Fe}^{+3}$ ), la enzima GCs es insensible al NO. En estas condiciones, el grupo hemo pierde afinidad por la enzima y se libera, provocando la ubiquitinización y degradación proteolítica de la proteína <sup>18</sup>. En algunas enfermedades pulmonares, como la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y el asma, donde existe un estrés oxidativo, hay una pérdida del grupo hemo de la GCs tras su oxidación, lo que conlleva una reducción del GMPc <sup>25</sup>.



**Figura 2. Representación de la enzima guanilato ciclasa soluble (GCs).** A) Representación esquemática de los dominios de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de la GCs. B) Estructura del estado nativo de la GCs en su forma inactiva, es decir, sin unión con el óxido nítrico, y en su forma oxidada tras sufrir estrés oxidativo. La subunidad  $\alpha_1$  se representa en verde y la subunidad  $\beta_1$  (que contiene el grupo hemo) se representa en marrón. La imagen de la GCs se ha creado con Mol\*, RCSB PDB: 6JTO <sup>24,26</sup>.

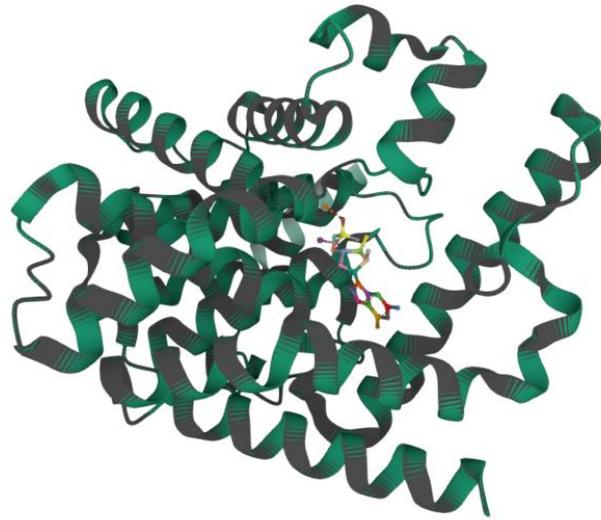
El aumento de los niveles intracelulares de GMPc regula diversos procesos fisiológicos, principalmente, tras activar proteínas quinasas dependientes de GMPc (PKGs), fosfodiesterasas (PDEs) y los canales iónicos dependientes de GMPc. Estas rutas generalmente provocan relajación muscular, dilatación de los bronquios y de los vasos sanguíneos, efectos en las rutas de señalización de diferenciación y proliferación celular, efectos antiinflamatorios e inhibición de la agregación de plaquetas <sup>18,27</sup>. Además, el GMPc en las células epiteliales está involucrado en la regulación de los canales

epiteliales de sodio, cicatrización de heridas, migración y batido ciliar, entre otras funciones <sup>28-31</sup>.

### 1.1.3 Fosfodiesterasa 5

Los niveles intracelulares de GMPc se regulan por la actuación de las fosfodiesterasas, que lo degradan rápidamente a GMP. Existen 11 familias de fosfodiesterasas caracterizadas (PDE1 – PDE11) que degradan de manera específica el GMPc, el adenosín monofosfato cíclico (AMPc), o los dos <sup>32</sup>. Además, se diferencian por sus propiedades cinéticas, su localización en los diferentes tejidos y en el interior de las células y su sensibilidad a determinados fármacos <sup>33</sup>. Las fosfodiesterasas PDE4, PDE7 y PDE8 son muy selectivas por el AMPc, en cambio, las fosfodiesterasas PDE5, PDE6 y PDE9 son muy selectivas por el GMPc. El resto (PDE1, PDE2, PDE3, PDE10 y PDE11) degradan ambos <sup>32</sup>.

La PDE5 regula el balance de GMPc en diversos tejidos: el músculo liso aórtico, el corazón, la placenta, el músculo esquelético, el páncreas, el cerebro, el hígado, pero, sobre todo en el cuerpo cavernoso y la retina. Concretamente en el pulmón, la PDE5 es la PDE específica de GMPc que más se expresa <sup>34</sup>. La PDE5 tiene un peso molecular de 93 kDa y se encuentra principalmente en el citoplasma celular. La enzima es un homodímero constituido por 833 aminoácidos y contiene dos dominios regulatorios GAF, denominados GAFA y GAFB que constituyen la región alostérica de unión al GMPc (**Figura 3**). Esta también contiene un sitio de fosforilación en la posición Ser92, clave para el mecanismo de acción de cada dominio regulatorio y un segmento C-terminal de la proteína, al que se une el cofactor  $Zn_2^+$  y probablemente el  $Mg_2^+$  necesarios para la actividad ciclasa de la enzima <sup>35</sup>. Por otro lado, la fosforilación de la enzima por PKC o PKA en los residuos Ser102 o Ser104 también parece jugar un papel muy importante en la conformación y activación de la proteína. <sup>36</sup>. La proteína PDE5 es codificada por el gen *pde5* (o *pde5a*), formado por 24 exones. Dependiendo del *splicing* alternativo del ARNm, se generan diferentes isoformas de la proteína (PDE5A1, PDE5A2 y PDE5A3) que difieren en la fracción N-terminal, lo que determina la localización subcelular <sup>37</sup>.



**Figura 3. Representación del dominio catalítico de la enzima fosfodiesterasa 5 (PDE5) unido al guanosín 3',5'-monofosfato cíclico (GMPc).** La imagen se ha creado con Mol\*, RCSB PDB: 1T9S <sup>26,38</sup>.

Inhibidores de la PDE5 se han utilizado para el tratamiento de diversas enfermedades, por ejemplo, el fármaco sildenafil está aprobado para el tratamiento de la disfunción eréctil o la hipertensión arterial, ya que induce la relajación del músculo liso. Además, existe una gran investigación sobre el uso de inhibidores de PDE5 en otras patologías <sup>18</sup>, como por ejemplo, en fibrosis quística, enfermedad en la que podrían corregir anomalías en el transporte trans-epitelial de iones <sup>39</sup>.

## 1.2 Asma

### 1.2.1 Definición

El asma tiene un espectro clínico muy heterogéneo, pero se caracteriza por ser una enfermedad inflamatoria crónica de las vías aéreas en la que participan diversas células y mediadores de la inflamación <sup>40,41</sup>. Los pacientes con ASMA tienen ataques recurrentes de disnea y sibilancias, que varían en severidad y frecuencia de una persona a otra. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), los síntomas pueden sobrevenir varias veces al día o a la semana, y en algunas personas se agravan durante la actividad física o por la noche. Estos síntomas se deben a que en pacientes con asma se produce una hiperrespuesta bronquial y una obstrucción variable del flujo aéreo provocadas por el estrechamiento de las vías respiratorias, generado en gran medida por la contracción del músculo liso de las mismas y que es generalmente reversible. Sin embargo, con frecuencia hay cambios estructurales característicos, conocidos como remodelación de las vías respiratorias, que conllevan una pérdida progresiva de la función pulmonar, a consecuencia del aumento del volumen del músculo liso de las vías respiratorias y la fibrosis que pueden provocar un estrechamiento irreversible <sup>40,42</sup>. La OMS establece que las causas fundamentales son una combinación genética y

desencadenantes externos como alergias, humo de tabaco, contaminación, irritantes químicos, etc.

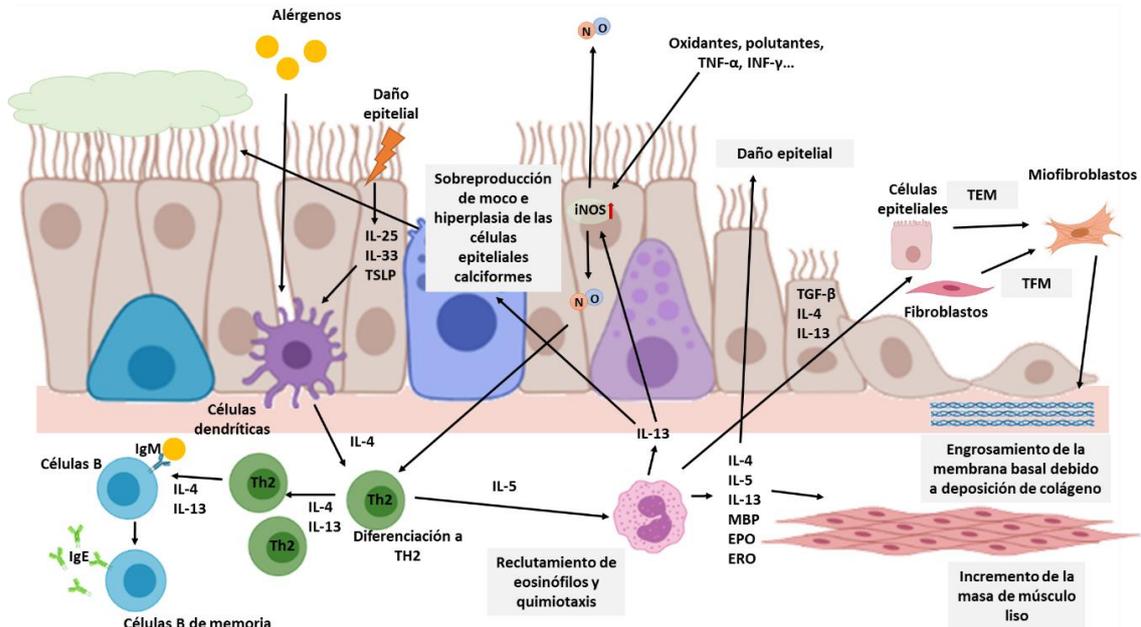
### **1.2.2 Fisiopatología**

El asma tiene un espectro clínico muy heterogéneo, pero se caracteriza por ser una enfermedad inflamatoria crónica de las vías aéreas en la que participan diversas celulares y mediadores de la inflamación. Generalmente, el asma es considerado alérgico, sin embargo, este endotipo es prevalente únicamente en un 40-60% de los pacientes adultos <sup>43</sup>. Los pacientes que tienen asma de tipo alérgico son atópicos y tienen un patrón de inflamación alérgica. Este tipo de asma se denomina en muchas ocasiones asma Tipo 2 (T2), porque está orquestado por los linfocitos T-helper 2 (Th2) que secretan una serie de interleuquinas como IL-4, -5, -9, y -13, que provocan la activación y reclutamiento de eosinófilos, así como la generación de IgE por linfocitos B <sup>40,41</sup>. La IgE es reconocida por los receptores FcεRI en los mastocitos y basófilos. Los mastocitos liberan múltiples mediadores inflamatorios como la histamina, leucotrienos y prostaglandinas así como factores de crecimiento y neurotrofinas, importantes en la respuesta tardía a los alérgenos y que contribuyen a los síntomas característicos del asma como la hipersecreción mucosa y alteraciones del músculo liso bronquial <sup>41,44</sup>. Otros pacientes, sin embargo, no tienen este patrón de inflamación, lo que sería denominado un asma no-T2 o atópico, que está asociado a una enfermedad más severa <sup>40,41</sup>.

La inflamación crónica que se da en los pacientes con asma produce la hiperrespuesta bronquial y la obstrucción variable del flujo aéreo característica del asma. Aunque es generalmente reversible, con frecuencia hay cambios estructurales característicos, conocidos como remodelación de las vías respiratorias, que conllevan una pérdida progresiva de la función pulmonar <sup>40,42</sup>. Estos cambios estructurales de las vías aéreas están provocados por las múltiples citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento liberados por las células inflamatorias y estructurales de las vías aéreas que crean un ambiente de señalización complejo que favorece este remodelado. Se han identificado múltiples mediadores inflamatorios relacionados con el remodelado: citocinas profibróticas como el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) e IL-11, citoquinas producidas por los linfocitos Th2, como IL-4, IL-9, IL-13 y IL-5, quimiocinas producidas por el epitelio como la IL-8, proteína inflamatoria de macrófagos 1a y la eotaxina, y metaloproteinasas <sup>45</sup>. Dentro de las células inflamatorias clave para el remodelado de las vías aéreas se encuentran los eosinófilos. Los eosinófilos son la fuente principal de TGF- $\beta$ , clave en el remodelado <sup>46</sup>. Además, los eosinófilos liberan proteínas básicas granulares, eicosanoides, cisteinil-leucotrienos, ERO que dañan los tejidos de las vías aéreas, así como diversas citocinas y quimiocinas que contribuyen al ambiente proinflamatorio <sup>47</sup> (**Figura 4**).

## INTRODUCCIÓN

El remodelado de las vías aéreas en asma incluye muchas características patofisiológicas que incluyen cambios epiteliales, incremento de la masa de músculo liso, incremento de fibroblastos/miofibroblastos activados, fibrosis subepitelial y cambios vasculares principalmente alrededor de las vías aéreas <sup>48</sup> (Figura 4).



**Figura 4. Vista esquemática de la inflamación eosinofílica de tipo T2 en la enfermedad de asma.** Los alérgenos o el daño epitelial activan las células dendríticas que secretan citocinas, como la IL-4, involucrada en la diferenciación de las células Th2. Los linfocitos Th2 secretan IL-4 e IL-13 que amplifican la proliferación de los linfocitos Th2 y estimulan la generación de IgE por las células B. Las células Th2 también secretan IL-5, clave para el reclutamiento de los eosinófilos. Los eosinófilos secretan IL-13 que activa la expresión de la iNOS, con lo que se aumenta el nivel de óxido nítrico (NO) y por tanto el F<sub>e</sub>NO. El NO a su vez, está involucrado en la diferenciación de los linfocitos Th2. Además, la expresión de la iNOS en las células epiteliales puede estar incrementada por oxidantes, polutantes y otros estímulos proinflamatorios como TNF-α o INF-γ. La inflamación eosinofílica crónica está involucrada en remodelado de las vías aéreas y la obstrucción bronquial causadas por un incremento de la masa de músculo liso, hiperplasia de las células calciformes, sobreproducción de moco, daño epitelial y engrosamiento de la membrana basal generada por la deposición de proteínas de la matriz como el colágeno de tipo I por parte de los miofibroblastos. Los fibroblastos mediante la transición fibroblasto-miofibroblasto (TFM) y las células epiteliales mediante la transición epitelio mesenquimal (TEM) son la fuente principal de los miofibroblastos en la patología del asma. Imagen creada con Biorender.

Uno de los principales causantes del remodelado en pacientes con asma es el incremento de la masa de las células de músculo liso debido a su proliferación (hiperplasia) y su incremento de tamaño (hipertrofia) <sup>48</sup>. Debido a que hay una mayor cantidad de músculo por la hipertrofia de las células, y a que su función está alterada, las vías aéreas asmáticas se contraen (broncoespasmo) más vigorosamente que las vías respiratorias sanas. Además, la musculatura lisa bronquial en asmáticos no sólo se contrae con mayor fuerza, sino que cuando está contraída es más difícil de relajar que el músculo liso de las vías respiratorias normales <sup>49</sup>.

Además, en los pacientes asmáticos se produce una alteración del que incluye pérdida de células ciliadas, hiperplasia de las células calciformes, y daños en la barrera epitelial con la pérdida de las uniones estrechas, así como sobrerregulación de factores de crecimiento, quimiocinas y citocinas <sup>50</sup>. La hiperplasia de las células calciformes provoca una hipersecreción de moco que contribuye a la obstrucción de las vías aéreas. Además de esta hipersecreción de moco, en pacientes con asma hay una sobreexpresión de MUC5AC y MUC5B, lo que hace que el moco sea más viscoso y difícil de eliminar <sup>51,52</sup>.

Por otro lado, se produce un engrosamiento de la membrana basal producida por un incremento en la deposición de colágeno de tipo I (COL1) debido a la activación de las células T y los miofibroblastos <sup>53</sup>. Una gran parte de los miofibroblastos proviene de la proliferación y diferenciación de los fibroblastos pulmonares, en presencia de diversos factores de crecimiento, entre los que destaca TGF- $\beta$ . Este proceso se conoce como transición fibroblasto-mesenquimal (TFM) <sup>54</sup>. En este proceso, aumenta la expresión de COL1 y fibronectina, componentes de la matriz extracelular, pero también de marcadores de miofibroblastos como la alfa actinina ( $\alpha$ -SMA) y otros factores de crecimiento como el factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF) <sup>54,55</sup>. Por otro lado, TGF- $\beta$ , entre otros factores de crecimiento, también activa las células epiteliales que cambian su fenotipo a células mesenquimales, en un proceso conocido como transición epitelio mesenquimal (TEM) <sup>56</sup>. En este proceso las células epiteliales pierden la adhesión célula-célula y la polaridad celular, por lo que se observa un descenso de marcadores epiteliales como E-cadherina y ocludina. Además, igual que en el caso de la TFM, se observa un aumento de la expresión de proteínas de la matriz extracelular y de marcadores de células mesenquimales, como  $\alpha$ -SMA <sup>56-58</sup>.

Finalmente, hay un incremento del número y el tamaño de los microvasos sanguíneos en las áreas remodeladas, debido a una desregulación del balance entre el factor de crecimiento vascular endotelial (FCEV) y la angiopoyetina-1. Además, el FCEV incrementa la permeabilidad de estos vasos sanguíneos, resultando en dilatación de los vasos y edema, lo que ayuda al estrechamiento de las vías aéreas. Por otro lado, estos vasos son fuente de células inflamatorias, mediadores de la inflamación y citocinas <sup>59</sup>.

Otra característica del asma es la aparición de las exacerbaciones asmáticas. Debido a que los pacientes con asma tienen las vías respiratorias irritables, fenómenos comunes como las infecciones víricas de las vías aéreas, alérgenos, realizar ejercicio, cambios meteorológicos, humo, polvo, etc. producen una hiperrespuesta bronquial que conduce a un rápido estrechamiento de la vía respiratoria, cuya intensidad se relaciona con la inflamación subyacente. Así pues, la sensibilidad a fenómenos ambientales y el grado de inflamación hacen que los síntomas y la función pulmonar fluctúen en el tiempo <sup>60</sup>.

En pacientes con asma, especialmente los pacientes con asma T2 con inflamación eosinofílica de las vías aéreas, los niveles de NO en el aire exhalado ( $F_{E}NO$ ) son más elevados en comparación con los niveles de sujetos sanos. Este incremento del NO exhalado en pacientes con asma está generado principalmente por un incremento en la enzima iNOS a causa de los estímulos proinflamatorios: citocinas, oxidantes y otros mediadores de la inflamación. En la inducción de la expresión de la iNOS, los eosinófilos también juegan un papel clave, pues secretan IL-13 que incrementa la expresión de la iNOS en las células epiteliales y por tanto aumentan los niveles de NO y el  $F_{E}NO$ . Se ha observado en pacientes asmáticos no tratados con esteroides que este incremento de la expresión de la proteína iNOS se produce principalmente en las células epiteliales bronquiales y en los macrófagos de la región alveolar <sup>61,62</sup>. Además, una mayor producción en las vías aéreas de NO está correlacionado con una mayor obstrucción de las vías aéreas en asma <sup>63</sup> (**Figura 4**).

### **1.2.3 Epidemiología**

El asma es un problema de salud con una elevada prevalencia, afecta a la esperanza y calidad de vida de las personas y genera, además del impacto sanitario y social, un gasto económico importante. Aunque existan diferencias entre las diferentes zonas geográficas, el asma afecta a más del 10% de los niños, siendo la enfermedad crónica más frecuente entre los mismos, y entre el 4-7% de los adultos <sup>64</sup>. Según la OMS, en 2019 había aproximadamente 262 millones de personas afectadas por el asma en el mundo y esta enfermedad causó 461.000 muertes. Las tasas de mortalidad en por asma en España, son ligeramente superiores a las de los países de nuestro entorno y aunque la mortalidad ha disminuido en varones un 67%, se ha incrementado un 32% en las mujeres. En 2015 fallecieron en España con diagnóstico de asma como causa principal 1.134 personas (195 varones y 939 mujeres). La mortalidad por asma en España ocurre principalmente en mayores de 65 y sobre todo de 80 años. En los grupos de 5-35 años la mortalidad está entre las más bajas de Europa <sup>64</sup>.

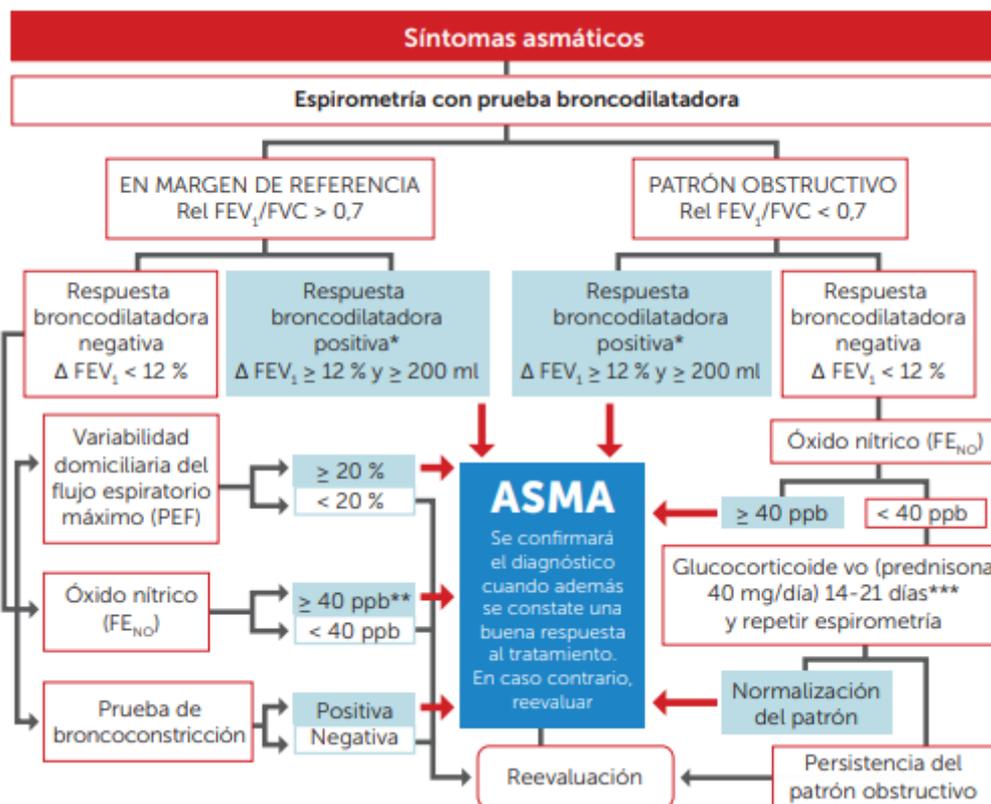
En el estudio AsmaCost de 2009 se determinó que el coste anual del asma en España se situaba en los 1480 millones de euros si se considera únicamente el diagnóstico sintomático asociado a la hiperreactividad bronquial. El coste medio para la sociedad por paciente y año se estimó en 1726 euros. La causa principal del elevado coste la constituyeron los ingresos hospitalarios y el mal control de la enfermedad ya que el asma a menudo no se diagnostica correctamente ni recibe el tratamiento adecuado <sup>65</sup>. Esto genera también una importante carga para los pacientes y sus familias, ya que, en numerosas ocasiones la actividad del paciente está limitada durante toda su vida.

### 1.2.4 Diagnóstico

Los pacientes con asma tienen ataques recurrentes de disnea y sibilancias, tos y opresión torácica, que varían en severidad y frecuencia de una persona a otra. Estos síntomas son los síntomas guía y cuando se presentan se debe considerar el diagnóstico de asma. Los síntomas pueden sobrevenir varias veces al día o a la semana, y en algunas personas se agravan durante la actividad física o por la noche (OMS).

Como estos síntomas son comunes a otras patologías como la EPOC, se deben realizar pruebas diagnósticas objetivas para determinar si se padece asma u otra enfermedad. Estas pruebas generalmente son pruebas funcionales respiratorias.

Para medir la función pulmonar, la prueba diagnóstica de primera elección es la espirometría con prueba broncodilatadora, tal como recoge la Guía Española para el manejo del asma <sup>66</sup>. El esquema del proceso diagnóstico se muestra en la **Figura 5**.



**Figura 5. Esquema del algoritmo para el diagnóstico del asma propuesto por la Guía Española para el manejo del asma <sup>66</sup>.** \*En niños un incremento del 12% es suficiente para considerarla positiva, aunque éste sea < de 200 ml. \*\*En los casos en los que la prueba de broncoconstricción sea negativa debe considerarse el diagnóstico de bronquitis eosinofílica. \*\*\*Como alternativa pueden utilizarse glucocorticoides inhalados a dosis muy altas, 1.500 - 2.000 µg de fluticasona, en 3 o 4 tomas diarias, durante 2-8 semanas.

Los principales parámetros que se deben determinar son el volumen espiratorio forzado en el primer segundo (VEF<sub>1</sub>), así como la capacidad vital forzada (CVF). Se considera que

hay obstrucción cuando el cociente entre estos dos parámetros ( $VEF_1/CVF$ ), es inferior al valor de referencia, que se considera de manera arbitraria en 0,7, aunque este valor puede provocar en ocasiones una sobreestimación de obstrucción pulmonar en personas de avanzada edad y se recomienda usar los valores de referencia internacionales adecuados a la edad del paciente <sup>67</sup>.

Posteriormente, se mide la respuesta broncodilatadora, para ello se debe administrar al paciente 4 inhalaciones sucesivas de 100 µg de salbutamol (o algún equivalente). Para ello se debe utilizar un inhalador presurizado con cámara espaciadora y repetir la espirometría a los 15 minutos. Tal y como se refleja en la **Figura 5** se considera respuesta broncodilatadora positiva a un aumento del  $VEF_1 \geq 12\%$  y  $\geq 200$  ml respecto al valor basal <sup>66,67</sup>. Además, la variabilidad o fluctuación excesiva de la función pulmonar a lo largo del tiempo también es clave en el diagnóstico y control del asma. Para medir la variabilidad diaria el índice más recomendable es la amplitud del flujo espiratorio máximo (PEF) (registrado previamente a la medicación), con respecto a la media diaria promediada durante al menos 1 o 2 semanas. Una variabilidad del PEF mayor al 20% da como resultado el diagnóstico del asma <sup>68</sup>.

Por otro lado, en pacientes con sospecha clínica del asma pero que presentan una función pulmonar normal, se puede analizar la respuesta excesiva a un broncoconstrictor mediante la prueba de provocación bronquial inespecífica y así determinar si existe una hiperrespuesta bronquial en el paciente <sup>66</sup>.

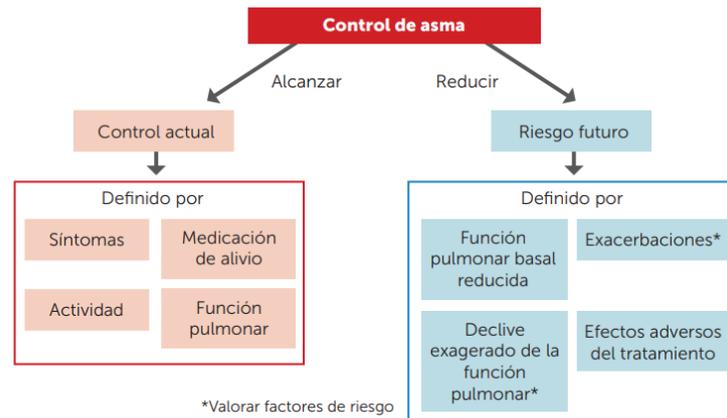
Finalmente, como los niveles de  $F_{E}NO$  se encuentran aumentados en pacientes con asma (sobre todo del tipo T2), se puede realizar la medición del  $F_{E}NO$ . Se ha establecido que, en pacientes con asma no medicados con glucocorticoides, un valor mayor a 40 ppb da como resultado el diagnóstico del asma <sup>69</sup>. Sin embargo, un valor inferior a 40 ppb no excluye el diagnóstico (sobre todo si es asma de tipo atópico) <sup>66</sup>.

### **1.2.5 Clasificación del asma en función de su gravedad en adultos**

Según la gravedad de la enfermedad en adultos, el asma se clasifica en las siguientes 4 categorías: asma intermitente, asma persistente leve, asma persistente moderado y asma persistente severo <sup>66</sup>. Para definir la gravedad del asma hay que tener en cuenta no solo la intensidad del proceso, sino también la respuesta del paciente al tratamiento. Por este motivo, la gravedad del asma en adultos se evalúa cuando el paciente está siendo ya tratado y se clasifica en función de la necesidad de tratamiento para el control de los síntomas y las exacerbaciones <sup>70</sup>. Además, la gravedad de la enfermedad, se debe reevaluar de manera periódica, ya que puede variar a lo largo del tiempo <sup>66</sup>.

La clasificación del asma en función de su gravedad determinará las pautas del tratamiento farmacológico que debe seguir el paciente para mantener el control de los

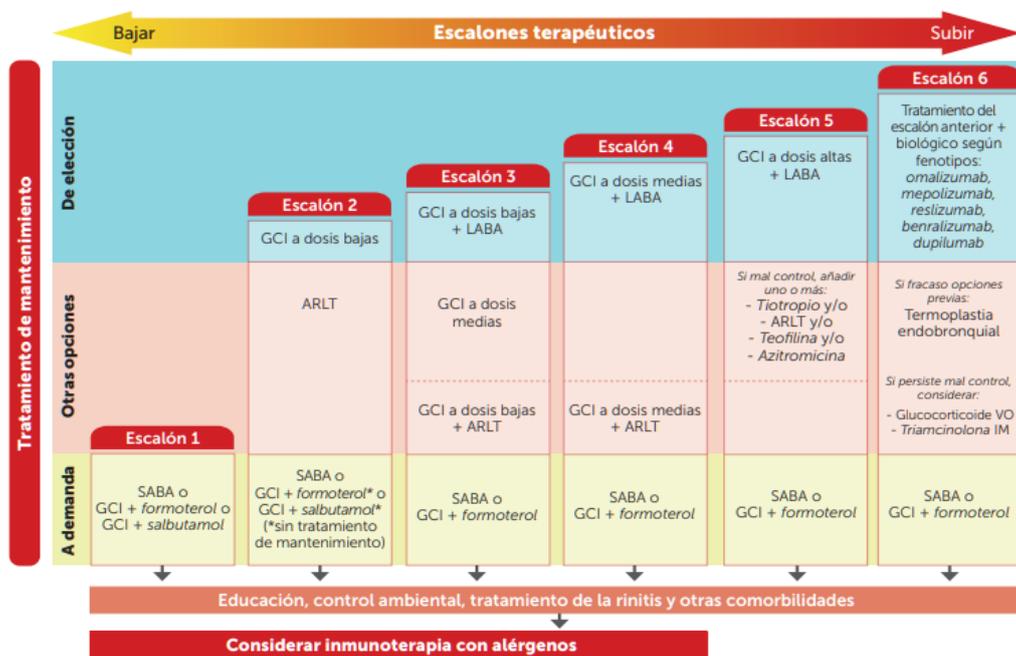
síntomas. Este control del asma se define como el grado en el que las manifestaciones del asma permanecen ausentes o están reducidas al máximo <sup>70</sup>. Para el control del asma se deben tener en cuenta dos factores: por una parte el control actual, es decir, las manifestaciones de la enfermedad presentes en el día a día del paciente y por otro lado el riesgo futuro, es decir, las posibles consecuencias <sup>70</sup> (**Figura 6**).



**Figura 6. Factores para la determinación del control de asma en el paciente.** Para el control de la enfermedad, por un lado, se debe alcanzar el control actual y por otro lado, se debe reducir el riesgo futuro <sup>66</sup>.

### 1.2.6 Tratamiento

El tratamiento del asma tiene como objetivo mantener el control de la enfermedad lo antes posible, prevenir las exacerbaciones y la obstrucción crónica del flujo aéreo y reducir al máximo la mortalidad. Existen 6 escalones de tratamiento en función de los requerimientos mínimos de medicación para mantener el control de la enfermedad. Este tratamiento, se ajusta continuamente en función de la gravedad del paciente (que se evalúa de manera periódica), de modo que se bajará o se subirá de escalón terapéutico según convenga <sup>66</sup>. En la **Figura 7** se indican los escalones terapéuticos del asma en adulto y el tratamiento más adecuado en cada uno de ellos.



ARLT: antagonista de los receptores de los leucotrienos; GCI: glucocorticoide inhalado, LABA: agonista  $\beta_2$  adrenérgico de acción prolongada; SABA: agonista  $\beta_2$  adrenérgico de acción corta.

**Figura 7. Esquema de los escalones terapéuticos del tratamiento del asma en adultos.** En función del escalón terapéutico, se utilizarán unas opciones terapéuticas determinadas adecuadas a la gravedad de la enfermedad <sup>66</sup>.

Los fármacos utilizados para el tratamiento del asma se pueden clasificar principalmente en dos categorías: fármacos broncodilatadores y fármacos antiinflamatorios <sup>71</sup>.

### 1.2.6.1 Fármacos broncodilatadores

Los fármacos broncodilatadores tienen como objetivo aliviar el broncoespasmo mediante la relajación del músculo liso en las vías aéreas. Aunque existe una gran variedad de mecanismos relajantes del músculo liso, en la actualidad han demostrado eficacia clínica las siguientes categorías farmacológicas <sup>66,71</sup>:

- Agonistas  $\beta_2$  adrenérgicos de acción corta (SABA): salbutamol o terbutalina.
- Agonistas  $\beta_2$  adrenérgicos de acción prolongada (LABA): formoterol, salmeterol o vilanterol.
- Anticolinérgicos: bromuro de Ipratropio o tiotropio.
- Metilxantinas: teofilina (en desuso por su menor eficacia).

### 1.2.6.2 Fármacos antiinflamatorios

Los fármacos antiinflamatorios pueden resolver la inflamación bronquial persistente y/o impedir el posterior desarrollo de la inflamación. No se utilizan para revertir el broncoespasmo del ataque agudo. En este grupo podemos diferenciar varias categorías farmacológicas con demostrada eficacia clínica <sup>66,71</sup>:

- Glucocorticoides inhalados (GCI): budesónida, beclometasona, ciclesonida, fluticasona o mometasona.
- Glucocorticoides sistémicos: Prednisona o hidrocortisona.
- Inhibidores de leucotrienos (ARLT): montelukast o zafirlukast.
- Fármacos biológicos: Estos fármacos más actuales son muy prometedores para el manejo del asma severo. Dentro de este grupo encontramos los siguientes fármacos aprobados para el tratamiento del asma <sup>72,73</sup>:
  - Benralizumab: Anticuerpo monoclonal humanizado y afucosilado (IgG1 $\kappa$ ) que se une con gran afinidad y especificidad a la subunidad alfa del receptor de la IL-5 (IL-5R $\alpha$ ). Este receptor se expresa específicamente en la superficie de eosinófilos y basófilos por lo que reduce sus niveles.
  - Dupilumab: Anticuerpo monoclonal humano (IgG4) que se une a la subunidad del receptor alfa de la IL-4 y bloquea la señalización tanto de la IL-4 como de la IL-13.
  - Mepolizumab: Anticuerpo monoclonal humanizado (IgG1 $\kappa$ ) que se une a la IL-5 humana con alta afinidad y especificidad. Inhibe la maduración, activación, proliferación y reclutamiento de eosinófilos.
  - Omalizumab: Anticuerpo monoclonal humanizado (IgG1 $\kappa$ ) que se une selectivamente a la IgE humana y reduce la respuesta inflamatoria de tipo Th2.
  - Reslizumab: Anticuerpo monoclonal humanizado (IgG4 $\kappa$ ) frente a la IL-5 humana con mayor afinidad que el mepolizumab. Inhibe la maduración, activación, proliferación y reclutamiento de eosinófilos.
  - Tezepelumab: Anticuerpo monoclonal humano (IgG2 $\lambda$ ) que bloquea la linfopoyetina del estroma tímico (TSLP), implicada en el asma a través de la estimulación del epitelio.

### 1.3 Enfermedad pulmonar obstructiva crónica

#### 1.3.1 Definición

La EPOC se caracteriza por síntomas persistentes y limitación crónica al flujo aéreo. Las principales causas de la obstrucción de las vías aéreas son el estrechamiento de las vías aéreas pequeñas por la fibrosis y el colapso de las vías aéreas periféricas a consecuencia de la pérdida de elasticidad del parénquima pulmonar, mecanismos que son irreversibles. La EPOC, es una enfermedad causada principalmente por el consumo de tabaco, fuente de NO exógeno. El humo del tabaco contiene gran cantidad de sustancias dañinas que provocan una respuesta inflamatoria y un excesivo estrés oxidativo en los pulmones <sup>40,74,75</sup>. Sin embargo, según la Organización Mundial de la Salud, existen otras causas menos frecuentes que pueden provocar EPOC, como son <sup>76</sup>:

- La exposición profesional a polvos, humos o productos químicos.
- La contaminación del aire en interiores.

- Eventos en la vida fetal y los primeros años de vida, como el retraso del crecimiento intrauterino.
- La prematuridad y las infecciones respiratorias frecuentes o graves en la infancia, que impiden que los pulmones se desarrollen por completo.
- Asma en la infancia
- Déficit de alfa-1 antitripsina, una enfermedad congénita rara que puede provocar EPOC a una edad temprana.

A menudo los términos 'enfisema' y 'bronquitis crónica' se emplean para referirse a la EPOC. El enfisema hace referencia a la destrucción de los alvéolos del pulmón y está relacionado la obstrucción de las vías aéreas pequeñas <sup>77</sup>. La bronquitis crónica hace referencia a la tos crónica con esputo debida a la inflamación de las vías respiratorias <sup>76</sup>. Los síntomas de la EPOC incluyen sibilancias, disnea, opresión torácica y tos, generalmente productiva. En ocasiones, los pacientes sufren lo que se denominan exacerbaciones, que consisten en episodios donde se incrementa la disnea, la tos y la producción de esputo durante varios días o incluso algunas semanas. Estos episodios pueden generar la necesidad de atención médica urgente, hospitalizaciones y en los casos más graves, el fallecimiento del paciente. Además, provocan un impacto significativo a largo plazo en la calidad de vida de los pacientes, la función pulmonar y el riesgo de otros efectos adversos <sup>78,79</sup>.

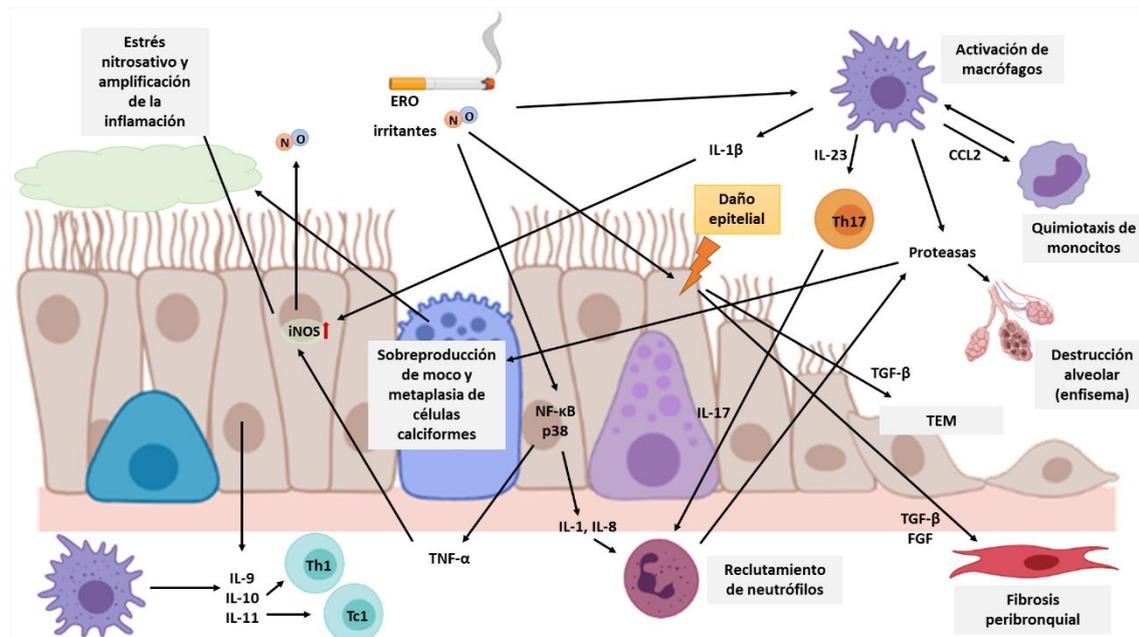
### **1.3.2 Fisiopatología**

En los pacientes de EPOC, el estrechamiento de las vías aéreas pequeñas está causado por fibrosis peribronquial, estrechamiento de la membrana basal, deposición de colágeno, hiperplasia de las células epiteliales, metaplasia de células caliciformes y escamosas, y angiogénesis <sup>80</sup>. Además, en estos pacientes también se observa disfunción ciliar e hipersecreción de moco, fenómenos que contribuyen a esa obstrucción de las vías aéreas <sup>40</sup>. Los pacientes con EPOC tienen una inflamación crónica exagerada, con un mayor número de neutrófilos y macrófagos en la luz de las vías aéreas. Además, también hay un incremento de macrófagos y linfocitos T y B en la pared de las vías aéreas y en el parénquima <sup>40,81</sup>. El humo del tabaco es fuente de NO exógeno, irritantes y ERO que activan a los macrófagos y a las células epiteliales de las vías aéreas. Este incremento de las ERO observado en los pacientes EPOC, no sólo amplifica la respuesta inflamatoria, sino que también induce el remodelado de las vías aéreas y la muerte celular que caracteriza el enfisema <sup>81</sup> (**Figura 8**).

La activación de las células epiteliales de las vías aéreas y de los macrófagos provoca que liberen citoquinas que atraen a las células inflamatorias a los pulmones. Por un lado, los macrófagos secretan CCL2 para atraer a los monocitos al pulmón, donde se diferencian a macrófagos. Por otro lado, las células epiteliales secretan las interleucinas IL-1 e IL-8 que atraen a los neutrófilos, generando una inflamación neutrofílica. Además, ambos

tipos celulares, macrófagos y células epiteliales secretan IL-9, IL-10 e IL-11 que atraen a las células Th1 y Tc1. Los macrófagos también activan a las células Th17 mediante la liberación de IL-23, que contribuyen a la inflamación neutrofílica con la liberación de la interleucina IL-17 por parte de las células Th17. Tanto los neutrófilos, como los macrófagos y las células epiteliales liberan proteasas, como la metaloproteinasa 9 (MMP-9), que causa la destrucción de los alveolos, enfisema, la sobreproducción de moco y metaplasia de las células calciformes. Por otro lado, en la EPOC, las células epiteliales, además de liberar diversos mediadores inflamatorios y proteasas, son una fuente importante de TGF- $\beta$ , que como en la patología de asma, está involucrado en la limitación del flujo aéreo y la fibrosis, lo que perpetua la fibrosis peribronquial y el remodelado de las vías aéreas, principalmente mediante los procesos TEM y TFM (detallados en el apartado 1.2.2) <sup>58</sup>. Tras la estimulación *in vitro* de células epiteliales de bronquio humano con extracto de humo de tabaco, se observó un incremento en la activación de las ERO, una mayor liberación de TGF- $\beta$ 1 y una mayor fosforilación de ERK1/2 y SMAD3. Estos fenómenos están relacionados con la TEM y contribuyen al estrechamiento de la pared de las vías aéreas pequeñas <sup>58</sup> (**Figura 8**).

Además, se ha observado que los niveles de F<sub>E</sub>NO de los pacientes de EPOC son más altos que los observados en personas sanas no fumadoras, aunque esos niveles no son tan altos como los observados en pacientes asmáticos antes de su tratamiento <sup>82</sup>. Esto es debido a que la expresión de la iNOS está incrementada en las células epiteliales por el factor TNF- $\alpha$  producida por las células epiteliales y la IL-1 $\beta$  producida por los macrófagos (**Figura 8**). Los niveles aumentados de NO se asocian a un mayor estrés nitrosativo derivado de las células epiteliales, lo que causa la oxidación y la nitración de residuos tirosina de varias proteínas pulmonares generando una amplificación de la respuesta inflamatoria. Además, se ha observado que la expresión de la iNOS está relacionada con el grado de limitación del flujo de las vías aéreas <sup>83-86</sup>. El grupo de *Fysikopoulos et al.* <sup>87</sup> estableció un modelo de enfisema en ratón mediante tratamiento con elastasa, y después de la inhibición farmacológica de la iNOS, demostraron una regeneración parcial del parénquima, por lo que existe una relación entre el incremento de la expresión de la enzima y el enfisema, aunque no sería la única causa.



**Figura 8. Representación esquemática de la inflamación neutrofílica pulmonar característica de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC).** El humo del tabaco es fuente de óxido nítrico (NO) exógeno, irritantes y especies reactivas de oxígeno (ERO) que activan a los macrófagos y a las células epiteliales de las vías aéreas. Estas células al activarse liberan citoquinas que atraen a las células inflamatorias a los pulmones. Los macrófagos secretan CCL2 para atraer monocitos que se diferencian a macrófagos en los pulmones. Las células epiteliales secretan IL-1 e IL-8 que atraen a los neutrófilos, y ambos tipos celulares, macrófagos y células epiteliales, secretan IL-9, IL-10 e IL-11 para atraer células Th1 y Tc1. Además, los macrófagos liberan IL-23 que activa a las células Th17, que a su vez promueven la inflamación neutrofílica al producir IL-17. Los neutrófilos, los macrófagos y las células epiteliales liberan proteasas, como la MMP-9, que causa destrucción de los alveolos, enfisema, sobreproducción de moco y metaplasia de las células calciformes. El humo del tabaco causa daño epitelial, lo que genera la secreción por parte de las células epiteliales de TGF- $\beta$ , entre otros factores de crecimiento, lo que estimula la proliferación de los fibroblastos, la transición fibroblasto mesenquimal (TFM) y la transición epitelio mesenquimal (TEM), dando como resultado el remodelado de las vías aéreas y la fibrosis alrededor de las vías aéreas pequeñas. Por otro lado, la expresión de la iNOS está incrementada en las células epiteliales por TNF- $\alpha$  y la IL-1 $\beta$  producida por las células epiteliales y los macrófagos, respectivamente. Los niveles aumentados de NO están asociados con un estrés nitrosativo derivado de las células epiteliales que causa la oxidación y la nitración de residuos tirosina de varias proteínas pulmonares generando una amplificación de la respuesta inflamatoria. Imagen creada con Biorender.

### 1.3.3 Epidemiología

La enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) es un trastorno que causa gran morbilidad y mortalidad. Según la OMS, la EPOC es la tercera causa de muerte, pues en 2019 ocasionó 3,23 millones de defunciones en el mundo.

En España, la prevalencia de la enfermedad varía mucho en función de la zona geográfica, el sexo y la edad. Además, la EPOC es una enfermedad infradiagnosticada lo que genera que muchos pacientes no reciban un tratamiento adecuado hasta que no alcanzan estados avanzados de la enfermedad. Según el estudio EPISCAN II publicado en 2021, la prevalencia de esta enfermedad en España es del 11,8% entre la población adulta. Si se diferencia por sexos, se estima que la EPOC afecta al 14,6% de los varones y al 9,4% de las mujeres <sup>88</sup>.

El infradiagnóstico de la EPOC tiene un elevado impacto económico y social. Un correcto diagnóstico de EPOC permitiría detectar en estadios tempranos la enfermedad y realizar así medidas terapéuticas y de prevención de manera para impedir que la enfermedad progrese a estadios más avanzados que conllevan una menor discapacidad de los pacientes y un mayor gasto económico sanitario <sup>89</sup>. Desde la perspectiva del Sistema Sanitario Español, la mayor parte de los costes directos que se atribuyen a los pacientes lo constituyen el manejo de las exacerbaciones agudas, pues los pacientes que presentan exacerbaciones necesitan más recursos sanitarios a consecuencia de las hospitalizaciones y las visitas a urgencias. En concreto, el coste medio anual por paciente de EPOC es de 1403.1€ y este coste se ve incrementado hasta 3.200,4€ si presenta exacerbaciones <sup>90</sup>.

#### **1.3.4 Diagnóstico**

El diagnóstico de la EPOC debe considerarse cuando el paciente presenta los siguientes síntomas <sup>91</sup>:

- Disnea: Esta es progresiva, persistente y empeora con el ejercicio.
- Tos crónica: Puede ser intermitente e improductiva.
- Producción de esputo crónica: Cualquier patrón de producción de esputo podría indicar que el paciente padece EPOC.
- Infecciones del tracto respiratorio inferior recurrentes.
- Historial con factores de riesgo: Como factores genéticos, anomalías en el desarrollo o congénitas, consumo de tabaco, exposición a humo de combustibles domésticos para cocinar y calentar o a polvos, vapores, humos, gases y otros compuestos en el puesto de trabajo.
- Historial clínico familiar de EPOC o factores de la infancia como infecciones respiratorias en la infancia.

En este contexto clínico, la espirometría con prueba broncodilatadora es la técnica que se utiliza para el diagnóstico de la EPOC. Es importante destacar que la EPOC está infradiagnosticada, pues en pacientes asintomáticos sin exposición significativa al humo del tabaco u otros estímulos nocivos no está indicada la espirometría, por lo que no se detecta de manera temprana la enfermedad en estos casos <sup>91</sup>. Del mismo modo que para el diagnóstico del asma, se considera que hay una obstrucción del flujo aéreo cuando el cociente de los parámetros  $VEF_1/CVF$ , es inferior al valor 0,7. Este valor junto con los parámetros relativos a los síntomas y factores de riesgo anteriormente mencionados, son cruciales para el diagnóstico de la EPOC. En los pacientes que presenten la sintomatología característica, se utiliza también el diagnóstico diferencial que es amplio e incluye: asma, insuficiencia cardíaca congestiva, bronquiectasias, cáncer de pulmón, enfermedad pulmonar intersticial, fibrosis pulmonar, hipertensión pulmonar, sarcoidosis, tuberculosis y displasia broncopulmonar <sup>92</sup>.

Además, la EPOC es una enfermedad muy heterogénea, por lo que no es posible caracterizarla utilizando sólo la ratio  $VEF_1/CVF$ . En función del fenotipo, es decir, de las formas clínicas de los pacientes con EPOC, se puede clasificar a los pacientes en subgrupos con valor pronóstico y así poder determinar la terapia más adecuada <sup>74</sup>. La Guía Española de la EPOC (GesEPOC) propone 4 fenotipos de la enfermedad <sup>74</sup>:

1. No agudizador, con enfisema o bronquitis crónica.
2. Mixto EPOC-asma.
3. Agudizador con enfisema.
4. Agudizador con bronquitis crónica.

### ***1.3.5 Clasificación de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica en función de su gravedad***

El objetivo de evaluación de la gravedad de la enfermedad de EPOC en los pacientes es determinar el nivel de limitación del flujo de aire, su impacto en el estado de salud del paciente y el riesgo futuro de exacerbaciones, hospitalizaciones o muerte, para así guiar mejor la terapia.

La clasificación de la EPOC en función de la gravedad de la limitación del flujo aéreo se hace en función de los criterios establecidos por la 'Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease' (GOLD). GOLD es un grupo internacional de expertos en salud pulmonar que, periódicamente, genera pautas para que los médicos las utilicen cuando atienden a personas con EPOC y otras enfermedades pulmonares. Estos criterios dividen a los pacientes de EPOC en 4 grupos GOLD1, GOLD2, GOLD3 y GOLD4 según los valores  $VEF_1$  obtenidos en la espirometría. Para minimizar la variabilidad la espirometría debe realizarse después de administrarse una dosis adecuada de al menos un broncodilatador inhalado de acción corta <sup>91</sup>.

Los valores establecidos para cada GOLD se muestran en la **Tabla 1**.

Clasificación de los pacientes de EPOC según el valor VEF <sub>1</sub>		
En pacientes con ratio VEF <sub>1</sub> /CVF < 0,7		
<b>GOLD1</b>	Leve	VEF <sub>1</sub> ≥ 80% del valor predicho
<b>GOLD2</b>	Moderado	50% ≤ VEF <sub>1</sub> < 80% del valor predicho
<b>GOLD3</b>	Severo	30% ≤ VEF <sub>1</sub> < 50% del valor predicho
<b>GOLD4</b>	Muy severo	VEF <sub>1</sub> < 30% del valor predicho

**Tabla 1. Clasificación de la gravedad de la EPOC según los criterios GOLD.** La clasificación GOLD se realiza en función del valor VEF<sub>1</sub> obtenido tras la prueba de espirometría después de administrarse una dosis adecuada de al menos un broncodilatador inhalado de acción corta. Abreviaturas: VEF<sub>1</sub>: Volumen espiratorio forzado en un segundo; CVF: Capacidad vital forzada.

Por otro lado, es conveniente evaluar los síntomas del paciente y complementar la clasificación GOLD obtenida por espirometría con estos datos. Para ello se evalúa la disnea y las exacerbaciones de los pacientes con EPOC para clasificarlos en los grupos A, B, C o D. De esta manera, el número (1-4) proporcionará información sobre la severidad de la limitación del flujo aéreo y la letra (A, B, C o D) información sobre los síntomas y el riesgo futuro a exacerbaciones <sup>91</sup>.

Una persona que no haya tenido exacerbaciones o no haya requerido ingreso en el hospital en el último año, pertenecería al grupo A o B (en función de la evaluación de su respiración). En cambio, las personas con alguna exacerbación que hayan sido hospitalizadas o dos o más exacerbaciones con ingreso o no en hospital en el último año, estarían en el grupo C o D (también en función de la evaluación de la disnea) <sup>91</sup>.

### 1.3.6 Tratamiento

Una vez diagnosticados, todos los pacientes de EPOC deben llevar a cabo una serie de medidas generales: deben dejar de fumar, seguir una dieta apropiada, hacer ejercicio regular adaptado a la edad y las condiciones físicas y someterse a la evaluación y tratamiento de las comorbilidades <sup>93</sup>. Además, es aconsejable que los pacientes de EPOC se vacunen de manera periódica contra la influenza o gripe, pues la infección por este virus puede ocasionar una agudización o exacerbación de su patología, incluso aumentar el riesgo de muerte <sup>91</sup>.

El tratamiento de la EPOC está enfocado en reducir los síntomas de los pacientes, la frecuencia y gravedad de las exacerbaciones y mejorar la tolerancia al ejercicio y el estado de salud. Sin embargo, no hay estudios concluyentes sobre fármacos capaces de mejorar el valor VEF<sub>1</sub> y el progreso de la enfermedad. Igual que para el tratamiento del

asma, los fármacos utilizados para la EPOC se clasifican principalmente en: fármacos broncodilatadores y fármacos antiinflamatorios <sup>94</sup>. El tratamiento de los pacientes de EPOC y la combinación de fármacos elegida para cada uno de ellos debe ser individualizado ya que la relación entre la gravedad de los síntomas, la limitación del flujo aéreo y la severidad de las exacerbaciones varía mucho entre los pacientes. La elección de un tratamiento u otro buscará un balance entre el coste de la medicación y sus beneficios clínicos contra los efectos adversos del mismo <sup>91</sup>.

### **1.3.6.1 Fármacos broncodilatadores**

En enfermos de EPOC, al igual que en pacientes asmáticos, los fármacos broncodilatadores alteran el tono del músculo liso de las vías aéreas mejorando el flujo aéreo por el ensanchamiento de las vías aéreas <sup>91</sup>. Estos fármacos son esenciales para el manejo de los síntomas de la EPOC por lo que se utilizan de manera regular para reducir o prevenir síntomas solos o en combinación. Los fármacos broncodilatadores utilizados para el tratamiento de pacientes con EPOC son:

- Agonistas  $\beta_2$  adrenérgicos de acción corta (SABA): fenoterol, levalbuterol, salbutamol o terbutalina.
- Agonistas  $\beta_2$  adrenérgicos de acción prolongada (LABA): formoterol, salmeterol, oladaterol o vilanterol.
- Anticolinérgicos:
  - de corta acción: bromuro de ipratropio o bromuro de oxitropio.
  - de larga acción: bromuro de aclidinio, bromuro de glicopirronio, tiotropio, umeclidinio, glicopirrolato o revefenacina.
- Metilxantinas: Existe controversia sobre los efectos exactos de este tipo de fármacos: teofilina.

### **1.3.6.2 Fármacos antiinflamatorios**

Los fármacos antiinflamatorios han demostrado su eficacia clínica principalmente en las exacerbaciones que sufren los pacientes de EPOC <sup>91</sup>. Dentro de este grupo encontramos los siguientes tipos de fármacos antiinflamatorios aprobados en la actualidad para el tratamiento de la EPOC:

- Corticoides inhalados: Generalmente se administran en combinación con algún fármaco broncodilatador: budesónida, beclometasona, propionato de fluticasona, furoato de fluticasona o mometasona.
- Inhibidores de la PDE4: roflumilast.
- Antibióticos: azitromicina o eritromicina.
- Mucolíticos: erdoesteína, carbocisteína o N-acetilcisteína (NAC).

#### **1.4 Papel del guanosín 3',5'-monofosfato cíclico en el asma y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica**

Aunque en las vías aéreas de los pacientes con EPOC y asma, los niveles de NO están aumentados, no se observa un aumento en la activación de la enzima GCs y por tanto tampoco un aumento de GMPc<sup>18</sup>.

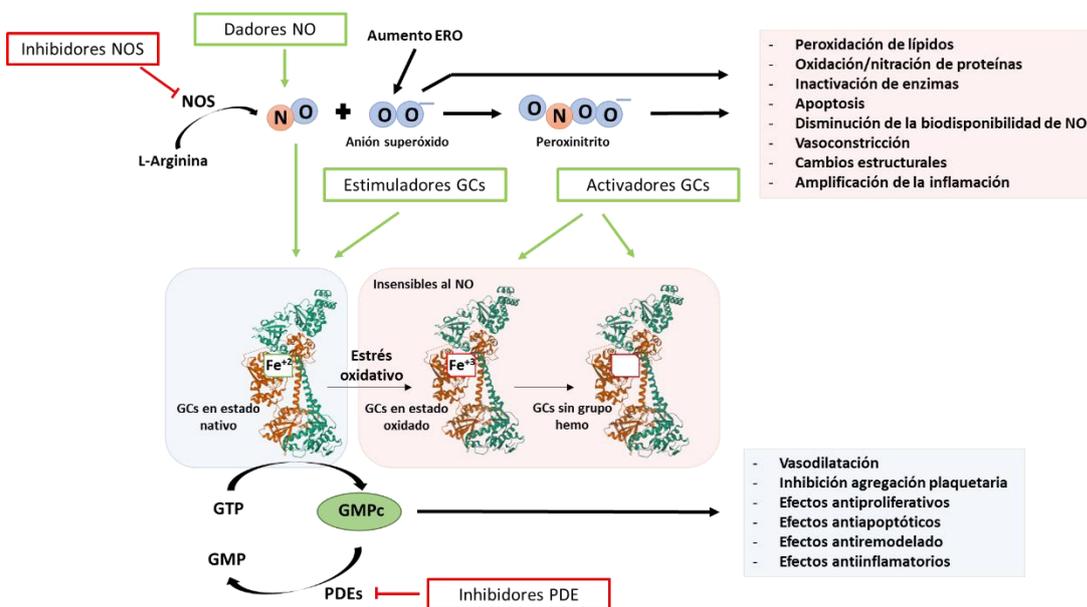
La ruta de señalización del NO – GCs – GMPc puede verse afectada por diversos motivos. Por un lado, existe una reducción de la cantidad del NO, a causa de su reacción con el O<sub>2</sub><sup>-</sup> para la generación de peroxinitrito. Por otro lado, a causa del estrés oxidativo, se produce la alteración del estado redox de GCs (Fe<sup>+2</sup> → Fe<sup>+3</sup>), que la hace inactiva a la unión del NO<sup>20</sup>. Por otra parte, se ha observado una disminución de la expresión de la enzima GCs en células epiteliales alveolares y bronquiales y en células del músculo liso de las vías aéreas en pacientes de EPOC y personas fumadoras<sup>22,95</sup>, así como en modelos animales de asma<sup>96</sup>. El mecanismo por el cual ocurre esta disminución de la expresión de la enzima GCs en asma y EPOC no está muy claro, pero se ha observado que TGF-β provoca una disminución de la expresión de la subunidad α<sub>1</sub> de la GCs en células de músculo liso de arteria pulmonar mediante la señalización MEK y ERK<sup>97</sup>. Por otro lado, también se ha demostrado en fibroblastos pulmonares perinatales una disminución de esta subunidad tras el estímulo de IL-1β vía la señalización TAK1 y NF-κB<sup>98</sup>. Teniendo en cuenta que tanto TGF-β como IL-1β están incrementados en estas patologías, esta podría ser la causa de la reducción de la expresión de la enzima en las células epiteliales de estos pacientes.

Una menor expresión de la GCs, así como, una menor actividad a causa de su oxidación, generan menos GMPc. Esto se traduce en una menor activación de la PKG y un aumento en la señalización de TGF-β. Hecho que contribuye a un aumento del tono de las vías aéreas y la fibrosis<sup>99</sup>. TGF-β actúa a través de dos rutas de señalización: la ruta clásica, llamada canónica, que es dependiente de SMAD, y la ruta no canónica independiente de SMAD. El GMPc interfiere con la señalización de TGF-β principalmente tras la activación de PKG, que inhibe la ruta independiente de SMAD<sup>100,101</sup>. Aunque en el endotelio vascular también se ha visto que la ruta NO – GCs - GMPc – PKG interfiere en la ruta dependiente de SMAD<sup>102</sup>.

#### **1.5 Modulación farmacológica del eje óxido nítrico – guanilato ciclasa soluble – guanosín 3',5'-monofosfato cíclico en el asma y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica**

A causa de los tratamientos subóptimos que existen en la actualidad para el asma o la EPOC surge la necesidad de buscar alternativas, más efectivas, con menos efectos secundarios y que afecten también al curso de estas patologías, previniendo su progresión o incluso revirtiendo los procesos característicos de estas enfermedades.

La modulación del eje NO – GCs – GMPc ofrece un arsenal terapéutico para el tratamiento del asma y la EPOC. Entre los fármacos que actúan sobre esta ruta, se encuentran los fármacos dadores de NO, fármacos inhibidores de la iNOS, fármacos inhibidores de la PDE5 y fármacos estimuladores y activadores de la GCs <sup>18</sup> (Figura 9).



**Figura 9. Esquema del estado redox de la enzima guanilato ciclasa soluble (GCs) y de los fármacos que actúan sobre el eje: óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) – óxido nítrico (NO) – GCs – guanosín 3,5-monofosfato cíclico (GMPc).** Debido al estrés oxidativo, el grupo hemo de la enzima GCs se oxida ( $Fe^{+2} \rightarrow Fe^{+3}$ ) y la enzima es insensible al NO. Además, el grupo hemo oxidado pierde afinidad por la enzima y le libera. Los fármacos que actúan sobre esta ruta son los dadores de NO, los inhibidores de la iNOS, los inhibidores de la fosfodiesterasa 5 (PDE5) y los estimuladores y activadores de la GCs. La imagen de la GCs se ha creado con Mol\*, RCSB PDB: 6JTO <sup>24,26</sup>.

### 1.5.1 Fármacos dadores de óxido nítrico y fármacos inhibidores de la óxido nítrico sintasa inducible

Los fármacos dadores de NO, como nitratos orgánicos, son limitados como tratamiento para EPOC o asma, donde los niveles de NO ya son elevados, pero la actividad de la enzima GCs no está aumentada <sup>20</sup>.

Por otro lado, los fármacos inhibidores de la iNOS consiguen reducir el NO producido de manera excesiva por la iNOS, que reacciona de forma rápida para producir peroxinitrito, pero también reducirían el efecto beneficioso de la activación de la GCs. Existen resultados dispares observados para el tratamiento del enfisema y de pacientes con asma con inhibidores de la iNOS. En asma los inhibidores de la iNOS reducen la F<sub>e</sub>NO, pero eso no mejora la hiperreactividad o la cantidad de células inflamatorias <sup>103</sup>. No obstante, en modelos animales de asma con exposición aguda pero no crónica a alérgenos se ha demostrado una reducción de la hiperreactividad de las vías aéreas <sup>104</sup>. Por otra parte, en un modelo en ratón de enfisema, tras la inhibición de la enzima iNOS se observó una regeneración del pulmón significativa <sup>87</sup>. Sin embargo, estos resultados

contrastan con los obtenidos por el grupo de Boyer et al. <sup>105</sup> en los que la inhibición de la iNOS redujo la nitración y la oxidación de las proteínas sin efecto en la inflamación, proliferación y desarrollo del enfisema. Esto podría explicarse por el grado de daño aplicado para inducir enfisema y el tiempo de tratamiento con el inhibidor de la iNOS. El grupo de Boyer et al. <sup>105</sup> uso una mayor dosis de elastasa generando una mayor destrucción de los alveolos y utilizó el inhibidor de la iNOS un menor tiempo que el grupo de Fysikopoulos et al. <sup>87</sup>. Estos resultados sugieren que los inhibidores de la iNOS pueden ser una buena opción terapéutica para enfisema pulmonar temprano pero no para enfisema más grave.

### **1.5.2 Fármacos inhibidores de la fosfodiesterasa 5**

Los inhibidores de la PDE5, como el sildenafil, el vardenafil o el tadalafil se usan en enfermedades como la disfunción eréctil, la hipertensión pulmonar y enfermedades cardiovasculares por su efecto de relajación del músculo liso <sup>106</sup>. En asma y EPOC, se ha observado un efecto antiinflamatorio de este tipo de fármacos <sup>107,108</sup>. Por otro lado, el sildenafil atenúa la sobreproducción de moco característica de estas patologías al aumentar los niveles de GMPc <sup>109</sup> y ha demostrado que reduce el daño pulmonar al reducir la apoptosis de las células epiteliales de los bronquiolos de ratas sometidas a humo tabaco o infección bacteriana <sup>108</sup>. Esto va en línea con otros resultados que sugieren que la inhibición de la PDE5 puede aliviar la disfunción pulmonar y el enfisema inducida por el humo del tabaco con la restauración de la vía NO – GCs – GMPc – PKG, y la reducción de las ERO <sup>110,111</sup>. Sin embargo, su eficacia está limitada cuando la activación de la GCs está disminuida y, por tanto, también están disminuidos los niveles de GMPc. En estos casos, aunque se inhiba la degradación del GMPc, no se alcanzan los niveles suficientes para el tratamiento de la enfermedad <sup>106,112</sup>.

### **1.5.3 Moduladores de la guanilato ciclasa soluble: estimuladores y activadores**

Por todos los inconvenientes mencionados de los grupos anteriores, son necesarios otros tipos de fármacos que modulan la actividad de la GCs e incrementan el GMPc, independientemente del NO: los estimuladores y los activadores de la GCs. Los estimuladores de la enzima guanilato ciclasa, se unen a la enzima incrementando la formación de GMPc. Estos compuestos son independientes de NO, pero requieren que el grupo hemo GCs este en estado reducido ( $Fe^{+2}$ ). En cambio, los activadores de la GCs, activan la enzima y la formación de GMPc de manera independiente al NO y aún, cuando el grupo hemo de la GCs se encuentra en estado oxidado ( $Fe^{+3}$ ) o incluso cuando se ha perdido <sup>113</sup>. Estos fármacos moduladores de la GCs, solos y en combinación con inhibidores de la PDE5, son tratamientos prometedores para el EPOC y el asma.

#### **1.5.3.1 Estimuladores de la guanilato ciclasa soluble**

Los estimuladores de la GCs tienen una doble acción. Por un lado, estimulan la enzima en su forma nativa, de manera independiente al NO. Por otro, estabilizan la unión del

NO a la enzima GCs, por lo que sensibilizan la enzima a bajas concentraciones de NO<sup>113,114</sup>. Esta clase de fármacos se unen al dominio HNOX de la subunidad  $\beta$  de la enzima, cerca del grupo hemo, evitando que se libere el NO del sitio de unión, generando un cambio conformacional y aumentando la actividad catalítica de la enzima<sup>15,115</sup>.

Los estimuladores de la GCs se descubrieron en 1994, por Bayer en Wuppertal, Alemania. De manera simultánea, investigadores de la Universidad de Taiwán y de la farmacéutica Yung Shin, en Taipéi, Taiwán descubrían el estimulador YC-1. Los primeros estimuladores fueron YC-1, BAY 41-2272 y BAY 41-8543<sup>106</sup>, pero, aunque eran buenos candidatos para la estimulación de la GCs, no dieron buenos resultados al estudiar su metabolismo farmacológico<sup>17</sup>. Posteriormente, se descubrió el riociguat (BAY 63-2521), que fue el primer estimulador de la GCs aprobado para el tratamiento de la hipertensión arterial pulmonar y la hipertensión pulmonar tromboembólica crónica<sup>116,117</sup>. Además, otros estudios, han demostrado un efecto antifibrótico, antiproliferativo y antiinflamatorio del fármaco<sup>112,118</sup>.

En modelos animales de EPOC en ratones y cobayas expuestos al humo del tabaco, se observó que el estimulador BAY 41-2272 y el riociguat previenen el enfisema pulmonar y el remodelado. La estimulación de la GCs consiguió revertir la apoptosis inducida de las células endoteliales y las células epiteliales alveolares después de la exposición de estas a peroxinitrito. Además, en las células epiteliales de las vías aéreas, los estimuladores de la GCs consiguieron revertir la disminución de la expresión inducida por el peroxinitrito de la enzima antioxidante Sod1 y el mediador del mantenimiento pulmonar Fgf10<sup>95</sup>. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en cobayas expuestas a humo de tabaco, en las que el tratamiento con el estimulador BAY 41-2272 revirtió de manera parcial el enfisema. En este estudio, tras la estimulación de la enzima GCs, se observó también un descenso de la inflamación pulmonar y las ERO<sup>119</sup>. Resultados similares se observaron en un modelo animal de hipertensión y enfisema después del tratamiento con riociguat. Este fármaco además de revertir la hipertensión pulmonar también revirtió parcialmente el enfisema actuando en diferentes rutas de señalización. Por un lado, el riociguat revirtió el incremento de la expresión de la iNOS tras la exposición de tabaco. Por otro lado, se observó en células epiteliales que el riociguat contribuye a la regeneración del pulmón al atenuar la actividad de las MMPs y al revertir la reducción de la proliferación inducida por el humo del tabaco<sup>120</sup>.

En diversos estudios se ha comprobado los efectos antiinflamatorios de los estimuladores de la GCs. El fármaco riociguat, aunque a concentraciones elevadas, induce la síntesis de GMPc y la activación de PKG en las plaquetas humanas, inhibiendo su función<sup>121</sup>. Además, se ha observado que el estimulador BAY 41-2272 inhibe la quimiotaxis, la producción de IL-8 y las especies reactivas de oxígeno de los neutrófilos<sup>122</sup> y la quimiotaxis de los eosinófilos en presencia o no de 3-isobutil-1-metilxantina

(IBMX), un inhibidor de las PDEs <sup>123</sup>. En células endoteliales tratadas BAY 41-2272 se ha demostrado que se produce aumento del GMPc y disminuye la expresión de la P-selectina y el rodamiento y la adhesión de los leucocitos <sup>95,124</sup>. Además, en un modelo animal de EPOC en cobayas se observó que el estimulador BAY 41-2272 previene el estrés oxidativo en el plasma, lo que se asocia con una disminución de la inflamación en los pulmones <sup>125</sup>.

En ratas, se observó que el estimulador BAY 41-2272 en sinergia con el NO relaja el músculo traqueal, importante para regular la hiperreactividad de las vías aéreas que se produce en enfermedades como el asma <sup>126</sup>. Un efecto broncodilatador se observó también en cortes de pulmón humano <sup>127</sup> y en modelos de asma de ratones, donde el estimulador BAY 41-2272 consiguió revertir la hiperrespuesta de las vías aéreas de ratones con asma alérgico y restaurar su función pulmonar <sup>128</sup>.

En algunos estudios, se ha demostrado que el estimulador BAY 41-2272 tiene un efecto antifibrótico en fibroblastos pulmonares humanos tratados con TGF- $\beta$  <sup>101,129</sup>. Por otro lado, el riociguat y otros estimuladores son capaces de revertir la TEM en algunas patologías no pulmonares fibróticas en las que el TGF- $\beta$  es un mediador importante <sup>100,130</sup>. Sin embargo, es necesaria una mayor investigación sobre el papel de estos fármacos en la TEM característica de los pacientes con asma y EPOC.

### 1.5.3.2 Activadores de la guanilato ciclasa soluble

A causa de la necesidad de buscar compuestos que activasen la GCs en su forma oxidada o sin grupo hemo, se identificó el compuesto BAY 58-2667 (cinaciguat), siendo el primer activador de la GCs que además de ser NO independiente, era también hemo independiente <sup>131</sup>. Además, existen otros activadores como el BAY 60-2770, el HMR 1766 (ataciguat) o el S-2448, pero hasta la fecha ningún activador está aprobado para su uso <sup>113</sup>.

Tras la oxidación e inhibición de la enzima GCs con el compuesto ODQ el cinaciguat es capaz de activar la enzima GCs, efecto que no se observa con los fármacos estimuladores <sup>131</sup>. Por tanto, estos fármacos, tienen una mejor actividad farmacológica en condiciones de estrés oxidativo donde hay una alteración del estado redox del grupo hemo GCs ( $\text{Fe}^{+2} \rightarrow \text{Fe}^{+3}$ ) o incluso una pérdida del mismo, que genera la ubiquitinación de la GCs <sup>132</sup>. El cinaciguat se une a la cavidad del grupo hemo de la GCs, activándola, estabilizándola y evitando su degradación <sup>133-135</sup>. Existe una competición entre el grupo hemo de la enzima GCs y el cinaciguat, por lo que en presencia de ODQ que oxida el grupo hemo y hace más inestable su unión, hay un mayor efecto del activador <sup>136</sup>.

Se ha observado que un incremento del GMPc, ya sea por la estimulación o por la activación de la GCs inhibe la diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos producida por TGF- $\beta$ , y ese efecto es mayor cuando se combina con un inhibidor de la PDE5. Sin

embargo, se observan diferencias de respuestas a los fármacos entre fibroblastos procedentes de diferentes órganos <sup>137</sup>. Concretamente, la combinación del sildenafilo (inhibidor de la PDE5) con el activador BAY 58-2667, en presencia de ODQ, suprimió la diferenciación de fibroblastos pulmonares a miofibroblastos inducida por TGF- $\beta$  <sup>138</sup>. Sin embargo, como en el caso de los estimuladores, más investigación es necesaria para elucidar su efecto en la TEM.

Además del efecto antifibrótico de los activadores de la GCs, también se ha observado un efecto antiinflamatorio de estos fármacos. Por un lado, el cinaciguat demostró un efecto inhibitorio de la agregación de plaquetas <sup>139</sup>. Por otra parte, el activador BAY 60-2770, redujo la quimiotaxis de los eosinófilos humanos al pulmón, efecto que se potenció con el oxidante ODQ. Además, en un modelo animal de asma el tratamiento con BAY 60-2770 redujo la migración de leucocitos al pulmón, y se observó una disminución de las interleucinas IL-5 e IL-4 en el lavado broncoalveolar. En estos ratones tratados con el activador de la GCs, se observó una normalización de los niveles de expresión de las enzimas iNOS y la GCs <sup>140</sup>. Resultados similares se obtuvieron en un modelo murino de EPOC, en el que se observó que el humo del tabaco disminuyó los niveles de GCs y GMPc. La administración de cinaciguat a estos animales no sólo restauró los niveles epiteliales de GMPc, sino que también el nivel de expresión de la enzima GCs, lo que atenuó la hiperreactividad de las vías aéreas <sup>22</sup>.

Por otro lado, en los ataques de asma o las exacerbaciones en la EPOC hay una resistencia respiratoria que genera una obstrucción de las vías altas respiratorias e induce daño pulmonar. En un modelo animal de ratón con resistencia respiratoria se observó que el tratamiento con cinaciguat revertía el daño pulmonar y restauraba los niveles de células inflamatorias del lavado broncoalveolar, quedando mejorada la resistencia y la elasticidad de las vías aéreas de los ratones tratados <sup>141</sup>.

Finalmente, se ha demostrado que el activador BAY 60-2770, de la misma manera que el estimulador BAY 41-2272, tiene un efecto broncodilatador en cortes de pulmón humano <sup>127</sup>, efecto que también se ha observado en modelos animales de asma en ratón <sup>128</sup>.

## **2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**



## 2.1 Hipótesis

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

- El GMPc está involucrado en diversos procesos fisiológicos, entre los que se incluyen la relajación muscular, la dilatación de los bronquios y de los vasos sanguíneos, efectos en las rutas de señalización de diferenciación y proliferación celular, efectos antiinflamatorios e inhibición de la agregación de plaquetas<sup>18,27</sup>. Además, el GMPc en las células epiteliales está involucrado en la regulación de los canales epiteliales de sodio, cicatrización de heridas, migración y batido ciliar, entre otras funciones<sup>28-31</sup>.
- En las vías aéreas de los pacientes con EPOC y asma, los niveles de NO están aumentados, pero esto no se traduce en un aumento de GMPc, ya que en estos pacientes está afectada la ruta NO – GCs – GMPc y se observa una disminución de los niveles de GMPc<sup>18</sup>.
- Un menor nivel de GMPc se traduce en una menor activación de la PKG y un aumento en la señalización de TGF- $\beta$ . Hecho que contribuye a un aumento del tono de las vías aéreas y la fibrosis<sup>99</sup>.

Por tanto, se establece la siguiente hipótesis:

**La modulación farmacológica de la GCs tiene un efecto inhibitorio de los procesos inflamatorios, así como de la fibrosis, característicos del asma y la EPOC. El riociguat y el cinaciguat, en presencia o no del sildenafil, mitigan dichos procesos al inhibir la producción de mediadores proinflamatorios, las rutas de señalización de TGF- $\beta$  y las ERO.**

## 2.2 Objetivos

Con el fin de evaluar la validez de la hipótesis planteada, se establece el siguiente objetivo primario:

- Analizar si riociguat y cinaciguat, en presencia o no del sildenafil, mitigan los procesos inflamatorios, así como de la fibrosis, característicos del asma y la EPOC.

Además, se establecen los siguientes objetivos secundarios:

- Analizar la expresión de las subunidades  $\alpha_1$  y  $\beta_1$  en los pulmones de donantes sanos y pacientes con asma y EPOC.

## HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

---

- Evaluar la oxidación de la enzima GCs en presencia del humo del tabaco.
- Estudiar como el cinaciguat y el riociguat, en presencia y ausencia de sildenafil, actúan sobre la producción de GMPc en condiciones de estrés oxidativo.
- Determinar la generación de GMPc inducida por el riociguat y el cinaciguat, en presencia o no del sildenafil, en neutrófilos, fibroblastos pulmonares primarios humanos y células epiteliales de bronquio humano.
- Explorar los efectos del riociguat y el cinaciguat, en presencia o no del sildenafil, sobre la liberación de mediadores de la inflamación de los neutrófilos.
- Estudiar los efectos del riociguat y el cinaciguat, en presencia o no del sildenafil, sobre la adhesión de monocitos a las células endoteliales.
- Observar el papel del riociguat y el cinaciguat, en presencia o no de sildenafil, en la generación de ERO por parte de los fibroblastos pulmonares y las células epiteliales de bronquio provocada por el humo del tabaco.
- Elucidar los efectos del riociguat y el cinaciguat, en presencia o no del sildenafil, sobre la proliferación y la TFM de fibroblastos pulmonares primarios humanos, inducida por TGF- $\beta$  o tabaco.
- Evaluar los efectos del riociguat y el cinaciguat, en presencia o no del sildenafil, sobre la TEM de células epiteliales primarias de bronquio humano, inducida por TGF- $\beta$  o tabaco.
- Establecer los mecanismos y rutas de señalización mediante los cuales el sildenafil, el riociguat y el cinaciguat causan la inhibición de la TFM y la TEM inducida por TGF- $\beta$  o tabaco.

## **3 MATERIAL Y MÉTODOS**



### 3.1 Material

#### 3.1.1 Fármacos

Los fármacos utilizados se muestran en la **Figura 10** y fueron los siguientes:

- **Cinaciguat (BAY 58-2667):** MedChemExpress, Referencia HY-14181
- **Riociguat (BAY 63-2521):** MedChemExpress, Referencia HY-14779
- **Sildenafil:** Cayman Chemical, Referencia 10008671
- **Roflumilast:** Selleckchem, Referencia S2131
- **Obacunona:** Selleckchem, Referencia S3784

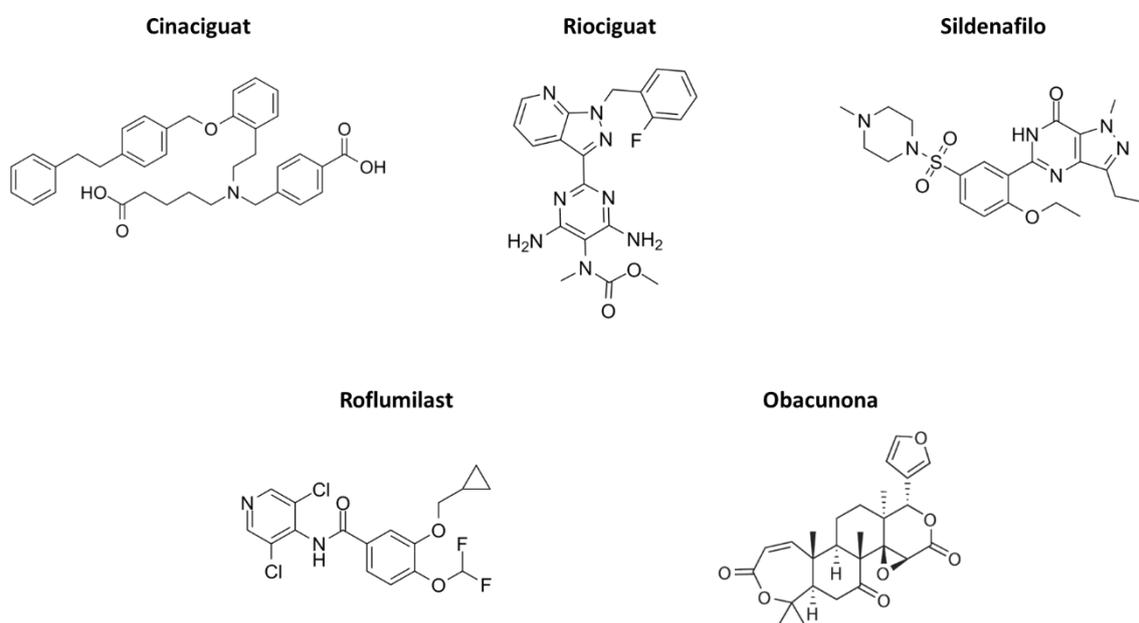


Figura 10. Estructura química de los fármacos utilizados.

#### 3.1.2 Estímulos

- **Extracto de humo de tabaco (EHT):** El EHT se obtuvo a partir de los cigarrillos de investigación (1R6F; Tobacco Health Research, Universidad de Kentucky, KY, EEUU).
- **Factor de crecimiento transformador-beta 1 (TGF- $\beta$ 1):** Sigma - Aldrich, Referencia T7039.
- **LPS:** Sigma – Aldrich, Referencia L2654.

**3.1.3 Reactivos utilizados**

Reactivo	Casa comercial	Referencia
2-Mercaptoetanol	Sigma - Aldrich	M6250
2x Laemmli Sample Buffer	BIO-RAD	1610737
4–15% Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Protein Gels, 15-well, 15 µl	BIO-RAD	4561086
4–20% Mini-PROTEAN® TGX™ Gel, 10 well, 50 µl	BIO-RAD	4561094
5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, acetyl ester (CM-H <sub>2</sub> DCFDA)	Thermo Scientific Fisher	C6827
Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)	Sigma - Aldrich	ED2SC
Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazino etanosulfónico (HEPES)	Sigma - Aldrich	H4034
Ácido clorhídrico (HCl)	Panreac AppliChem	131020
Ácido etilenglicol tetraacético (EGTA)	Sigma – Aldrich	E4378
Ácido tricloroacético (cloroformo)	Panreac AppliChem	131252
Acutasa ('Accutase cell detachment solution')	Sigma – Aldrich	SCR005
Agua dietilpirocarbonato (DEPC)	Thermo Scientific Fisher	AM9906
Albúmina de suero bovino (BSA)	Sigma - Aldrich	A7906

Reactivo	Casa comercial	Referencia
Alcohol isopropílico	PanReac AppliChem	131090.1612
Azul de tripano	Molecular Probes, Invitrogen	T10282
Bicarbonato de sodio (NaHCO <sub>3</sub> )	Panreac AppliChem	141638.1211
Cloruro de amonio (NH <sub>4</sub> Cl)	Panreac AppliChem	131121
Cloruro de Sodio (NaCl)	PanReac AppliChem	141659.1211
Cóctel inhibidor de proteasa	Sigma - Aldrich	P8340
Colágeno tipo I de cola de rata	Sigma – Aldrich	C3867
Dextrano	Sigma - Aldrich	D1037
Dimetilsulfóxido (DMSO)	Sigma - Aldrich	34869
DPBS	Biowest	LO615
DPX	PanReac AppliChem	255254
Enzima TrypLE™ Select (1X), sin rojo fenol	Thermo Fisher Scientific	12563029
Etanol absoluto para UV, IR, HPLC	PanReac AppliChem	361086
Ficoll-Parque	GE Healthcare	17-1440-03
Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF)	Roche	22525322
Formaldehído 3.7-4.0 %	PanReac AppliChem	252931

Reactivo	Casa comercial	Referencia
<b>GE Healthcare Amersham™ ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent</b>	Thermo Scientific Fisher	10308449
<b>Glicerol</b>	PanReac AppliChem	131339.1211
<b>Glucógeno</b>	Sigma - Aldrich	10901393001
<b>Hematoxylin Solution, Gill No. 3 Hematoxilina</b>	Sigma - Aldrich	GHS332
<b>HyClone™ Amphotericin B (Fungiezona) Solution</b>	Thermo Scientific Fisher	11526481
<b>Hyperfilm™ ECL™</b>	Sigma - Aldrich	GE28-9068-37
<b>Kit de aislamiento de ARN total MagMAX™ -96</b>	Thermo Scientific Fisher	AM1830
<b>Kit de detección de GSH. 'GSH-Glo™ Glutathione assay'</b>	Promega	V6912
<b>Kit de proliferación celular, BrdU (colorimétrico)</b>	Sigma - Aldrich	11647229001
<b>Kit ELISA para la detección de elastasa</b>	R&D Systems	DY9167
<b>Kit ELISA para la detección de GMPc</b>	Cayman Chemical	581021
<b>Kit ELISA para la detección de IL-8</b>	R&D Systems	DY208
<b>Kit ELISA para la detección de MMP-9</b>	R&D Systems	DY911

Reactivo	Casa comercial	Referencia
Kit ELISA para la detección de TNF- $\alpha$	R&D Systems	DY210
Kit 'Lumio™ Green In-Cell Labeling'	Invitrogen	12589-057
Lipofectamine™ 2000 Transfection Reagent	Thermo Scientific	Fisher 11668030
Master polymer plus detection system (peroxidase) (incl. dab chromogen)	Master diagnóstica	MAD-000237QK
Medio Airway epithelial Cell Growth Medium	PromoCell	C-21060
Medio Dulbecco's Modified, high glucose w/l-glutamine w/o sodium pyruvate (DMEM)	Biowest	L0102-500
Medio Endothelial Cell Basal Medium-2 (EBM-2)	Lonza	H3CC-3156
Medio F-12K, 1x (Ham's F-12K Nutrient Mixture, Kaighn's Mod.) with L-glutamine	Corning	10-025-CV
Medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI)	Lonza	BE12-167F
Nonidet™ P 40 Substitute	Sigma - Aldrich	74385
1H-[1,2,4] Oxadiazolo [4,3-a] quinoxalin-1-one (ODQ)	Cayman Chemical	81410
Opti-MEM™ I Reduced Serum Medium, No Phenol Red	Thermo Scientific	Fisher 11520386

Reactivo	Casa comercial	Referencia
Parafina	Sigma - Aldrich	P3683
Penicilina/estreptomicina	Lonza	DE17-602E
Pierce™ BCA Protein Assay	Thermo Scientific Fisher	23227
Power SYBR™ Green PCR Master Mix	Thermo Scientific Fisher	4367659
Reactivo de transfección jetPRIME®	Polyplus trasnfecion	114-01
Reactivos de transcripción inversa TaqMan®	Thermo Scientific Fisher	N8080234
RNAlater™ Stabilization Solution	Thermo Scientific Fisher	AM7021
Silencer™ Negative Control No. 1 siRNA	Ambion	AM4611
siRNA GUCY1B3, siRNA ID: 119575	Ambion	AM16708
Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder	Thermo Scientific Fisher	26623
Suero fetal bovino (SFB), 500ml	Biowest	S1400
Suero fisiológico	B. Braun	190/12606059/1013
Tampón de electrophoresis (Running buffer)	BIO-RAD	161-0772
Tampón eBioscience™ Flow Cytometry Staining buffer	Thermo Fisher Scientific	00-4222-26

Reactivo	Casa comercial	Referencia
Tampón salino fosfato (PBS)	Sigma - Aldrich	P4417
TaqMan® Gene Expression Master Mix	Thermo Scientific Fisher	4369016
TMB (3,3',5,5'-tetrametilbencidina)	Sigma - Aldrich	S5814
Trans-Blot® Turbo™ Midi PVDF Transfer Packs	BIO-RAD	1704157
Trans-Blot® Turbo™ Mini PVDF Transfer Packs	BIO-RAD	1704156
TriPure® Isolation Reagent	Roche	1667157001
Triton® X 100 pure	PanReac AppliChem	142314
Tween® 20	Sigma - Aldrich	P1379
Yoduro de Propidio	Sigma - Aldrich	P4170
Xileno	PanReac AppliChem	211769.1714

Tabla 2. Marca comercial y referencia de los reactivos y kits utilizados en los ensayos.

### 3.1.4 Pacientes

El tejido pulmonar humano se obtuvo de los Servicios de Cirugía Torácica y Patología del Consorcio Hospital General Universitario de Valencia (CHGUV) (Valencia, España) y del Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia (Valencia, España). Los explantes pulmonares procedían de 3 tipos de pacientes: A) Voluntarios sanos con función pulmonar normal, empleados como controles (n=20), B) Pacientes con EPOC con diferente GOLD (n=17) y C) Pacientes asmáticos (n=2). Los datos clínicos de los pacientes se muestran en la **Tabla 3**.

	Sano (n=20)	GOLD1 (n=5)	GOLD2 (n=5)	GOLD3 + GOLD4 (n=7)	Asma (n=2)
<b>Género (Mujeres/hombres)</b>	12/8	2/3	1/4	2/5	1/1
<b>Edad (años)</b>	70 (± 11)	58 (± 8)	60 (± 10)	55 (± 4)	68 (± 3)
<b>Consumo de tabaco (paquetes año)</b>	0	243 (± 173)	177 (± 173)	118 (± 165)	0
<b>VEF1, % predicho</b>	97 (± 9)	88 (± 6)	55 (± 28)	23 (± 8)	69 (± 4)
<b>CVF, % predicho</b>	100 (± 12)	112 (± 9)	93 (± 24)	53 (± 3)	84 (± 2)
<b>VEF1/CVF</b>	80 (± 4)	59 (± 3)	57 (± 9)	42 (± 20)	68 (± 2)
<b>PaO<sub>2</sub>, mmHg</b>	174 (± 28)	163 (± 8)	114 (± 15)	42 (± 8)	81 (± 8)
<b>PaCO<sub>2</sub>, mmHg</b>	39 (± 6)	50 (± 6)	44 (± 5)	60 (± 5)	39 (± 4)

**Tabla 3. Datos clínicos de los voluntarios sanos, pacientes EPOC y pacientes asmáticos incluidos en el presente estudio.** Abreviaturas: VEF1: Volumen espiratorio forzado en un segundo; CVF: Capacidad vital forzada; PaO<sub>2</sub>: Presión arterial de oxígeno; PaCO<sub>2</sub>: Presión del dióxido de carbono en sangre arterial.

Por otro lado, la sangre fue proporcionada por los Servicios de Neumología del Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia (Valencia, España) y el Servicio de Neumología del CHGUV (Valencia, España). Las muestras se obtuvieron de 3 tipos de pacientes: A) Voluntarios sanos con función pulmonar normal, empleados como controles (n=20), B) Pacientes con EPOC (n=3) y C) Pacientes asmáticos (n=3).

Antes de comenzar el estudio, se obtuvo la aprobación por el Comité Científico Interno de la Fundación de Investigación del Hospital Clínico Universitario de Valencia – Instituto de Investigación Sanitaria INCLIVA (**Anexo 1**) además del consentimiento informado de cada uno de los participantes o representantes legales.

## 3.2 Métodos

### 3.2.1 Histología

#### 3.2.1.1 Fijación y deshidratación del tejido

El tejido pulmonar de origen humano de donantes sanos y pacientes de asma y EPOC se fijó con paraformaldehído al 3,7-4% durante 24 horas. A continuación, las muestras se incluyeron en ‘cassettes’ de inclusión, se rotularon con lápiz y se deshidrataron siguiendo los pasos mostrados en la **Tabla 4**. Una vez deshidratados, los tejidos se incorporaron en bloques de parafina utilizando el embebedor de parafina EC350-1 Myr (Leica Geosystems, Heerbrugg, Suiza). Finalmente, los bloques obtenidos se cortaron en secciones de 5 µm de grosor utilizando el microtomo HM 340 E (Leica Geosystems, Heerbrugg, Suiza) y se adhirieron a portaobjetos, dejando que se secaran a temperatura ambiente durante 48 h.

Tratamiento	Tiempo	Número de repeticiones
Paraformaldehído 3,7-4%	24 h	X1
Etanol 70%	1 h	X1
Etanol 96%	180 min	X1
Etanol 96%	90 min	X1
Etanol 100%	'Overnight'	X1
Xileno	1 h	X2
Parafina	'Overnight'	X1

Tabla 4. Protocolo de deshidratación.

### 3.2.1.2 Inmunohistoquímica

Para el análisis inmunohistoquímico de las subunidades  $\alpha_1$  y  $\beta_1$  de la GCs, las secciones de tejido se desparafinaron e hidrataron siguiendo el protocolo de la **Tabla 5**.

Tratamiento	Tiempo	Número de repeticiones
Estufa 60	15 min	X1
Xileno	10 min	X2
Etanol 100%	10 min	X1
Etanol 95%	10 min	X1
Etanol 70%	5 min	X1
Etanol 50%	5 min	X1
Agua	5 min	X1

Tabla 5. Protocolo de desparafinado e hidratación del ensayo inmunohistoquímico.

Una vez deshidratados, los portaobjetos se sumergieron en una cubeta con una solución de citrato 10 mM en un baño maría hirviendo durante 15 minutos para el desenmascaramiento antigénico. A continuación, se atemperaron las muestras y se sumergieron en una cubeta con agua mili-Q durante 5 min. Para el bloqueo de la peroxidasa endógena se usó el bloqueo del kit '*Master polymer plus detection system (peroxidase) (Incl. DAB Chromogen)*'. Posteriormente, se permeabilizó la membrana celular con tritón 100 al 0,2% en PBS a temperatura ambiente durante 10 min. Para el bloqueo de las uniones inespecíficas se usó BSA 5% en PBS que se incubó durante una hora a temperatura ambiente dentro de una cámara húmeda. A continuación, se prepararon los anticuerpos primarios que se muestran en la **Tabla 6** diluidos en 0,1% BSA/PBS y se incubaron *overnight* a 4°C. Al día siguiente, se incubó con *Master Polymer Plus HRP* 30 min a temperatura ambiente y en oscuridad. 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. Después, se sumergieron durante 1 minuto en Hematoxilina para diferenciar los componentes celulares. Tras 3 lavados se prosiguió con el protocolo de deshidratación (**Tabla 7**). Finalmente, se procedió al montaje añadiendo DPX sobre la muestra y el cubreobjetos. Los cortes marcados fueron observados mediante el microscopio Nikon Eclipse TE200 (Tokyo, Japón).

Epítopo	Origen	Referencia	Dilución
Guanilato ciclasa, subunidad $\alpha_1$	Conejo	Sigma - Aldrich (G4280)	1:1000
Guanilato ciclasa, subunidad $\beta_1$	Conejo	Sigma - Aldrich (G4405)	1:2000

Tabla 6. Anticuerpos utilizados en la inmunohistoquímica.

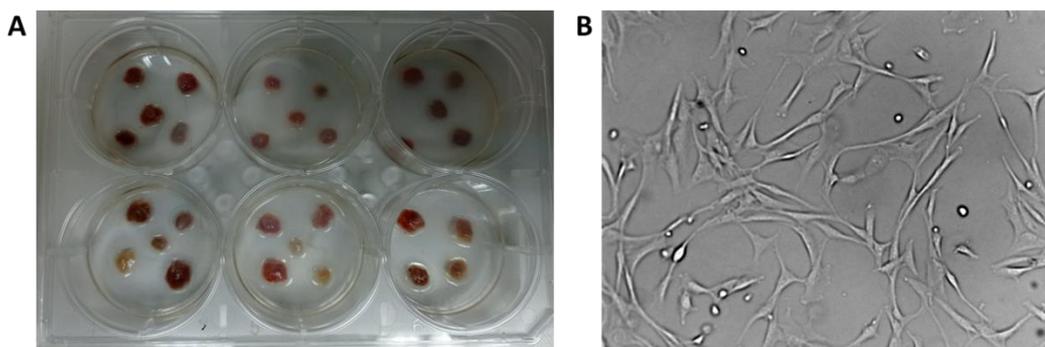
Tratamiento	Tiempo	Número de repeticiones
Etanol 90%	5 min	X2
Etanol 100%	5 min	X2
Xileno	5 min	X2

Tabla 7. Protocolo de deshidratación del ensayo inmunohistoquímico.

### 3.2.2 Cultivo celular

#### 3.2.2.1 Aislamiento y cultivo primario de fibroblastos pulmonares humanos

Los fibroblastos pulmonares humanos (FPH) se obtuvieron a partir de parénquima pulmonar de los sujetos del estudio, sanos o enfermos de EPOC. Se hicieron cortes limpios del parénquima pulmonar de unos 4 mm aproximadamente y los trozos se depositaron en placas de cultivo de 6 pocillos, a razón de 4-5 explantes por pocillo (**Figura 11**). Se incubaron las placas durante 15 minutos a temperatura ambiente para facilitar la adherencia del explante a la superficie del pocillo y, pasado este tiempo, se añadió medio DMEM suplementado con 10% de SFB y 100 U/ml de penicilina, 100 U/ml de estreptomicina y 2,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Anfotericina B. Las placas se incubaron a 37°C con 5% de  $\text{CO}_2$ . Los fibroblastos crecieron a partir de los explantes, alcanzando una confluencia adecuada tras aproximadamente 20-25 días. En este momento se quitaron los explantes del pocillo y las células se tripsinizaron y cultivaron. Para los diferentes experimentos se utilizaron cultivos celulares con pases entre 3-10.

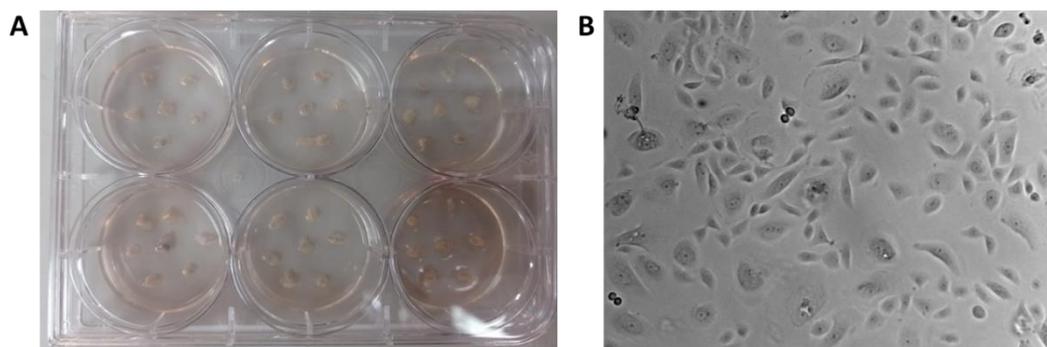


**Figura 11. Aislamiento y cultivo primario de fibroblastos pulmonares humanos (FPH).** A) Explantes de parénquima pulmonar depositados sobre la superficie de seis pocillos de una placa de cultivo celular. B) Fotografía de FPH realizada con un microscopio invertido (Nikon Eclipse TE200, Barcelona) con un objetivo de 10x.

### 3.2.2.2 Aislamiento y cultivo primario de células epiteliales de bronquio humanas

A partir de fragmentos de bronquiolo de los sujetos del estudio, tanto sanos como pacientes con EPOC, se aislaron y cultivaron células epiteliales bronquiales humanas (CEBH). En primer lugar, se aisló un fragmento de bronquiolo humano, con diámetro interno de aproximadamente 0,5-1 mm, del pulmón. Este fragmento se diseccionó de manera cuidadosa para eliminar el parénquima pulmonar y se lavó con medio de crecimiento de células epiteliales (*Airway epithelial growth medium*). Dicho medio está compuesto por medio basal para células epiteliales suplementado con: extracto de pituitaria bovina (0,004 ml/ml), factor de crecimiento epidérmico humano recombinante (10 ng/ml), insulina recombinante humana (5 µg/ml), hidrocortisona (0,5 µg/ml), epinefrina (0,5 µg/ml), triyodo-L-trionina (6,5 ng/ml), transferrina recombinante humana (10 µg/ml) y ácido retinoico (0,1 ng/ml). Al medio completo se le añadió 100 U/ml de penicilina, 100 U/ml de estreptomycin y 2,5 µg/ml Anfotericina B.

Una vez limpio el fragmento se cortó longitudinalmente y se obtuvieron explantes de aproximadamente 4 mm que se depositaron en placas de 6 pocillos tapizadas previamente con colágeno tipo I de rata al 1%, distribuyendo 5-6 explantes por pocillo (**Figura 12**). Los explantes se orientaron de forma que la capa epitelial, es decir la capa interior del bronquio, estuviese en contacto con la superficie del pocillo. Se incubaron las placas durante 15 minutos a temperatura ambiente con el fin de facilitar la adherencia del explante a la superficie colagenizada del pocillo y, pasado este tiempo, se añadió el medio epitelial completo y suplementado con antibióticos. Las placas se incubaron a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. Las CEBH crecieron alrededor de los explantes, alcanzando una confluencia adecuada tras un periodo de aproximadamente 7 a 12 días. En este momento se quitaron los explantes del pocillo y las células se tripsinizaron y cultivaron. Para los diferentes experimentos se utilizaron cultivos celulares entre los pases 3-10.

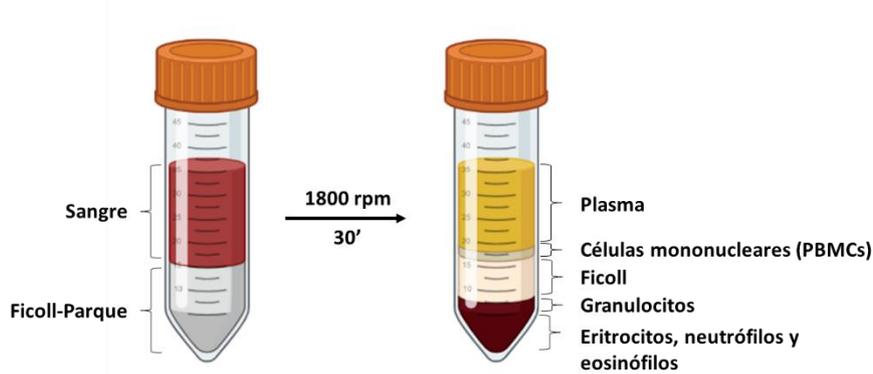


**Figura 12. Aislamiento y cultivo primario de células epiteliales de bronquio humano (CEBH).** A) Explantes de bronquio depositados sobre la superficie de seis pocillos de una placa de cultivo celular. B) Fotografía de CEBH realizada con un microscopio invertido (Nikon Eclipse TE200, Barcelona) con un objetivo de 10x.

### 3.2.2.3 Aislamiento de neutrófilos humanos de sangre periférica

Para el aislamiento de neutrófilos, la sangre periférica de los sujetos en estudio (sanos y pacientes con EPOC o ASMA) se obtuvo mediante punción venosa y empleando 2 tubos Vacutainer™ de 10 ml con EDTA (tapón violeta).

El volumen total de sangre se mezcló con Dextrano 500 al 3% en proporción 2:1 y se dejó reposar a temperatura ambiente 45 minutos. El dextrano sedimenta los eritrocitos y genera una fase superior de plasma rico en leucocitos que se aisló y se pipeteó sobre Ficoll-Parque (cuidadosamente para no mezclar las fases) en proporción 2:1. Para la separación de los elementos celulares sanguíneos por gradiente de densidad se centrifugó a 1800 rpm, 30 minutos a 4°C (**Figura 13**). Se eliminó el sobrenadante por decantación y al sedimento resultante (que contiene los neutrófilos) se añadió 5 ml de solución de lisis celular ( $\text{NH}_4\text{Cl}$  125mM,  $\text{NaHCO}_3$  2,96 mM, EDTA 3,72 mM y agua). Se dejó reposar 15 minutos en hielo y se centrifugó a 1200 rpm durante 5 minutos. En los casos en los que el sedimento seguía con un tono rojizo, se repitió el último paso de incubación con lisis celular. Posteriormente, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet con 5 ml de DPBS. Finalmente, se centrifugó a 1200 rpm durante 5 minutos, se desechó el sobrenadante y se resuspendieron los neutrófilos ya purificados en medio de cultivo DMEM suplementado con 10% de suero bovino fetal y 100 U/ml de penicilina, 100 U/ml de estreptomina y 2,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Anfotericina B.



**Figura 13. Separación de los elementos celulares sanguíneos por gradiente de densidad con Ficoll-Parque.** Imagen creada con Biorender.

El conteo del número de neutrófilos viables aislados se realizó mediante el método de exclusión del azul de tripano, que tiñe las células inviables que han perdido la integridad de la membrana plasmática, hecho que permite la identificación de las células viables y muertas a través de microscopía óptica.

Los neutrófilos se cultivaron en las diferentes placas de cultivo con medio DMEM suplementado con 10% de suero bovino fetal y 100 U/ml de penicilina, 100 U/ml de estreptomycin y 2,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Anfotericina B, y a la concentración adecuadas en cada experimento y se dejaron reposar 1 h antes de empezar cualquier procedimiento.

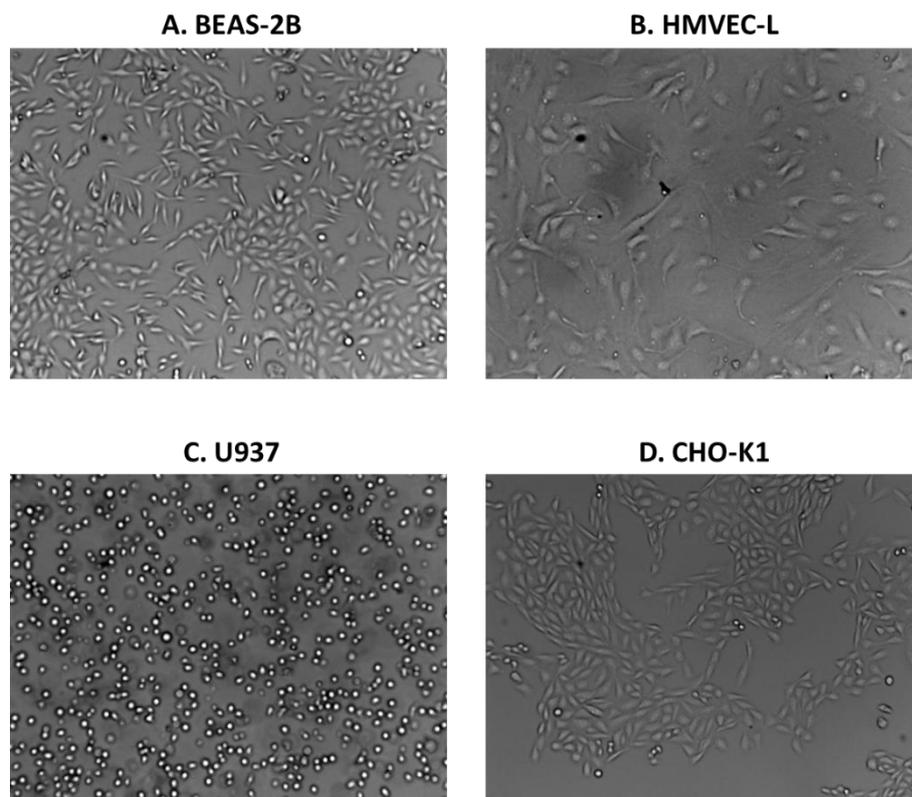
#### 3.2.2.4 Cultivo de líneas celulares inmortalizadas

En el presente trabajo se han utilizado cuatro líneas de origen comercial (**Figura 14**):

- **Línea celular primaria e inmortalizada de epitelio bronquial humano (BEAS-2B).** Fue obtenida de la 'American Type Culture Collection' (ATCC® CRL-9609™) y cultivada en placa tratada con colágeno tipo I de rata al 1% con medio 'Airway epithelial Cell Growth Medium' suplementado con 100 U/ml de Penicilina/Estreptomycin y 2,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de Anfotericina B a 37°C con 5%  $\text{CO}_2$  en aire humidificado. El medio fue reemplazado cada 48 horas.
- **Línea celular endotelial de microvasos pulmonares (HMVEC-L).** Fue suministrada por Clonetics®-Lonza (CC-2527) y cultivada con medio de crecimiento endotelial EBM-2, a 37°C con 5%  $\text{CO}_2$  en aire humidificado. El medio fue reemplazado cada 48 horas.
- **Línea celular de monocitos (U937):** Fue obtenida de la 'American Type Culture Collection' (ATCC® CRL-1593.2™) y cultivada en suspensión sobre placa con medio RPMI suplementado con 10% SFB, 100 U/ml de Penicilina/Estreptomycin

y 2,5 µg/ml de Anfotericina B a 37°C con 5% CO<sub>2</sub> en aire humidificado. El medio fue reemplazado mediante centrifugación cada 48 horas.

- **Línea celular de ovario de hámster chino (CHO-K1):** Fue suministrada por Elabscience (EP-CL-0062) y cultivada con medio F-12K suplementado con 10% SFB, 100 U/ml de Penicilina/Estreptomina y 2,5 µg/ml de Anfotericina B a 37°C con 5% CO<sub>2</sub> en aire humidificado. El medio fue reemplazado cada 48 horas.



**Figura 14. Morfología de las líneas celulares inmortalizadas.** A) Fotografía de la línea celular primaria e inmortalizada de epitelio bronquial humano (BEAS-2B). B) Fotografía de la línea celular endotelial de microvasos pulmonares (HMVEC-L). C) Fotografía de la línea celular de monocitos (U937) cultivados en suspensión. D) Fotografía de la línea celular de ovario de hámster chino (CHO-K1). Las fotografías se realizaron con un microscopio invertido (Nikon Eclipse TE200, Barcelona) con un objetivo de 10x.

### 3.2.3 Diseño experimental

#### 3.2.3.1 Preparación del extracto del humo del tabaco

El EHT se obtuvo mediante la combustión de tres cigarrillos en una bomba de respiración de animales (*Apparatus Rodent Respirator 680*; Harvard, Alemania) (**Figura 15**). Mediante esta bomba se burbujeó el humo de los cigarrillos en 25 ml de medio de cultivo RPMI precalentado a 37°C. Posteriormente el EHT se ajustó el pH a 7,4 y se filtró con un filtro con un diámetro de poro de 0,22 µm (*Millex-GS Syringe Driven Filter Unit*). Para estandarizar las preparaciones se midió la absorbancia a una longitud de onda de 320

nm, longitud de onda específica de absorción del peroxinitrito contenido en el EHT. Este EHT obtenido es considerado el 100%. El EHT obtenido a partir de estos cigarrillos se usó como estímulo en los experimentos a la concentración indicada en cada caso. El tabaco se utilizó siempre en los primeros 30 minutos de su obtención.



**Figura 15. Preparación del extracto de humo de tabaco (EHT) utilizado como estímulo en los experimentos *in vitro*.** A) Bomba de respiración de animales utilizada para generar el EHT y burbujearlo en el medio de cultivo. B) Cigarrillos de investigación 1R6F utilizados para la preparación del EHT.

### 3.2.3.2 Estimulación *in vitro*

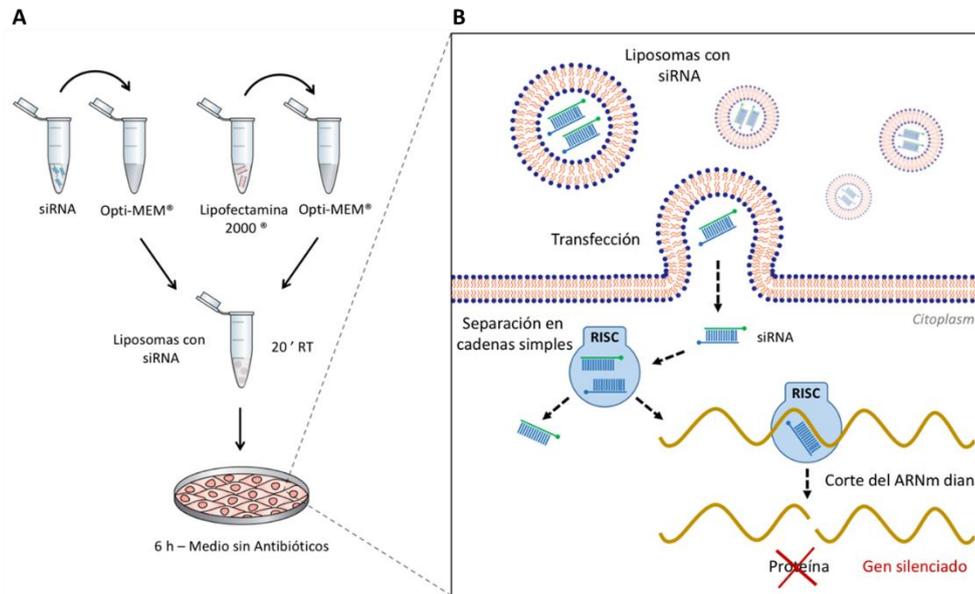
Para los estudios *in vitro*, las células fueron estimuladas con LPS, TGF- $\beta$ 1 recombinante o EHT a las concentraciones y el tiempo indicado para cada experimento. En los experimentos con FPH se les cambió el medio 24 horas antes de la estimulación a medio DMEM (con antibióticos) libre de suero, medio con el que se realizaron los experimentos.

Media hora antes del estímulo se les añadió a las células sildenafil a una concentración de 1  $\mu$ M 15 minutos, y riociguat o cinaciguat (en presencia o ausencia de sildenafil) otros 15 minutos. Las concentraciones de riociguat y cinaciguat testadas fueron 100 nM, 1  $\mu$ M y 10  $\mu$ M para ambos casos. Las soluciones madre de los fármacos que se utilizaron en los ensayos fue de 10mM, y estaban disueltos en DMSO. Las diluciones adicionales se prepararon con el vehículo utilizado para el ensayo experimental, a las dosis especificadas en cada caso. Los fármacos se dejaron junto al estímulo hasta la evaluación experimental. Roflumilast a una concentración de 1  $\mu$ M y obacunona a 100  $\mu$ M se utilizaron como control positivo cuando así se especifica.

### **3.2.4 Silenciamiento génico mediante ARN interferente**

El small interfering RNA (siRNA) o ARN de interferencia es una molécula de doble cadena de ARN de 20-25 pares de bases de longitud, complementarias a un ARN mensajero (ARNm) específico al que se unen conduciendo a su degradación y evitando la traducción de la proteína. Para ello, el siRNA se une al complejo proteico de silenciamiento-inducido por ARN (RISC) que separa las hebras del siRNA y utiliza la hebra anti-sentido como guía para reclutar la molécula del ARNm que presenta la secuencia complementaria (ARNm diana). Cuando el ARNm se une, éste se escinde inhibiendo así la traducción de la proteína correspondiente. De este modo se consigue el silenciamiento post-transcripcional de genes específicos (**Figura 16**).

Para introducir el siRNA específico de la subunidad  $\beta_1$  de la enzima GCs (GUCY1B3) y el siRNA negativo (este siRNA no se une a ningún ARNm humano y se utiliza como control negativo) se generaron liposomas capaces de fusionarse con la membrana plasmática de las CEBH y los FPH. En primer lugar, se prepararon dos soluciones: una solución con el siRNA diluido en Opti-MEM y una solución con la lipofectamina diluida en Opti-MEM. Ambas soluciones se incubaron por separado 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se mezclaron cuidadosamente ambas soluciones y se incubó otros 20 minutos a temperatura ambiente para favorecer la formación de los liposomas. Transcurrido ese tiempo se añadió la mezcla a los cultivos celulares de forma que la concentración final de los componentes fue de 50 nM de siRNA y 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de lipofectamina en medio específico de cada tipo celular libre de suero y antibióticos y se incubó a 37°C con 5% CO<sub>2</sub> en aire humidificado durante 6 horas. Pasado este tiempo se renovó el medio de cultivo y se inició el correspondiente procedimiento experimental (**Figura 16**).



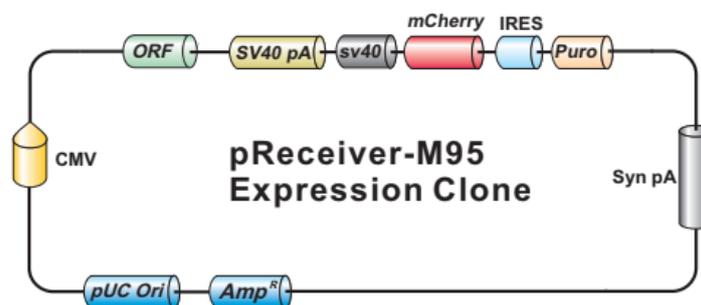
**Figura 16. Silenciamiento génico mediante ARN interferente (siRNA).** A) Esquema del protocolo utilizado para la generación de liposomas con siRNA mediante Lipofectamina 2000®. B) Esquema del mecanismo de silenciamiento. Al cultivar las células en presencia de los liposomas con el siRNA sus cubiertas lipídicas se fusionan con la membrana celular e introducen su contenido al citoplasma. Entonces el complejo proteico de silenciamiento-inducido por ARN (RISC) provoca la separación de las dos hebras del siRNA y utiliza la hebra anti-sentido como guía para seleccionar el ARNm complementario de la hebra de siRNA presente en el complejo. Finalmente, RISC promueve el corte y posterior destrucción del ARNm diana, provocando la supresión de la expresión del gen <sup>142</sup>.

### 3.2.5 Determinación del estado redox de la enzima guanilato ciclasa soluble

Para determinar el estado redox de la enzima GCs se empleó el método descrito por Hoffman et al. <sup>143</sup> con algunas modificaciones. Este método está basado en la capacidad que tiene el grupo hemo de la enzima GCs en su estado nativo para desactivar la fluorescencia del compuesto FlasH previamente unido a la enzima (efecto 'quenching'). Esta capacidad se debe a que el espectro de emisión de FlasH y el grupo hemo se solapan parcialmente, lo que provoca la transferencia de energía del reactivo FlasH al grupo hemo y por tanto el descenso de fluorescencia de FlasH. Si el grupo hemo se oxida y se libera de la enzima, se perderá el efecto 'quenching' y veremos un aumento de la fluorescencia.

Para que el grupo hemo desactive el fluoróforo FlasH, éste debe estar espacialmente cerca del grupo hemo de la GCs. El fluoróforo FlasH se une a motivos tetracisteína (TC) de las proteínas, concretamente a la secuencia de aminoácidos CCPGCC. El grupo de Hoffman et al. determinó que la mejor posición para introducir este motivo cerca del grupo hemo de la enzima y sin afectar a su actividad era el cambio de los aminoácidos aa243-248 (LQPGKC) de la subunidad  $\beta_1$  de la GCs por la secuencia (CCPGCC) <sup>143</sup>. Con el fin de introducir la proteína modificada genéticamente en las células, las secuencias de las subunidades  $\alpha_1$  (GUCY1A1 ID: NM\_001130682.2) y  $\beta_1$  (GUCY1B1 ID: NM\_000857.5) de la enzima GCs se introdujeron en un plásmido pReceiver-M95 separadas por el

péptido autocatalítico T2A. La secuencia de la subunidad  $\beta_1$  se introdujo con la modificación de los nucleótidos de las posiciones 831-879 (ID: NM\_000857.5): 5'-cagagtgtctccccagtgctgcctgggtgctgcagccttctgtctgtc- 3', correspondiente a los aminoácidos de las posiciones 243-248. Además, a este plásmido se le introdujo la secuencia de la proteína fluorescente mCherry que tiene un espectro de excitación y emisión de 587-610 nm y permite evaluar la eficacia de transfección del plásmido mediante la detección de su fluorescencia (**Figura 17**). Este plásmido se sintetizó en la empresa Tebu-bio, France.



**Figura 17. Mapa del plásmido pReceiver-M95.** El plásmido contiene la secuencia de la proteína fluorescente mCherry y en lugar del ORF se le introdujo la secuencia de la subunidad  $\alpha_1$  de la GCs y de la subunidad  $\beta_1$  de la GCs mutada (GUCY1A1-T2A-GUCY1B1(mut)). Imagen cedida por Tebu-bio.

Para la transfección del plásmido se sembraron las células CHO-K1 en pocillos de portaobjetos Ibidi de 8 pocillos (Ibidi GmbH, Alemania) a una densidad de 26.700 células/pocillo en 300  $\mu$ l de medio F-12K y se incubaron 24 horas a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> en aire humidificado. Transcurrido ese tiempo se preparó una solución que contenía 0,47  $\mu$ g/pocillo del plásmido y 1,41  $\mu$ l/pocillo de jetPRIME® (relación plásmido/jetPRIME® 1:3) diluidos en 30  $\mu$ l del tampón específico del kit de transfección jetPRIME®. Esta solución se mezcló suavemente y se incubó 15 minutos a temperatura ambiente para que se formaran los liposomas. La mezcla se añadió al pocillo de las células y se incubó 4 horas. Pasado este tiempo, se renovó el medio de cultivo y se incubaron las células 24 horas a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> en aire humidificado. Para el marcaje de la sGC con FlasH se eliminó el medio a las células y se realizó un lavado con Opti-MEM. Posteriormente se incubaron las células con el reactivo FlasH del kit 'Lumio™ Green In-Cell Labeling' a una concentración de 0,5  $\mu$ M, diluido en Opti-MEM, durante 1 hora a temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo se eliminó el medio con FlasH, se lavaron las células con Opti-MEM, se añadió el reactivo del kit 'Disperse Blue' y se procedió a la detección de la fluorescencia en un microscopio de fluorescencia Leica DMI8 para célula viva. En primer lugar, se realizó una fotografía de la fluorescencia verde basal de 10 campos de cada pocillo seleccionados aleatoriamente (filtro 488/543 nm). Posteriormente se añadió 10  $\mu$ M de ODQ o EHT a diferentes concentraciones (3%, 5% y

10%) y se incubó durante 110 minutos. En este tiempo se tomaron fotografías de la fluorescencia verde (filtro 488/543 nm) cada 10 minutos en 10 campos seleccionados previamente en cada pocillo. Las imágenes se analizaron utilizando el software Image J (disponible en <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, EE. UU).

### **3.2.6 Ensayo ELISA para la cuantificación del guanosín 3',5'-monofosfato cíclico**

Las células BEAS-2B y los FPH, se sembraron en placas de 6, en el medio apropiado y se incubaron a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> en aire humidificado hasta que alcanzaron una confluencia del 70%. Los neutrófilos aislados a partir de sangre de voluntarios sanos se sembraron en placas de 24 pocillos en medio DMEM suplementado con 10% de suero bovino fetal y 100 U/ml de penicilina, 100 U/ml de estreptomicina y 2,5 µg/ml Anfotericina B a una concentración de 10<sup>6</sup> células/pocillo y se dejaron reposar una hora antes de empezar el tratamiento.

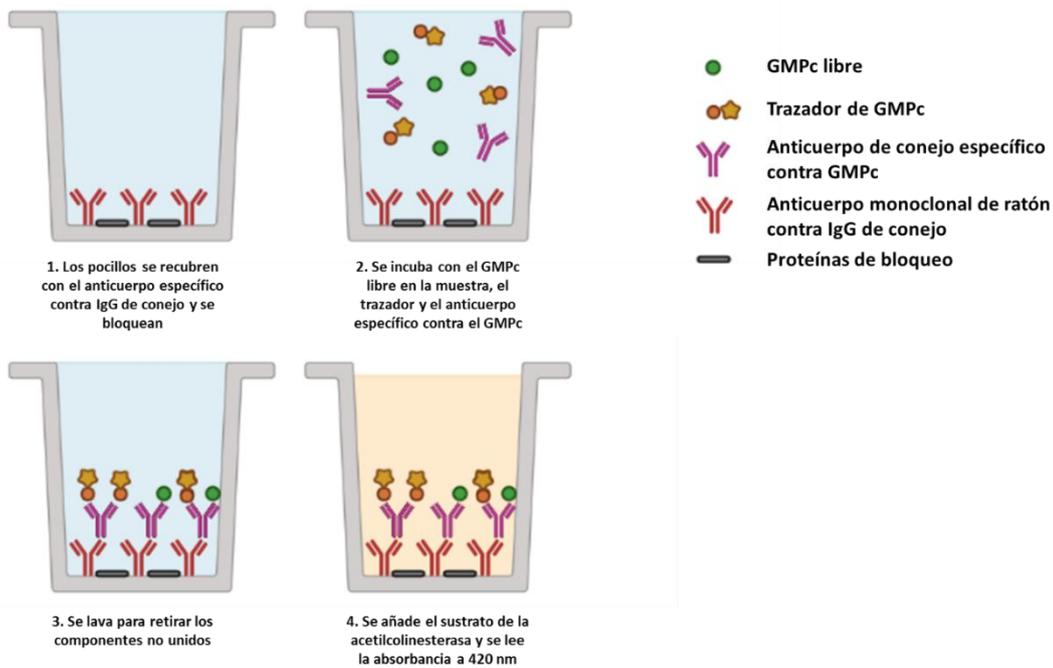
En el caso de las células CHO-K1, estas se sembraron en placas de 24 a una concentración de 53000 células/pocillo, en 300 µl de medio F-12K y se incubaron a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> en aire humidificado durante 24 horas, momento en el cual se transfectaron. Para ello se preparó una solución que contenía 0,935 µg/pocillo del plásmido y 2,805 µl/pocillo de jetPRIME® (relación plásmido/jetPRIME® 1:3) diluidos en 30 µl del tampón específico del kit de transfección jetPRIME®. Esta solución se mezcló suavemente y se incubó 15 minutos a temperatura ambiente para que se formaran los liposomas. La mezcla se añadió al pocillo de las células y se incubó 4 horas. Pasado este tiempo, se renovó el medio de cultivo y se incubaron las células 24 horas a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> en aire humidificado.

En ese momento, se pretrataron con sildenafil 1 µM durante 15 minutos, seguido por el tratamiento con diferentes concentraciones de riociguat o cinaciguat en presencia del sildenafil durante 1 hora y 24 horas (en el caso de los fibroblastos, las BEAS-2B y los neutrófilos) y 48 horas y 6 días (en el caso de de las BEAS-2B y los fibroblastos). En el caso de las CHO-K1 se pretrataron con sildenafil 1 µM durante 15 minutos, seguido por el tratamiento con diferentes concentraciones de riociguat o cinaciguat en presencia del sildenafil durante 15 minutos. Posteriormente, las células se estimularon con 10% de EHT durante 1 hora. Después del tratamiento, se procedió a lisar las células para obtener el GMPc intracelular que se determinó utilizando un kit de ELISA competitivo (Cayman Chemicals).

Para lisar las BEAS-2B se eliminó el medio de los pocillos, se añadió 0,1 M de HCl frío y se incubaron 20 minutos a 4°C. Tras centrifugar 1000 xg 10 minutos el sobrenadante se diluyó 1:2 con el tampón del kit y se procedió a realizar el inmunoensayo siguiendo el protocolo de acetilación del manual de instrucciones del fabricante. Para lisar los FPH, los neutrófilos y las CHO-K1, se retiró el medio y las células se lisaron con 65% de etanol

frío. El lisado se transfirió a tubos eppendorf y se centrifugó a 2000g 15 minutos a 4°C. El sobrenadante se transfirió a tubos nuevos y se evaporó en un concentrador al vacío. Una vez se evaporó el etanol se resuspendieron los tubos procedentes del lisado de los FPH en 250 µl del tampón del kit ELISA, los tubos procedentes del lisado de los neutrófilos en 100 µl del tampón del kit ELISA y los tubos procedentes del lisado de las células CHO-K1 en 500 µl del tampón del kit ELISA y se procedió a realizar el inmunoensayo.

El inmunoensayo para la detección de GMPc está basado en la competición del GMPc libre (proveniente de la muestra) y un GMPc conjugado a acetilcolinesterasa (GMPc trazador) por una concentración limitada de los sitios de unión de un anticuerpo de conejo específico de anti-GMPc. La concentración en el ensayo del trazador de GMPc es constante, mientras que la concentración de GMPc es variable entre las muestras, por lo que la unión del trazador al anticuerpo es inversamente proporcional a la cantidad de GMPc libre en la muestra. Este anticuerpo de conejo específico anti-GMPc se une a un anticuerpo monoclonal anti-conejo IgG que previamente está unido al pocillo. La placa se lava para eliminar los reactivos no unidos y se añade un reactivo que contiene el sustrato de la acetilcolinesterasa. El producto enzimático de esta reacción tiene un color amarillo. Por lo que, tras medir la absorbancia a 420 nm mediante un espectofotómetro 'Victor 1420 Multilabel Counter' (Perkin Elmer) se obtuvo para cada muestra una señal directamente proporcional a la cantidad de trazador de GMPc unido y, por tanto, inversamente proporcional a la cantidad de GMPc presente en la muestra (**Figura 18**) Los resultados se extrapolaron a partir de la curva de los estándares del kit. En el caso de las células BEAS-2B, los FPH y los neutrófilos, con el fin de normalizar los resultados obtenidos, los resultados se expresaron como la ratio entre la concentración de GMPc obtenida para cada condición y la concentración de GMPc obtenida en las células control de cada uno de los experimentos. En el caso de las células CHO-K1 los resultados se expresan como la concentración de GMPc obtenida para cada condición.



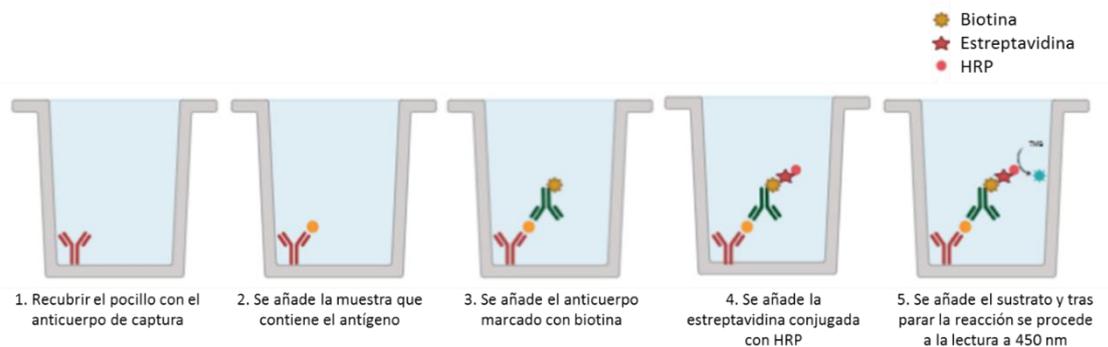
**Figura 18. Esquema del ensayo ELISA para la detección de guanosín 3,5-monofosfato cíclico (GMPc).** 1) Los pocillos están recubiertos con anticuerpo monoclonal de ratón específico contra el IgG de conejo y bloqueados con proteínas que evitan la unión inespecífica de los componentes de la muestra al pocillo. 2) Se incuba en cada pocillo la muestra correspondiente, el trazador de GMPc conjugado a la acetilcolinesterasa y el anticuerpo de conejo específico contra el GMPc. 3) Se lava para retirar los componentes no unidos. 4) Se añade el sustrato de la acetilcolinesterasa que al reaccionar genera un sustrato amarillo y se lee la absorbancia a 420 nm. La señal obtenida será inversamente proporcional a la cantidad de GMPc de la muestra. Imagen creada con Biorender.

### 3.2.7 Ensayo ELISA de IL-8, MMP-9, elastasa y TNF- $\alpha$

Los neutrófilos aislados a partir de sangre de voluntarios sanos y pacientes de asma y EPOC se pretrataron con sildenafilo 1  $\mu$ M durante 15 minutos, seguido por el tratamiento con diferentes concentraciones de riociguat o cinaciguat en presencia o ausencia del sildenafilo otros 15 minutos. Posteriormente, se estimularon con 1  $\mu$ g/ml de LPS o 3% EHT durante 24 horas en presencia o ausencia de los fármacos y se midieron en el sobrenadante las citoquinas IL-8, MMP-9, elastasa y TNF- $\alpha$ , utilizando kits comerciales ELISA DuoSet<sup>®</sup> de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

A modo resumen, estos kits se basan en la técnica del ELISA 'sandwich', en el que en primer lugar se recubre el pocillo con un anticuerpo anti-antígeno. En segundo lugar, se añade la muestra que se quiere analizar y el antígeno presente en la misma será retenido al pocillo por el primer anticuerpo. Posteriormente, se añade el anticuerpo de detección anti-antígeno marcado con biotina y estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano (HRP), que se unirá a la biotina de los anticuerpos secundarios. Finalmente, al añadir el sustrato TMB, éste es convertido por la HRP en una señal cromogénica proporcional a la cantidad de antígeno. Tras parar la reacción, se mide la absorbancia a 450 nm mediante

un espectrofotómetro 'Victor 1420 Multilabel Counter' (Perkin Elmer) (**Figura 19**). Los resultados fueron extrapolados a partir de la curva de los estándares de cada kit.

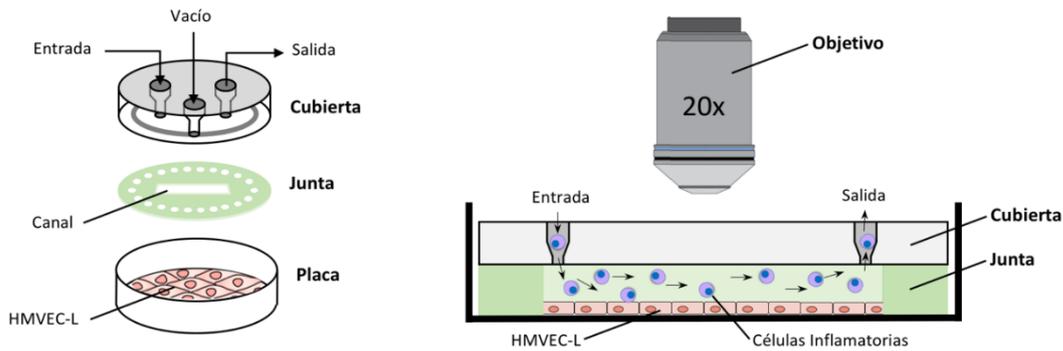


**Figura 19. Esquema de la técnica ELISA para la cuantificación de IL-8, MMP-9, elastasa y TNF- $\alpha$ .** 1) Se recubre el pocillo con el anticuerpo de captura y se bloquea la placa con BSA para evitar la unión específica de los componentes de la muestra al pocillo. 2) Se incuba la muestra que contiene el antígeno. 3) Se incuba con el anticuerpo marcado con biotina. 4) Se incuba con la estreptavidina (que se unirá a la biotina) conjugada con HRP. 5) Se añade el sustrato (TMB) y tras parar la reacción se lee la absorbancia a 450 nm. Imagen creada con Biorender.

### 3.2.8 Flow Chamber

Mediante la técnica 'Flow Chamber' se puede cuantificar la adhesión de células inflamatorias a un sustrato celular. El sistema mimetiza el interior de los vasos sanguíneos, haciendo pasar un flujo dinámico de células en suspensión, sobre una monocapa de células endoteliales.

La 'Flow Chamber' consiste principalmente en una cámara de flujo constituida por una placa de 35 mm que contiene la monocapa de las células endoteliales y que funciona como base, una junta de silicona intermedia con un canal rectangular (GlycoTech, EEUU) y la cubierta de la cámara de flujo (GlycoTeche, EEUU). La junta de silicona está intercalada entre la placa de las células y la cubierta, de modo que se forma un espacio cerrado por donde se genera un flujo de células. Dicho espacio mide 0,0254 cm de espesor, 0,5 cm de ancho y 2 cm de largo. La cubierta posee tres orificios, dos de ellos dispuestos en línea con una separación de 2 cm por donde entrarán y saldrán las células, y un tercer orificio que se conectará a una bomba de vacío que presuriza la cámara (**Figura 20**).



**Figura 20. Componentes y montaje de la 'Flow Chamber'.** En la figura de la izquierda se muestra un esquema de los componentes que forman la cámara, así como su disposición. En la figura de la derecha se muestra el espacio generado al montar la 'Flow Chamber'. La base está formada por una monocapa de células endoteliales por la que pasa un flujo laminar con las células inflamatorias en suspensión. La adhesión celular se visualiza mediante un microscopio directo o invertido con el eje de visión perpendicular a la placa <sup>142</sup>.

En primer lugar, se sembraron las células endoteliales HMVEC-L en placas de cultivo de 35 mm (tapizadas previamente con colágeno tipo I de rata al 1%) en medio EBM-2 y se incubaron a 37°C con 5% CO<sub>2</sub> en aire humidificado, hasta que se observó una monocapa. En ese momento las células se trataron 15 minutos con sildenafil 1 μM, seguido de 15 minutos con riociguat o cinaciguat (en presencia o ausencia de sildenafil) y se estimularon 1 hora con EHT al 5%.

Por otro lado, se preparó una suspensión celular de monocitos U937 a 5x10<sup>5</sup> células/ml en medio de cultivo RPMI suplementado con 10% de SFB, 100 U/ml de penicilina, 100 U/ml de estreptomina y 2,5 μg/ml Anfotericina B. Para cada placa de HMVEC-L se utilizó una Jeringa BD Emerald estéril de 10 ml con 3 ml de esta suspensión celular y se ajustó en el 'Programmable Syringe Pump' (Harvard Apparatus) (**Figura 21**), que presiona el émbolo para mantener un flujo constante programado. La 'Flow Chamber' se colocó en un soporte calefactor de placas (Harvard Apparatus) para mantener la temperatura constante de 37°C. Por último, mediante tubos de silicona se conectaron, el orificio de entrada de la 'Flow Chamber' a la jeringa con la suspensión celular de monocitos, el de salida a un contenedor y el orificio de vacío de la cubierta a una bomba de vacío (Harvard Apparatus).

Para calcular el flujo volumétrico de la suspensión celular de monocitos se tuvo en cuenta que el estrés de rozamiento provocado sobre la monocapa de endotelio permaneciera dentro de rangos fisiológicos. Para ello se aplicó la siguiente fórmula:

$$\tau_w = \mu\gamma = 6\mu Q/a^2b$$

Donde:

$$\tau_w = \text{Estrés de rozamiento deseado} = 0,5 \text{ dynes/cm}^2.$$

$\mu$  = viscosidad aparente (para H<sub>2</sub>O a 37°C= 0,0076 P)

$\gamma$  = ratio de rozamiento, 1/seg

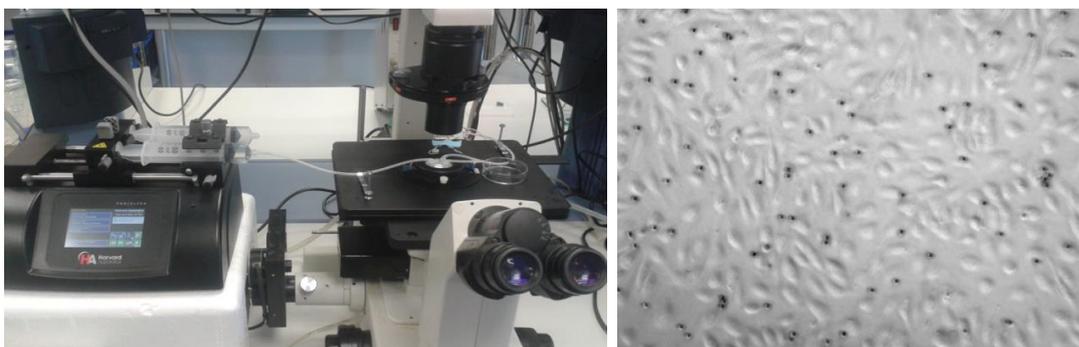
a = grosor del espacio, 0,0250 cm

b = anchura del espacio, 0,5 cm

Q = Flujo volumétrico, ml/seg

Por tanto, el flujo volumétrico que se generó fue de  $1,75 \times 10^{-3}$  ml/s = 0,1 ml/min.

Para poder observar y valorar la adhesión de los monocitos se empleó un microscopio invertido (Nikon Eclipse TE200, Barcelona) con un objetivo de 20x y se ajustó el campo y el enfoque para contrastar las células en suspensión con la monocapa de las células endoteliales. La perfusión de células con un flujo de 0,1 ml/min duró 6 minutos. En el último minuto se hicieron tomas de varios segundos sobre cinco regiones del canal diferentes con una cámara de vídeo adaptada y conectada al 'software' Metafluor (**Figura 21**). Posteriormente, se realizó el conteo utilizando el 'software' Metamorph.



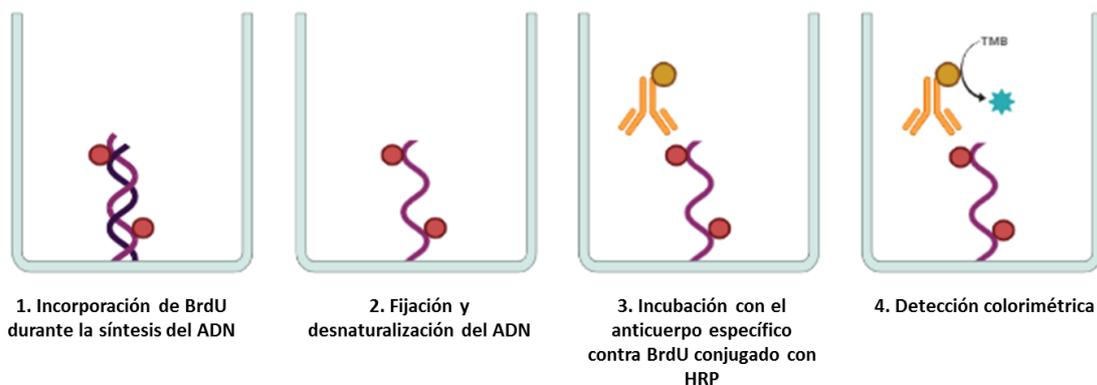
**Figura 21. Sistema de perfusión y visualización del sistema 'Flow Chamber'.** En la imagen de la izquierda se observa la jeringa, que contiene la suspensión de las células inflamatorias U937, acoplada a la 'Programmable Syringe Pump' y conectada a la cámara de flujo. La cámara de flujo está colocada en una placa calefactora en la platina de un microscopio invertido. La imagen de la derecha es un fotograma de la adhesión de monocitos U937 (esferas negras) a células endoteliales.

### **3.2.9 Ensayo de proliferación**

La proliferación de los FPH se midió mediante inmunoensayo colorimétrico basado en la incorporación de la bromodesoxiuridina (BrdU), un análogo de la timidina que es incorporado por la célula durante la síntesis de ADN y que se detecta mediante el kit de detección de BrdU basado en la técnica ELISA, de acuerdo con el protocolo del fabricante (**Figura 22**).

Las células se cultivaron en placas de 96 pocillos en 200  $\mu$ l de medio DMEM suplementado con 10% de SFB, 100 U/ml de Penicilina/Estreptomicina y 2,5  $\mu$ g/ml de Anfotericina B y se incubaron 24 horas a 37°C en un incubador con 5% CO<sub>2</sub>. Cuando las células alcanzaron una confluencia del 40% se les cambió el medio a DMEM sin SFB (con antibióticos) y se incubaron 24 horas. Transcurrido ese tiempo los FPH se trataron con

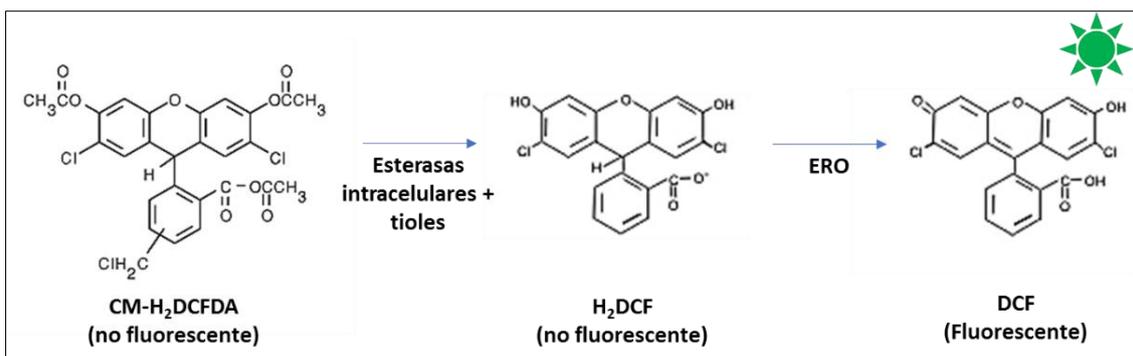
sildenafil 1  $\mu\text{M}$  15 minutos y distintas concentraciones de riociguat o cinaciguat (en presencia o ausencia de sildenafil) otros 15 minutos. Posteriormente, se estimuló la proliferación con 5 ng/ml de TGF- $\beta$ 1 durante 48 horas. Cuando faltaban 24 horas de estímulo se añadió BrdU a los fibroblastos. En estas últimas 24 horas de estímulo con TGF- $\beta$ 1, BrdU se incorporó en el lugar de la timidina en las células proliferativas. Transcurrido el tiempo de estímulo, las células se fijaron y el ADN se desnaturalizó con el reactivo 'FixDenat' durante 45 minutos. Las células se incubaron con el anticuerpo de ratón anti-BrdU conjugado con HRP durante 2 horas. Finalmente, se añadió TMB, que es transformado por la HRP en una señal cromogénica proporcional a la cantidad de antígeno (BrdU) de la muestra. Tras parar la reacción, se midió la absorbancia a 490 nm utilizando un espectrofotómetro Victor 1420 'Multilabel Conuter' (Perkin Elmer).



**Figura 22. Esquema del ensayo de proliferación basado en la incorporación de bromodesoxiuridina (BrdU).** 1) Durante la síntesis del ADN, se incorpora BrdU, un análogo de la timidina. 2) Se fija y se desnaturaliza el ADN. 3) Se incubaba con el anticuerpo de ratón específico contra BrdU conjugado con HRP. 4) Se añade TMB y tras parar la reacción se lee la absorbancia a 490 nm. La absorbancia es proporcional a la cantidad de BrdU incorporado y puede correlacionarse con la proliferación celular. Imagen creada con Biorender.

### 3.2.10 Medida de la producción intracelular de especies reactivas de oxígeno

El compuesto 6-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, acetyl ester (CM-H<sub>2</sub>DCFDA) es un derivado clorometílico de H<sub>2</sub>DCFDA, que resulta útil como indicador de ERO en células. Este indicador entra en las células y se expande pasivamente. Las esterasas intracelulares escinden los grupos de acetato y su grupo de clorometilo reactivo al tiol reacciona con el glutatión y otros tioles. Si hay ERO como O<sub>2</sub><sup>-</sup> y el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), sufre un proceso combinado de hidrólisis y oxidación dando lugar al compuesto fluorescente 2',7'-diclorofluoresceína (DCF) que puede ser detectado por citometría (**Figura 23**).



**Figura 23.** Generación de 2',7'-diclorofluoresceína (DCF) (fluorescente) a partir del 6-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, acetyl ester (CM-H<sub>2</sub>DCFDA) (no fluorescente) en presencia de especies reactivas de oxígeno (ERO). Imagen creada con PowerPoint.

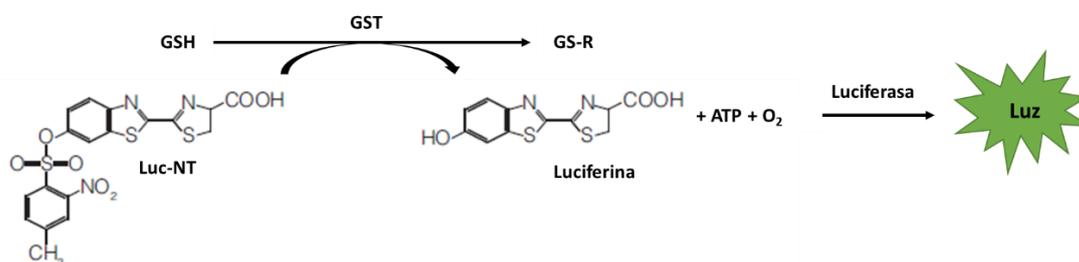
Las CEBH y los FPH se cultivaron en placas de 6 pocillos con el medio correspondiente a 37°C en un incubador con 5% CO<sub>2</sub>. Cuando las células alcanzaron una confluencia del 70% se trataron con sildenafilo 1 μM 15 minutos y con diferentes concentraciones de riociguat o cinaciguat (en presencia o ausencia de sildenafilo) durante 24 horas y 6 días (en este caso cambiando el medio con los fármacos cada 48 horas). Transcurrido ese tiempo se estimularon 1 hora con 5% de EHT en el caso de las CEBH y 10% de EHT en el caso de los fibroblastos.

Tras la estimulación las células se levantaron con 500 μl de acutasa durante 5 minutos a 37°C en un incubador con 5% CO<sub>2</sub> y se transfirieron a tubos eppendorf. Las células se centrifugaron a 1200 rpm 5 minutos y se retiró el sobrenadante. Se añadió a las células el compuesto 5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, acetyl ester (CM-H<sub>2</sub>DCFDA) diluido en tampón de 'eBioscience™ Flow Cytometry Staining' a una concentración de 3 μM y se incubaron 30 minutos 37°C en un incubador con 5% CO<sub>2</sub>. Cuando terminó el periodo de incubación de la sonda las células se centrifugaron a 1200 rpm 5 minutos, se retiró el sobrenadante y se resuspendieron en 400 μl de tampón de 'eBioscience™ Flow Cytometry Staining'. Se añadió a cada tubo 2 μl de yoduro de propidio (1mg/ml) y se procedió al análisis de la fluorescencia con el citómetro Verse.

### 3.2.11 Determinación de glutatión

Las CEBH y los FPH se cultivaron en placas de 96 pocillos negras en el medio correspondiente y se incubaron a 37°C en un incubador con 5% CO<sub>2</sub>. Cuando las células alcanzaron una confluencia del 80% se incubaron con sildenafilo 1 μM 15 minutos, seguido de diferentes concentraciones de riociguat o cinaciguat (en presencia o ausencia de sildenafilo) durante 24 horas. Transcurrido ese tiempo se estimularon con 10% de EHT los FPH y con 5% de EHT las CEBH durante 1 hora. Tras la estimulación, se procedió a realizar la cuantificación de glutatión (GSH) mediante el kit 'GSH-Glo™ Glutathione Assay' siguiendo las instrucciones del fabricante. Este kit está basado en la

conversión de un derivado de la luciferina a luciferina en presencia de glutatión, catalizado por la enzima glutatión S-transferasa. La señal de luciferina detectada por bioluminiscencia es proporcional a la cantidad de GSH presente en la muestra (**Figura 24**). Una vez pasado el tiempo de estimulación, se retiró el medio de la placa y se incubaron las células 30 minutos con el reactivo del kit que contiene el derivado de la luciferina y la enzima glutatión S-transferasa. Posteriormente, se añadió el reactivo de detección de la luciferina y se incubó durante 15 minutos más. Finalmente, se midió la luminiscencia con el luminómetro (LUMIstar Omega, BMG Labtech). La concentración de GSH se extrapola a partir de la curva estándar del kit.



**Figura 24. Reacción de conversión de un derivado de la luciferina a luciferina en presencia de glutatión (GSH) por la enzima GSH S-transferasa.** En presencia de GSH, la enzima GSH S-transferasa transforma un derivado de la luciferina en luciferina. La luciferina en presencia de la luciferasa emite bioluminiscencia que es detectada con un luminómetro. La cantidad de luz detectada es proporcional a la cantidad de glutatión de la muestra. Imagen creada con PowerPoint.

### 3.2.12 Análisis de la expresión génica

#### 3.2.12.1 Extracción de ARN y cuantificación

Para la detección de la variación en la expresión génica en tejido pulmonar de sano y EPOC y en cultivos celulares se utilizó la técnica de la PCR a tiempo real.

El tejido pulmonar, que estaba almacenado con RNAlater a -20°C, se homogenizó con el equipo TissueLyser II (Qiagen®) en presencia de 500 µl de TriPure®. El sobrenadante se pasó a tubos eppendorf a los que se les añadió 100 µl de cloroformo. Tras mezclar bien con el vortex, se centrifugó (12000 rpm, 4°C, 15 min) de tal manera que se obtuvieron dos fases: una fase acuosa que contenía el ARN y otra orgánica que contenía el ADN y proteínas. Se recogió la fase acuosa, se añadieron 250 µl de alcohol isopropílico y 1 µl de glucógeno para precipitar el ARN y se incubó a -80°C hasta el día siguiente. Tras centrifugar (12000 rpm, 4°C, 10 min) se descartó el sobrenadante y se hizo un lavado con alcohol 75% 1 hora a 4°C. Las muestras se volvieron a centrifugar (7500 rpm, 4°C, 5 min), se descartó el sobrenadante y se incubaron a 37°C durante 30 min para evaporar los restos de etanol. El pellet se resuspendió con 20 µl de agua DEPC y se mantuvo a 65°C durante 5 minutos para ayudar a disolver el ARN en el agua.

Para determinar los cambios *in vitro* en la expresión génica, las CEBH y los FPH se cultivaron en placas de 6 pocillos con el medio correspondiente a 37°C en un incubador con 5% CO<sub>2</sub>. Cuando las células alcanzaron una confluencia del 70% se trataron con sildenafilo 1 µM 15 minutos y con diferentes concentraciones de riociguat o cinaciguat (en presencia o ausencia de sildenafilo) durante 15 minutos más, seguido de la incubación con el estímulo indicado 24 horas y 48 horas. El ARN total de las células se purificó utilizando el extractor automático KingFisher Duo Prime (Thermo Scientific) con el kit de extracción MagMAX™-96 Total RNA Isolation Kit (Applied Biosystems™) siguiendo las instrucciones del fabricante.

La cuantificación del ARN fue realizada mediante un espectrofotómetro NanoDrop 2000C (Thermo Fisher Scientific), con el fin de medir la absorbancia a una longitud de onda de 260 nm. Por otro lado, también se comprobó si la pureza del ADN extraído era alta, mediante la relación Absorbancia a 260nm (A<sub>260</sub>)/Absorbancia a 280 nm, siendo válida si estaba comprendida entre 1,7 y 2.

El ARN se almacenó a -80°C hasta su uso.

### 3.2.12.2 Transcripción reversa

Con el ARN obtenido, se realizó la transcripción reversa (RT). Mediante esta técnica, la enzima transcriptasa reversa sintetiza ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc) a partir del ARNm que utiliza como molde. Este paso es necesario para realizar la cuantificación de la expresión génica mediante la PCR a tiempo real.

La RT se realizó en 300 ng del ARN total con los reactivos de retrotranscripción reversa de TaqMan® siguiendo el protocolo del fabricante. Los reactivos de la reacción se muestran en la **Tabla 8**:

Componente de la reacción	Volumen (µl)
Tampón 10X RT	2
25 mM MgCl <sub>2</sub>	1,4
10 mM dNTP mix (2,5 mM cada uno)	4
RNase Inhibitor (20 U / µl)	1
MultiScribe™ RT (50 U / µl)	1
50 µM Random hexamers	1
ARN	Depende de la concentración de la muestra. Concentración final 300 ng/µl
Agua DEPC	Hasta 20 µl

Tabla 8. Componentes de la reacción de retrotranscripción reversa.

La RT se realizó en el termociclador Veriti™ 96-Well Fast Thermal Cycler (Applied Biosystems; Thermo Fisher Scientific; Waltham, EE.UU.).

Los pasos de la transcripción del ARN a ADNc son los siguientes:

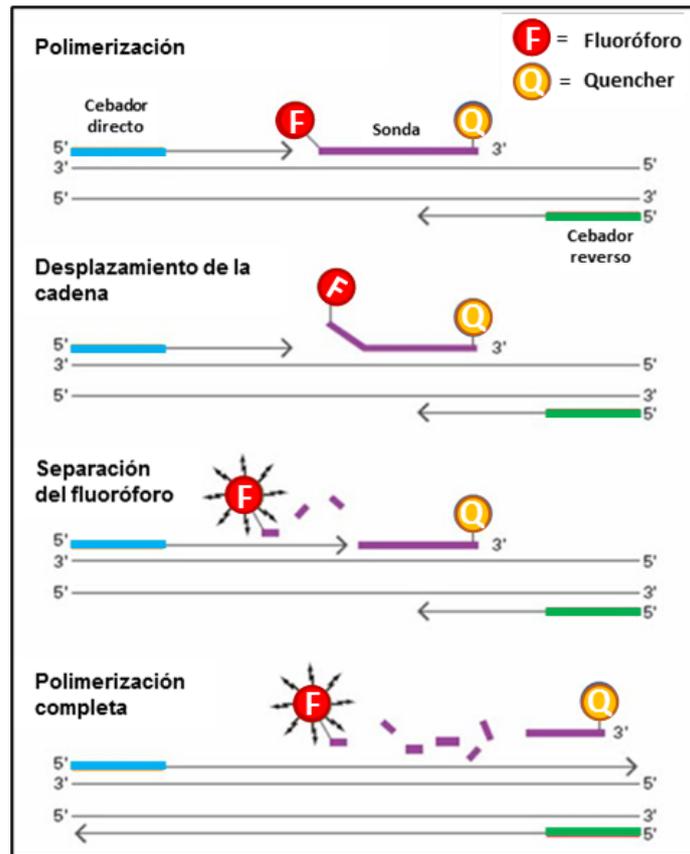
- 10 minutos a 25°C: Hibridación de los cebadores al ARN.
- 30 minutos a 42°C: Temperatura óptima para la acción de la retrotranscriptasa reversa.
- 5 minutos a 95°C: Inactivación de la retrotranscriptasa reversa.

Los ADNc obtenidos se almacenaron a -20°C hasta su uso.

### 3.2.12.3 PCR a tiempo real

La técnica de PCR ('Polimerase Chain Reaction') permite la síntesis exponencial *in vitro* de ADN a partir de un fragmento de ADN que actúa como molde y dos oligonucleótidos que actúan como cebadores. La técnica de PCR a tiempo real o PCR cuantitativa (qPCR) está basada en la PCR convencional con la diferencia de que permite detectar la cantidad de producto de amplificación a medida que los ciclos de reacción van realizándose (de ahí su denominación de tiempo real). Se basa en el mismo principio y componentes que la PCR convencional, con la diferencia de que incorpora un componente fluorescente (fluorocromo) a la mezcla de amplificación, bien sea unido a sondas específicas o bien en forma de algún compuesto intercalante inespecífico.

La qPCR para medir la expresión de la mayoría de los genes de interés se realizó con los reactivos 'Taqman® Gene Expression Master Mix', en un termociclador QuantStudio 5 (Applied Biosystems). Los reactivos TaqMan® utilizan una sonda fluorogénica complementaria a una región del gen de interés, con un fluoróforo unido covalentemente al extremo 5' y un 'quencher' en el extremo 3'. A medida que la enzima Taq DNA polimerasa sintetiza la cadena en sentido 5'-3', la actividad exonucleasa 5'-3' de la misma degrada la sonda TaqMan® ya hibridada al ADN<sup>144</sup>. La degradación de la sonda produce la separación del 'quencher' y fluoróforo, emitiéndose fluorescencia que es captada por el equipo (**Figura 25**).



**Figura 25. Funcionamiento de las sondas Taqman®.** Los cebadores de la PCR y la sonda fluorogénica hibridan con la región del gen complementaria. La sonda contiene un fluoróforo unido covalentemente al extremo 5' y un 'quencher' al extremo 3'. Cuando la enzima Taq DNA polimerasa sintetiza la cadena del ADN complementaria, su actividad exonucleasa 5'-3' degrada la sonda TaqMan® ya hibridada al ADN. La degradación de la sonda produce la separación del 'quencher' y fluoróforo. La fluorescencia emitida es captada por el equipo. Imagen creada con PowerPoint.

Los componentes de la reacción se muestran en la **Tabla 9**:

Component	Volume (µl)
ADNc (5 ng/µl)	2
Taqman® Gene Expression Master Mix	2,5
Mix de cebadores y sonda Taqman	0,25
Agua DEPC	0,25

**Tabla 9. Componentes de la reacción de PCR a tiempo real con los reactivos Taqman®.**

El perfil térmico de la qPCR con sondas Taqman® fue el siguiente:

1 ciclo de:

- 2 minutos a 50°C: Activación de la polimerasa.

- 10 minutos a 95°C: Desnaturalización inicial del ADNc.

40 ciclos de:

- 15 segundos a 95°C: Desnaturalización del ADNc.
- 1 minuto a 60°C: Alineamiento de los cebadores y la sonda y extensión. Lectura de fluorescencia.

La referencia de la mezcla de cebadores y sondas utilizadas para la detección mediante Taqman® se muestran en la **Tabla 10**:

Gen	Símbolo del gen	Referencia
NADPH Oxidasa 4	NOX4	Hs01379108_m1
Colágeno tipo I	COL1A1	Hs00164004_m1
Fibronectina	FN1	Hs01549976_m1
Factor de crecimiento transformador-beta 1	TGF-β1	
Factor de crecimiento de tejido conectivo	CTGF	Hs00170014_m1
Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa	GAPDH	4310884E

**Tabla 10.** Mezcla de cebadores y sonda utilizados para la detección de cada gen.

La qPCR de para la detección de la expresión génica del resto de genes se realizó también en un termociclador QuantStudio 5 (Applied Biosystems), pero con los reactivos 'Power SYBR™ Green PCR Master Mix'. El SYBR Green es un compuesto que se introduce en la estructura de doble hélice del ADN, acoplándose energéticamente a sus ácidos nucleicos, de forma que se incrementa de manera notable su tasa de emisión de fluorescencia. Durante la qPCR, a medida que se producen las copias de ADN, se une el SYBR™ a las mismas aumentando la intensidad de fluorescencia de manera proporcional al producto de PCR producido.

Los componentes de la reacción se muestran en la siguiente **Tabla 11**:

Componente	Volumen ( $\mu$ l)
ADNc (5 ng/ $\mu$ l)	2
Power SYBR™ PCR Master Mix	2,5
Cebador directo	0,125
Cebador reverso	0,125
Agua DEPC	0,25

Tabla 11. Componentes de la reacción de PCR a tiempo real con los reactivos de SYBR™.

El perfil térmico de la qPCR con SYBR™ Green fue el mismo que el utilizado con los reactivos Taqman®, con la adición de un ciclo final para el cálculo de la temperatura de melting ( $T_m$ ):

1 ciclo de:

- 2 minutos a 50°C: Activación de la polimerasa
- 10 minutos a 95°C: Desnaturalización inicial del ADNc.

40 ciclos de:

- 15 segundos a 95°C: Desnaturalización del ADNc.
- 1 minuto a 60°C: Alineamiento de los cebadores y extensión. Lectura de fluorescencia.

1 ciclo para el cálculo de la  $T_m$ :

- 15 segundos a 95°C
- 1 minuto a 60°C
- 15 segundos a 95°C: Lectura de fluorescencia.

La secuencia de los cebadores utilizados para la detección mediante SYBR™ Green se muestran en la **Tabla 12**:

Gen	Símbolo del gen	Cebador directo	Cebador reverso
Alfa actinina	$\alpha$ -SMA	5'-TTTCCGCTGCCCAGAGAC-3'	5'-GTCAATATCACACTTCATGATGCTGT-3'
Guanilato ciclasa, subunidad $\alpha_1$	GUCY1A1	5'-AAATCAATGTCAGCCCAACA-3'	5'-AAACACGAAACCAGGACAGTC-3'

<b>Guanilato ciclasa, subunidad <math>\beta_1</math></b>	GUCY1B1	5'- GCCAGGTTCAAGTAGATGGTG- 3'	5'-GGCATCCGCTGTCCTATG-3'
--	---------	-------------------------------------	--------------------------

Tabla 12. Secuencia de los cebadores utilizados para la detección de los genes de interés mediante PCR a tiempo real con los reactivos SYBR™.

A partir de los datos de fluorescencia registrados (tanto con los reactivos SYBR™ Green como Taqman®) se obtuvieron curvas de amplificación en las que se representa el logaritmo de la intensidad de fluorescencia frente al número de ciclos transcurridos (Figura 26).

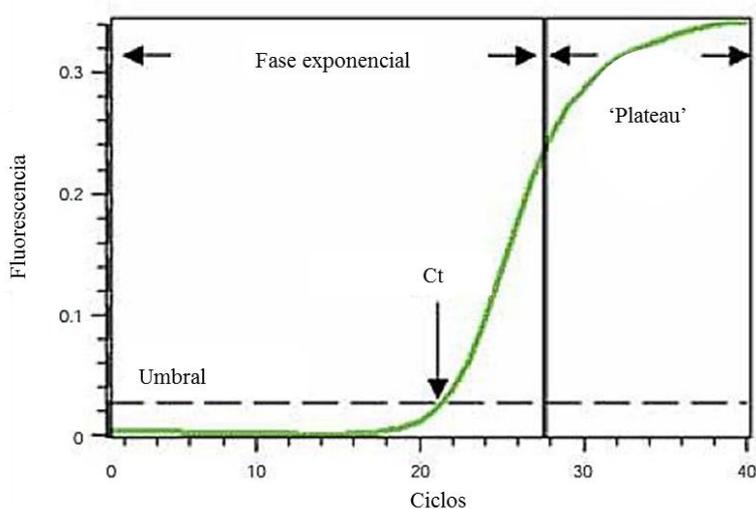


Figura 26. Curva obtenida mediante PCR a tiempo real. 1) En la fase inicial, no hay acumulación del producto de PCR. 2) La fase exponencial en la que la fluorescencia aumenta a medida que se forma más producto de amplificación. 3) En la última fase, denominada fase de meseta (o 'plateau'), no se distinguen cambios en la fluorescencia debido al agotamiento de los reactivos. Imagen modificada a partir de la obtenida en la página de Bio-Rad <sup>145</sup>.

Para medir la expresión de un determinado gen se utilizó el ciclo umbral (Ct), ciclo en el que se alcanza el nivel prefijado de fluorescencia. Cuantas más copias del gen de interés haya en el ARN de partida, más ADNc se obtendrá en la retrotranscripción reversa. Por tanto, al ser una amplificación exponencial, antes se llegará al umbral de fluorescencia y por tanto más bajo será el Ct.

La cuantificación relativa de los distintos genes se realizó comparando el Ct obtenido de cada muestra con el del control endógeno GAPDH. En primer lugar, se calculó el valor medio de Ct de las réplicas para cada muestra (desviación estándar  $\leq 1$ ). A continuación, se calculó el nivel de expresión génica como la diferencia ( $\Delta$ Ct) entre el valor Ct del gen

de interés y el valor Ct del control endógeno. Los cambios en la expresión de los niveles de ARNm del gen de interés se designaron como  $2^{-\Delta Ct}$ .

### **3.2.13 Análisis de la expresión proteica mediante Western Blot**

La técnica Western Blot permite detectar y cuantificar una determinada proteína en una mezcla compleja de proteínas. En el presente trabajo se utilizó tanto para la detección de cambios en la expresión proteica en tejido pulmonar de individuos sanos y enfermos de EPOC, como en ensayos con cultivos celulares.

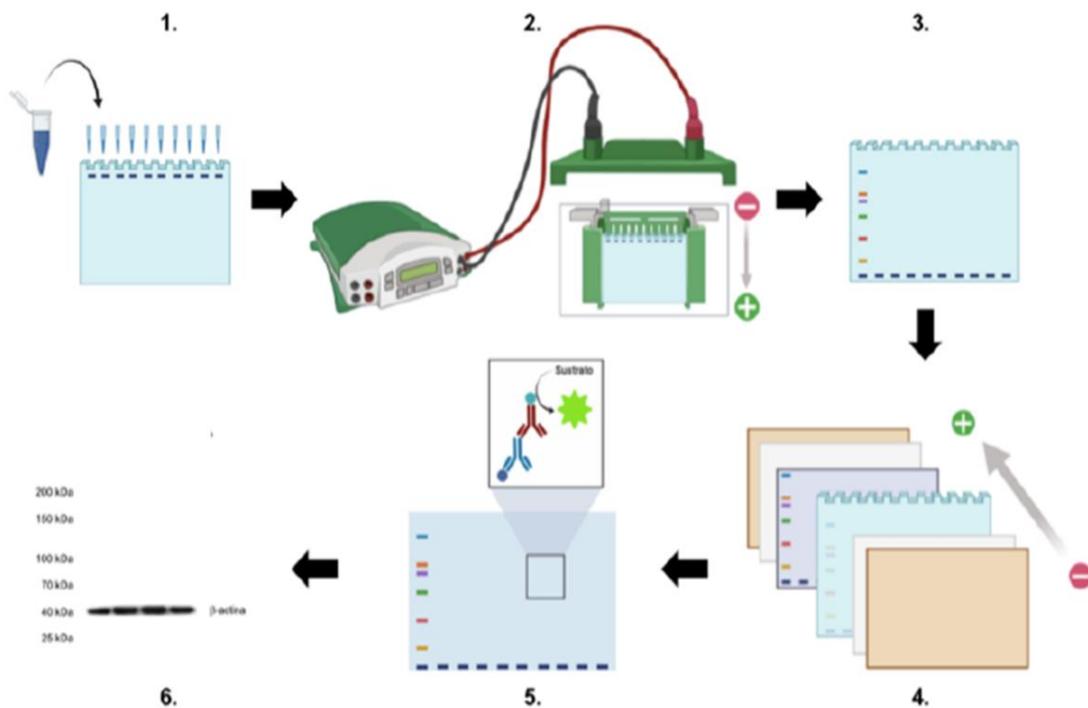
En el caso del tejido, que permanecía almacenado a  $-80^{\circ}\text{C}$ , este se homogenizó con el equipo Tissuelyser II (Qiagen®) en presencia de 500  $\mu\text{l}$  de un tampón de lisis compuesto de un cóctel inhibidor de proteasas completo, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) y tampón C (0,02M HEPES, 0,001 M EDTA, 0,001M EGTA, 0,4M NaCl y 21,1% glicerol).

Para determinar las variaciones *in vitro* en la expresión proteica, tanto los FPH como las CEBH se sembraron en placas Petri con el medio correspondiente a  $37^{\circ}\text{C}$  en un incubador con 5%  $\text{CO}_2$ . Cuando las células alcanzaron una confluencia del 70% se trataron con sildenafilo 1  $\mu\text{M}$  15 minutos y con diferentes concentraciones de riociguat o cinaciguat (en presencia o ausencia de sildenafilo) durante 1 hora y 48 horas. Transcurrido ese tiempo, se eliminó el medio y se recogieron las proteínas con el mismo tampón de lisis.

Para la extracción de proteínas, se sometió a las muestras a un choque térmico. Para ello, se realizaron tres ciclos de congelación durante en nitrógeno líquido y descongelación a  $37^{\circ}\text{C}$  en agitación. Luego, se añadió Nonidet™ P40 1% y se incubó 15 min en hielo y agitación. Por último, las muestras se centrifugaron (1000 g, 20 min,  $4^{\circ}\text{C}$ ) y se recogió el sobrenadante. La concentración de proteína obtenida en cada muestra se cuantificó utilizando el kit *Pierce™ BCA Protein Assay Kit*. Este kit se basa en la reacción de Buriel, donde las proteínas reducen el  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^{1+}$  en medio alcalino. El ácido bicinonínico (BCA) forma un complejo púrpura intenso en presencia de iones  $\text{Cu}^{1+}$  proporcional a la concentración de proteínas en la muestra que se midió por espectrofotometría a 562 nm mediante un espectrofotómetro 'Victor 1420 Multilabel Counter' (Perkin Elmer). Gracias a una curva patrón con BSA se obtuvo la concentración de proteínas.

Los extractos proteicos se diluyeron para obtener de cada muestra la misma concentración de proteína (12 $\mu\text{g}$ ) con 'laemmli buffer' y tampón C y se incubaron 10 minutos a  $95^{\circ}\text{C}$  para desnaturalizar las proteínas. Las diferentes muestras, se separaron mediante de acuerdo con su peso molecular mediante electroforesis en gel de acrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS). Para ello, se cargaron en geles de acrilamida 4-20% junto con el marcador de peso molecular *Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder*. Se dejó correr 30 min a 90 V y a continuación 1 hora a 150 V. Las

proteínas se transfirieron del gel a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF) de 0,2  $\mu\text{m}$  utilizando el sistema Trans-Blot® Turbo™ Transfer System (Bio-Rad Laboratories). La membrana se bloqueó con BSA 5% en PBS tween 0,1% (PBS-T) durante 1 hora y se incubó con el anticuerpo correspondiente diluido en BSA 5% en PBS-T a 4°C hasta el día siguiente (**Tabla 13**). Transcurrido el tiempo, se realizaron tres lavados con PBS-T y se añadió el anticuerpo secundario correspondiente (**Tabla 13**) conjugado con peroxidasa diluido en BSA 5% en PBS-T y se dejó incubar 1 h a temperatura ambiente. La expresión proteica se detectó por quimioluminiscencia mediante los reactivos *GE Healthcare Amersham™ ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent*. Las proteínas marcadas se detectaron realizando autorradiografías en cámara oscura con películas fotográficas (Amersham GE Healthcare; Buckinghamshire, Reino Unido) capaces de recoger la emisión de quimioluminiscencia inducida. La densitometría de las películas se realizó utilizando el software Image J (disponible en <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, EE. UU.). Los resultados se expresaron como ratios respecto al control endógeno  $\beta$ -actina, o respecto a la proteína sin fosforilar según el caso. Se puede observar un esquema de la técnica Western Blot en la **Figura 27**.



**Figura 27. Esquema de la técnica de Western Blot para la detección y cuantificación de proteínas.** 1) Las muestras y el marcador de peso molecular se cargan en el gel de acrilamida. 2) Se introduce el gel en la cubeta de electroforesis y se deja correr. 3) Tras la electroforesis las muestras quedan separadas a lo largo del gel. 4) Las proteínas se transfieren desde el gel a una membrana de nitrocelulosa. 5) Se incuba la membrana con el anticuerpo primario específico de la proteína de interés, el anticuerpo secundario conjugado a HRP y la reacción de quimioluminiscencia. 6) Revelado de la quimioluminiscencia para visualizar la proteína de interés. Imagen creada con Biorender.

Epítipo	Origen	Referencia	Dilución
Colágeno tipo I (COL1)	Conejo	Cell Signaling (91144S)	1:1000
Alfa actinina ( $\alpha$ -SMA)	Conejo	Cell Signaling (19245S)	1:2000
pERK1/2	Conejo	Invitrogen (MA5-1513)	1:1000
ERK1/2	Ratón	Cell Signaling (4695)	1:1000
pSMAD3	Conejo	Novus (NBP1-77836)	1:1000
SMAD3	Conejo	Novus (NBP1-19495)	1:1000
E-cadherina	Ratón	BD Biosciences (610181)	1:1000
Guanilato ciclasa, subunidad $\alpha_1$	Conejo	Sigma - Aldrich (G4280)	1:2000
Guanilato ciclasa, subunidad $\beta_1$	Conejo	Sigma - Aldrich (G4405)	1:2000
$\beta$ -actina	Ratón	Sigma - Aldrich (A1978)	1:5000
HRP - IgG (H+L) conejo	Burro	Thermo Fisher Scientific (SA1-200)	1:5000
HRP - IgG (H+L) Ratón	Burro	Thermo Fisher Scientific (SA1-100)	1:5000

Tabla 13. Anticuerpos utilizados en el ensayo de Western Blot.

### 3.2.14 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los resultados se consideró  $P < 0,05$  como significativo. Los resultados se expresaron como media  $\pm$  desviación estándar (SD), de los resultados obtenidos para cada grupo de  $n$  pacientes, en caso de muestras de tejido pulmonar. En caso de ensayos con cultivos celulares, los resultados se expresaron como media  $\pm$  SD de  $n = 3$  experimentos independientes, de al menos dos pacientes. El análisis estadístico se realizó mediante análisis paramétrico y las comparaciones múltiples se realizaron mediante análisis de varianza (ANOVA) unidireccional seguido de la prueba post hoc de Bonferroni. Para hacer las comparaciones entre dos grupos, se utilizó para el análisis la prueba t-test no apareado para muestras independientes.

## **4 RESULTADOS**

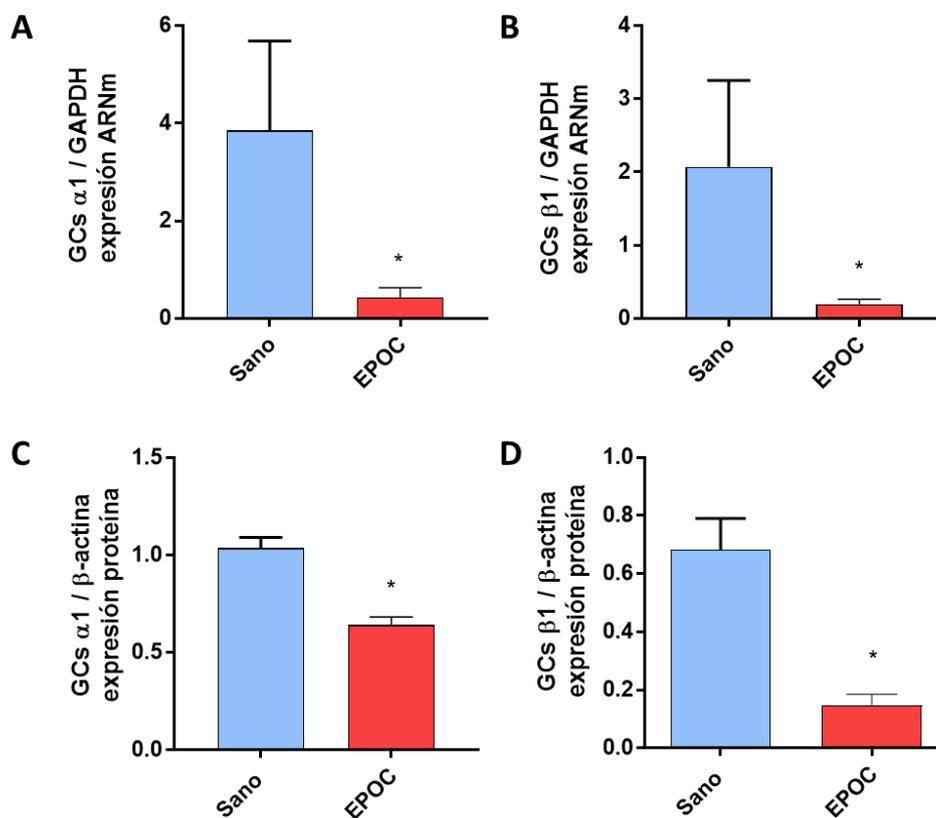


## 4.1 Estudios moleculares de la enzima guanilato ciclasa soluble

### 4.1.1 Expresión de la guanilato ciclasa soluble en tejido pulmonar humano

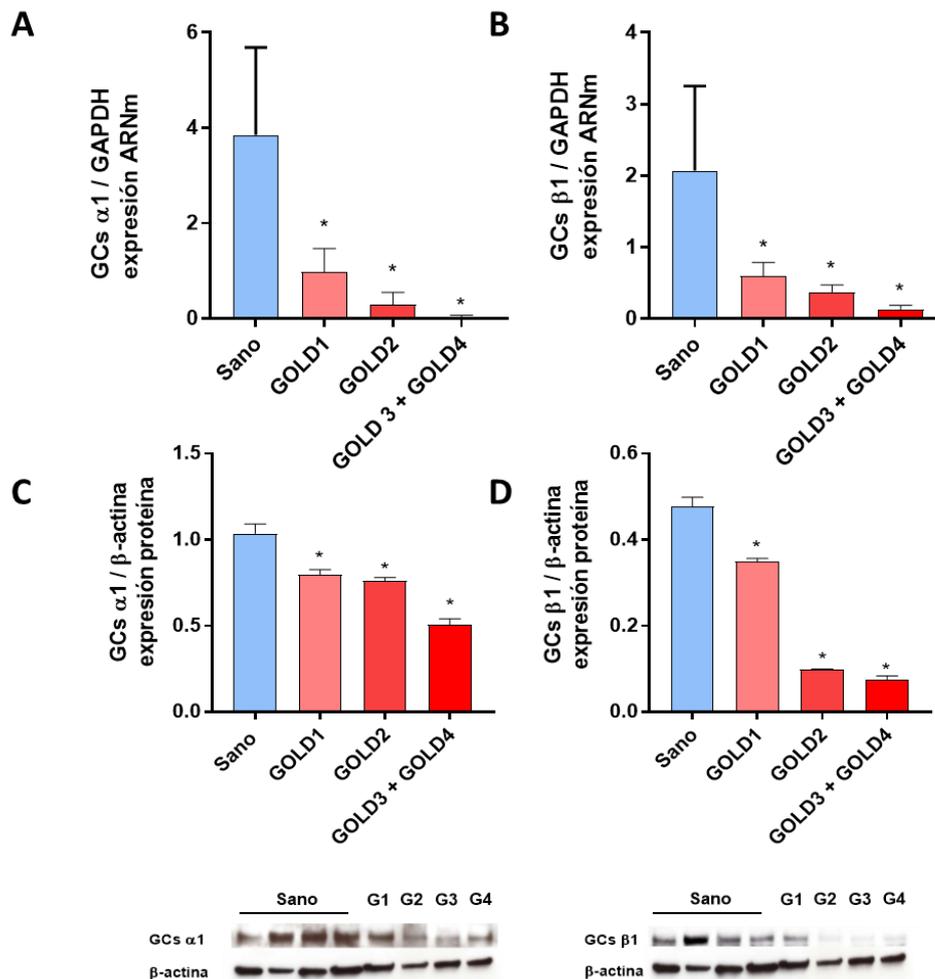
#### 4.1.1.1 Pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica

En primer lugar, la expresión génica y proteica de las subunidades  $\alpha_1$  y  $\beta_1$  se determinó en tejido pulmonar homogeneizado del grupo de voluntarios sanos y los pacientes con EPOC. Como se muestra en la **Figura 28**, ambas subunidades se encuentran menos expresadas en pacientes EPOC respecto al grupo control.



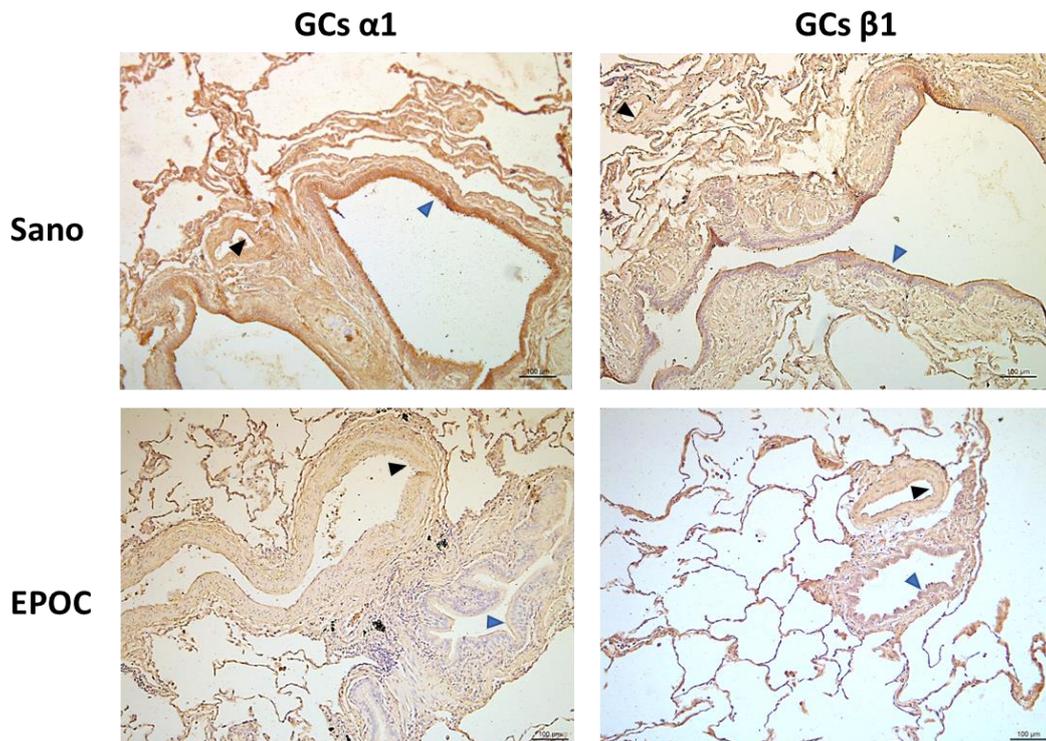
**Figura 28.** La expresión de las subunidades  $\alpha_1$  y  $\beta_1$  de la enzima guanilato ciclasa soluble (GCs) está disminuida en pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). Se obtuvo tejido pulmonar de voluntarios sanos control (n=20) y de pacientes con EPOC (n=17). A) Expresión génica de la subunidad  $\alpha_1$ . B) Expresión génica de la subunidad  $\beta_1$ . C) Expresión proteica de la subunidad  $\alpha_1$ . D) Expresión proteica de la subunidad  $\beta_1$ . La expresión génica de ambas subunidades fue determinada mediante retrotranscripción (RT) y PCR a tiempo real y la expresión proteica mediante Western Blot. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SD. Las comparaciones fueron analizadas mediante t-test. \*P <0.05 respecto al grupo de voluntarios sanos.

Posteriormente, se estratificaron los resultados obtenidos en los pacientes EPOC por el grado de gravedad de la enfermedad (clasificación GOLD). Como se muestra en la **Figura 29** la expresión génica y proteica de ambas subunidades de la enzima GCs disminuye en función de la gravedad de la EPOC.



**Figura 29.** La disminución de la expresión génica y proteica de las subunidades  $\alpha_1$  y  $\beta_1$  de la guanilato ciclasa soluble (GCs) está relacionada con la gravedad de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). Se obtuvo tejido pulmonar de voluntarios sanos (n=20) y de pacientes con EPOC (n=17). Estos últimos se clasificaron en GOLD1 (G1) (n=5), GOLD2 (G2) (n=5) y GOLD3 (G3) + GOLD 4 (G4) (n=7). A) Expresión génica de la subunidad  $\alpha_1$ . B) Expresión génica de la subunidad  $\beta_1$ . C) Expresión proteica de la subunidad  $\alpha_1$ . D) Expresión proteica de la subunidad  $\beta_1$ . La expresión génica de ambas subunidades fue determinada mediante retrotranscripción (RT) y PCR a tiempo real. La expresión proteica se analizó mediante Western Blot y se cuantificó mediante densitometría con respecto al control interno  $\beta$ -actina. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SD. Las comparaciones fueron analizadas mediante test ANOVA unidireccional seguido de un test post hoc de Bonferroni. \*P < 0.05 respecto al grupo de voluntarios sanos.

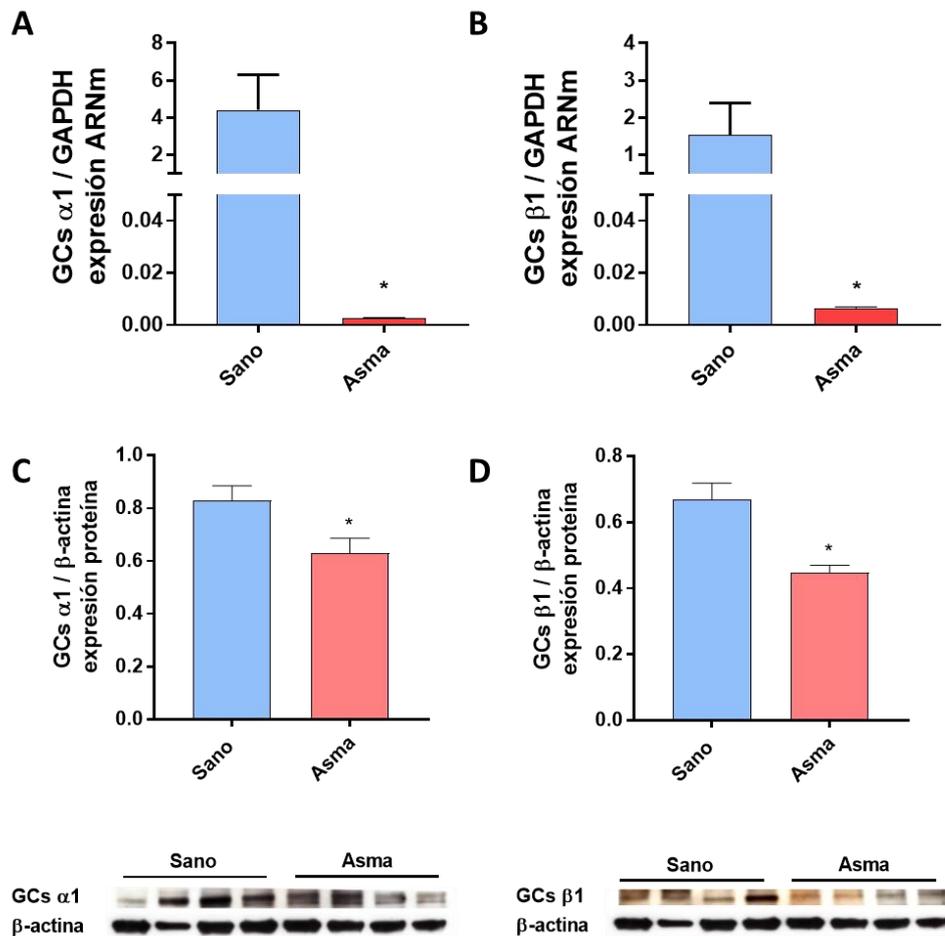
Esto está en línea con los resultados obtenidos en los estudios de inmunohistoquímica realizados en cortes pulmonares de los voluntarios sanos en los que se observó que las subunidades  $\alpha_1$  y  $\beta_1$  están muy expresadas en el tejido pulmonar. Concretamente, se observó que están muy expresadas en células epiteliales bronquiales y alveolares y células endoteliales. Esta expresión, se vio reducida en cortes histológicos de pacientes con EPOC (**Figura 30**).



**Figura 30.** La expresión de las subunidades  $\alpha_1$  y  $\beta_1$  de la guanilato ciclasa soluble (GCs) está disminuida en el tejido pulmonar de pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) respecto al grupo de voluntarios sanos. Las inmunohistoquímicas se realizaron con cortes histológicos de tejido pulmonar obtenidos de voluntarios sanos o de pacientes EPOC. Fueron marcadas para las subunidades  $\alpha_1$  y  $\beta_1$  (tinción marrón) y definidas con hematoxilina. Se muestran fotografías representativas visualizadas con un objetivo 10x. Escala 100  $\mu\text{m}$ . Las flechas azules indican células epiteliales bronquiales. Las flechas negras indican células endoteliales.

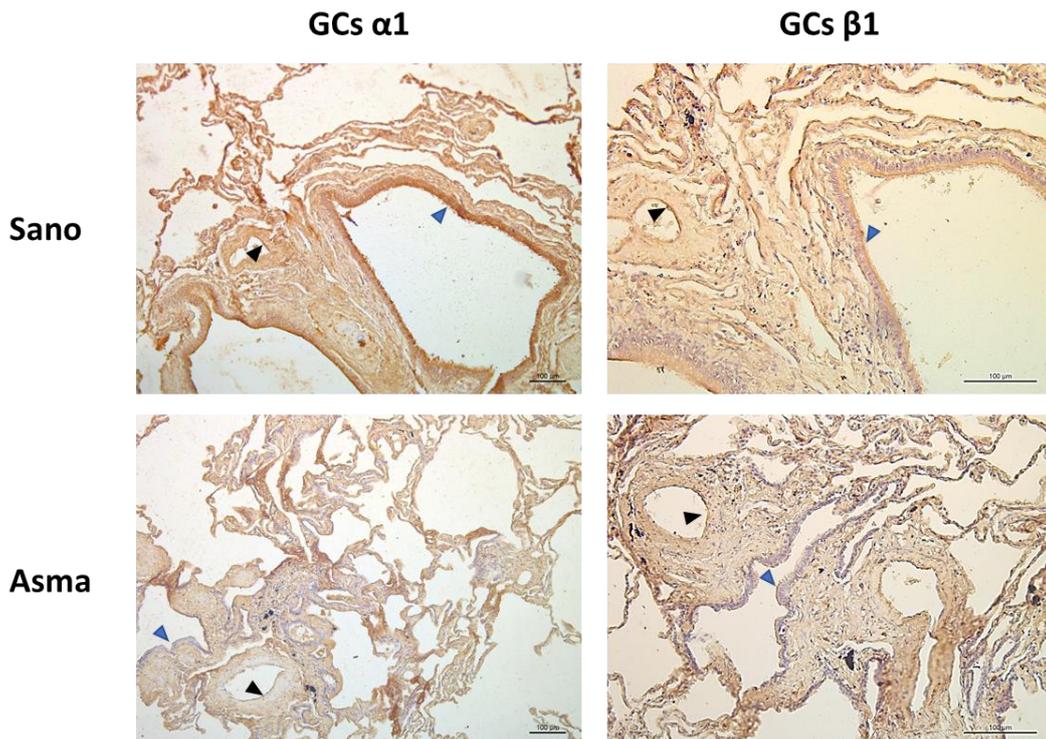
#### 4.1.1.2 Pacientes asmáticos

La expresión génica y proteica de las subunidades  $\alpha_1$  y  $\beta_1$  de la GCs se determinó en tejido pulmonar homogeneizado del grupo de voluntarios sanos y de pacientes asmáticos. La expresión génica y proteica de ambas subunidades se encuentra disminuida de manera significativa en los pacientes asmáticos respecto al grupo de voluntarios sanos, tal y como se puede observar en la **Figura 31**.



**Figura 31. La expresión de las subunidades  $\alpha_1$  y  $\beta_1$  de la enzima guanilato ciclasa soluble (GCs) está disminuida en pacientes asmáticos.** Se obtuvo tejido pulmonar de voluntarios sanos (n=20) y de pacientes con asma (n=2). A) Expresión génica de la subunidad  $\alpha_1$ . B) Expresión génica de la subunidad  $\beta_1$ . C) Expresión proteica de la subunidad  $\alpha_1$ . D) Expresión proteica de la subunidad  $\beta_1$ . La expresión génica de ambas subunidades fue determinada mediante retrotranscripción (RT) y PCR a tiempo real. La expresión proteica se analizó mediante Western Blot y se cuantificó mediante densitometría con respecto al control interno  $\beta$ -actina. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SD. Las comparaciones fueron analizadas mediante t-test. \*P <0.05 respecto al grupo de voluntarios sanos.

Esto concuerda con los resultados obtenidos en los estudios de inmunohistoquímica. Como se observa en la **Figura 32**, las subunidades  $\alpha_1$  y  $\beta_1$  están muy expresadas en las células epiteliales bronquiales y alveolares y células endoteliales de los voluntarios sanos, y esta expresión se ve reducida en los pacientes asmáticos.



**Figura 32.** La expresión de las subunidades  $\alpha_1$  y  $\beta_1$  de la guanilato ciclasa soluble (GCs) está disminuida en el tejido pulmonar de pacientes asmáticos respecto al grupo de voluntarios sanos. Las inmunohistoquímicas se realizaron con cortes histológicos de tejido pulmonar obtenidos de voluntarios sanos o de pacientes con asma. Fueron marcadas para las subunidades  $\alpha_1$  y  $\beta_1$  (tinción marrón) y definidas con hematoxilina. Se muestran fotografías representativas visualizadas con un objetivo 10x en el caso de la subunidad  $\alpha_1$  y 20x en el caso de la subunidad  $\beta_1$ . Escala 100  $\mu\text{m}$ . Las flechas azules indican células epiteliales bronquiales. Las flechas negras indican células endoteliales.

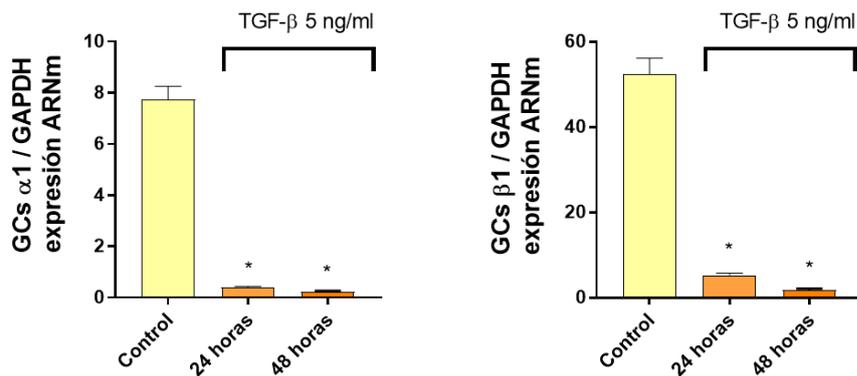
#### **4.1.2 Expresión de la enzima guanilato ciclasa soluble en fibroblastos pulmonares humanos y células epiteliales de bronquio humano**

##### **4.1.2.1 Efecto de TGF- $\beta$**

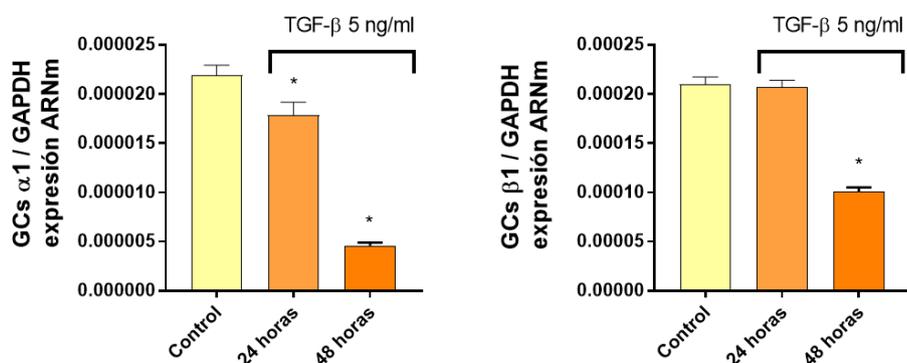
La expresión génica de las subunidades  $\alpha_1$  y  $\beta_1$  de la enzima GCs se determinó a partir de FPH y CEBH tratados durante 24 y 48 horas con TGF- $\beta$ . Este estímulo se ha utilizado en la presente tesis a una concentración de 5 ng/ml, tal y como se ha descrito previamente<sup>146–148</sup>.

En FPH se observó una disminución significativa de la expresión génica de ambas subunidades a partir de las 24 horas de la incubación con TGF- $\beta$  (**Figura 33 A**). Por otra parte, en las CEBH se observó a las 24 horas de la incubación con TGF- $\beta$  una disminución significativa de la subunidad  $\alpha_1$  y a las 48 horas un descenso significativo de la expresión de la subunidad  $\beta_1$  (**Figura 33 B**).

**A. FPH**



**B. CEBH**



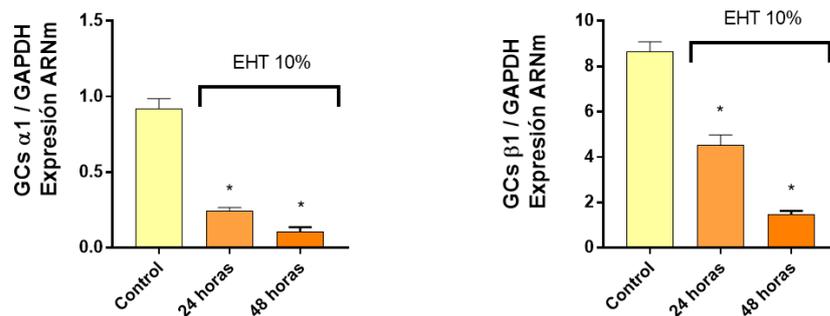
**Figura 33. TGF- $\beta$  provoca una disminución de la expresión génica de la enzima guanilato ciclasa soluble (GCs) en fibroblastos pulmonares humanos (FPH) y células epiteliales de bronquio humano (CEBH).** Se incubaron los FPH y las CEBH con TGF- $\beta$  (5 ng/ml) durante 24 y 48 horas y se midió la expresión génica de las subunidades  $\alpha_1$  y  $\beta_1$  de la GCs mediante retrotranscripción (RT) y PCR a tiempo real. A) Expresión génica de las subunidades  $\alpha_1$  y  $\beta_1$  de la GCs en FPH incubados con TGF- $\beta$  durante 24 y 48 horas. B) Expresión génica de las subunidades  $\alpha_1$  y  $\beta_1$  de la GCs en CEBH incubadas con TGF- $\beta$  durante 24 y 48 horas. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SD. Las comparaciones fueron analizadas mediante test ANOVA unidireccional seguido de un test post hoc de Bonferroni. \*P <0.05 respecto al grupo control.

**4.1.2.2 Efecto del humo del tabaco**

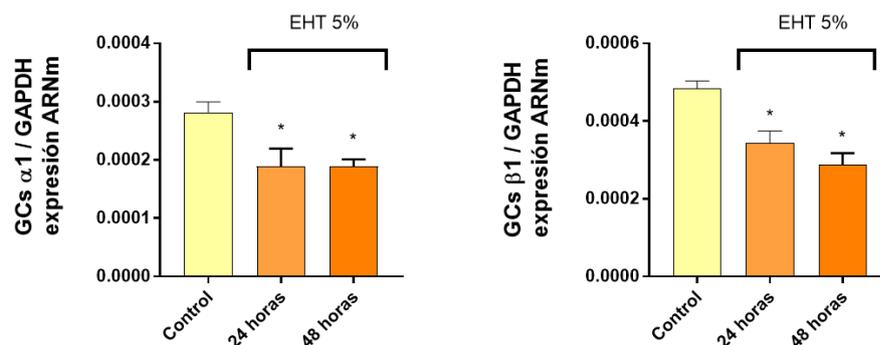
A partir de FPH incubados durante 24 y 48 horas con EHT al 10% y CEBH incubadas durante el mismo tiempo con EHT al 5% se cuantificó la expresión génica de las subunidades  $\alpha_1$  y  $\beta_1$  de la enzima GCs. Las concentraciones de EHT utilizadas en cada caso se determinaron de manera experimental, tal y como se especifica en el apartado ‘4.3 Efecto de los fármacos moduladores de la guanilato ciclasa soluble en el remodelado pulmonar’.

En la **Figura 34 A** se muestra que la expresión de las subunidades  $\alpha_1$  y  $\beta_1$  de la enzima se vio disminuida a partir de las 24 horas de la incubación de los FPH con el EHT. Además, esta disminución fue mayor a las 48 horas. Por otra parte, en las CEBH se observó también una disminución de ambas subunidades a partir de la incubación de estas durante 24 horas con EHT (**Figura 34 B**).

**A. FPH**



**B. CEBH**



**Figura 34. El EHT provoca una disminución de la expresión génica de la enzima guanilato ciclasa soluble (GCs) en fibroblastos pulmonares humanos (FPH) y células epiteliales de bronquio humano (CEBH).** Se incubaron los FPH y las CEBH con EHT durante 24 y 48 horas y se midió la expresión génica de las subunidades  $\alpha_1$  y  $\beta_1$  de la GCs mediante retrotranscripción (RT) y PCR a tiempo real. A) Expresión génica de las subunidades  $\alpha_1$  y  $\beta_1$  de la GCs en FPH incubados con EHT 10% durante 24 y 48 horas. B) Expresión génica de las subunidades  $\alpha_1$  y  $\beta_1$  de la GCs en CEBH incubadas con EHT 5% durante 24 y 48 horas. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SD. Las comparaciones fueron analizadas mediante test ANOVA unidireccional seguido de un test post hoc de Bonferroni. \*P <0.05 respecto al grupo control.

**4.1.3 Efecto del cinaciguat y el riociguat en presencia o ausencia del sildenafil en los niveles de guanosín 3',5'-monofosfato cíclico**

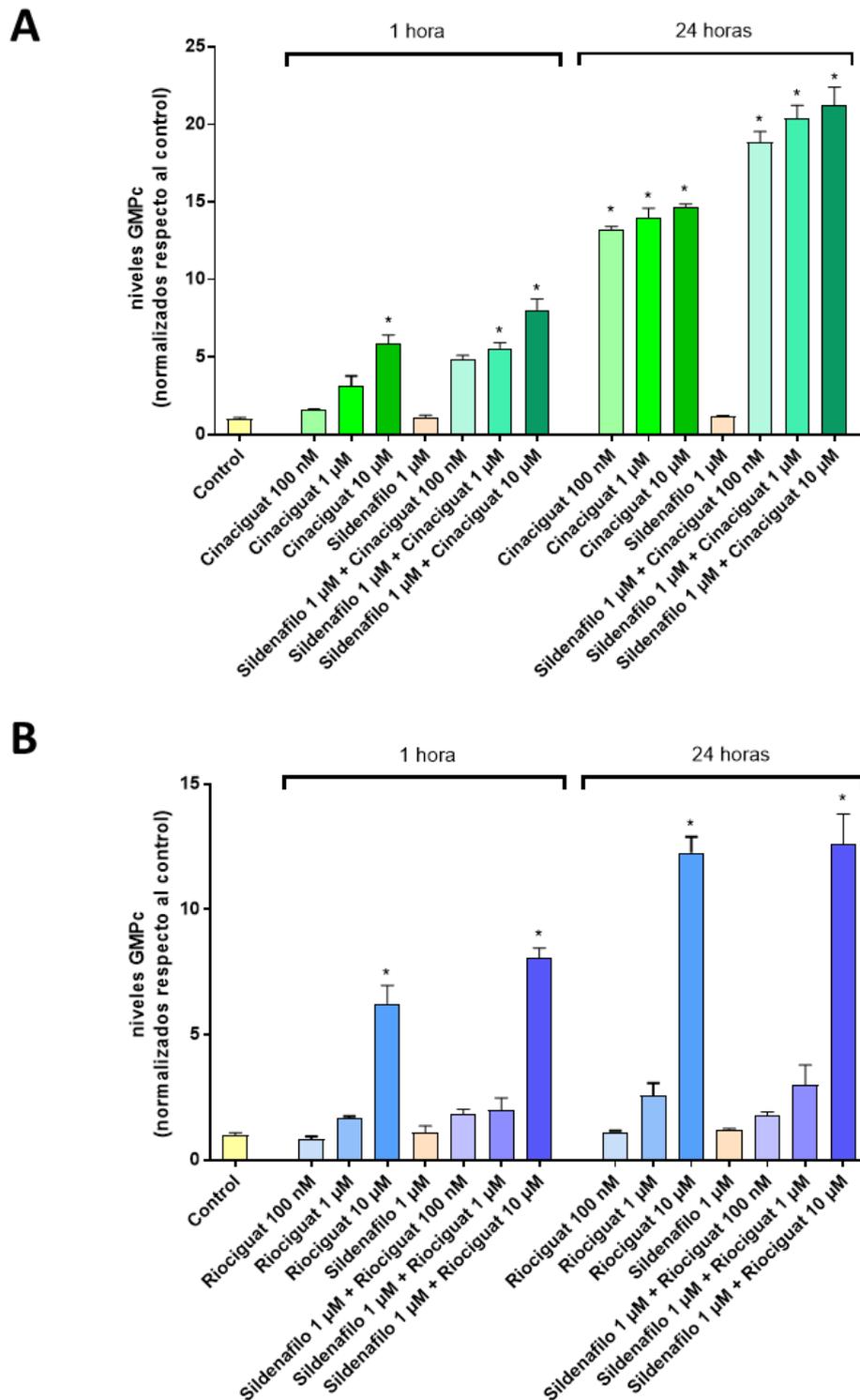
**4.1.3.1 En neutrófilos humanos**

Para ver la modulación de la actividad de la GCs de los neutrófilos por parte de los fármacos cinaciguat y riociguat se cuantificó el GMPc producido por estos al ser tratados con cinaciguat o riociguat a las concentraciones 100 nM, 1  $\mu$ M y 10  $\mu$ M en presencia o ausencia de sildenafil 1  $\mu$ M durante 1 hora y 24 horas. El tratamiento de los neutrófilos únicamente con sildenafil 1  $\mu$ M no provocó un aumento significativo de GMPc respecto al grupo control (sin tratar) (Figura 35).

Al tratar durante 1 hora los neutrófilos con diferentes concentraciones de cinaciguat (100 nM, 1  $\mu$ M y 10  $\mu$ M), se observó un aumento de la concentración de GMPc de

manera dosis dependiente, siendo únicamente significativo el aumento producido por el cinaciguat 10  $\mu\text{M}$ , que generó  $5,837 \pm 0,5827$  veces más GMPc que los neutrófilos control (**Figura 35 A**). Al tratar los neutrófilos simultáneamente con cinaciguat y sildenafil 1  $\mu\text{M}$ , se observó un incremento de GMPc respecto a los neutrófilos únicamente tratados con cinaciguat. Por otra parte, al tratar los neutrófilos durante 24 horas con cinaciguat (100 nM, 1  $\mu\text{M}$  y 10  $\mu\text{M}$ ), se observó también un incremento de GMPc siendo este incremento mayor que el obtenido al tratar solo 1 hora, y significativo a cualquier dosis testada. Concretamente, al tratar los neutrófilos con cinaciguat 10  $\mu\text{M}$  durante 24 horas se obtuvo un incremento de  $14,66 \pm 0,19$  veces más GMPc que el obtenido a partir del grupo de neutrófilos control. Con el tratamiento de cinaciguat y sildenafil 1  $\mu\text{M}$  simultáneamente durante 24 horas se obtuvo un mayor nivel de GMPc, respecto al obtenido sólo al tratarlas con cinaciguat. De hecho, al tratar 24 horas los neutrófilos con cinaciguat 10  $\mu\text{M}$  y sildenafil 1  $\mu\text{M}$  se obtuvo  $21,25 \pm 1,135$  veces más GMPc que el obtenido a partir del grupo de neutrófilos control (**Figura 35 A**).

Por otro lado, al tratar durante 1 hora los neutrófilos con riociguat 1  $\mu\text{M}$  o 10  $\mu\text{M}$ , se observó un aumento de concentración de GMPc de manera dosis dependiente, siendo significativo el aumento producido por el riociguat 10  $\mu\text{M}$ , que provocó  $6,245 \pm 0,72$  veces más GMPc respecto al producido por los neutrófilos control (**Figura 35 B**). Además, al tratar los neutrófilos de manera simultánea con riociguat y sildenafil 1  $\mu\text{M}$ , se observó un incremento del GMPc respecto al producido por las células únicamente tratadas con riociguat. De nuevo, al tratar los neutrófilos 24 horas con riociguat, se produjo un aumento del GMPc respecto a los neutrófilos únicamente tratados durante 1 hora. Concretamente, con la concentración de 10  $\mu\text{M}$  de riociguat se obtuvo  $12,25 \pm 0,6395$  veces más GMPc que el obtenido a partir de los neutrófilos control. La concentración de GMPc obtenida tras tratar 24 horas simultáneamente con riociguat y sildenafil 1  $\mu\text{M}$  aumentó ligeramente respecto a las células únicamente tratadas con riociguat (**Figura 35 B**).



**Figura 35.** Los niveles de guanósín 3,5-monofosfato cíclico (GMPc) aumentan al tratar los neutrófilos extraídos a partir de sangre de pacientes voluntarios sanos 1 hora o 24 horas con cinaciguat y riociguat en presencia o ausencia de sildenafil. Se cuantificó mediante ELISA el GMPc producido por neutrófilos extraídos a partir de sangre de voluntarios sanos y tratadas con diferentes concentraciones de cinaciguat y riociguat en presencia o no sildenafil durante 1 hora y 24 horas. A) GMPc obtenido tras el tratamiento de los neutrófilos con cinaciguat 100 nM, 1 µM y 10 µM, en presencia o ausencia de sildenafil 1 µM durante 1 hora y 24 horas. B) GMPc obtenido tras el tratamiento de los neutrófilos con riociguat 100 nM, 1 µM y 10 µM, en presencia o ausencia de sildenafil 1 µM durante 1 hora y 24 horas. Los niveles de GMPc se expresan como la media de la ratio respecto al

control  $\pm$  SD. Las comparaciones fueron analizadas mediante test ANOVA unidireccional seguido de un test post hoc de Bonferroni. \*P <0.05 respecto al control.

### 4.1.3.2 En fibroblastos pulmonares humanos

Con el fin de estudiar la modulación de la GCs presente en los FPH se cuantificó el GMPc tras tratar a los FPH con cinaciguat o riociguat a las concentraciones 100 nM, 1  $\mu$ M y 10  $\mu$ M en presencia o ausencia de sildenafilo 1  $\mu$ M durante 1 hora, 24 horas, 48 horas y 6 días.

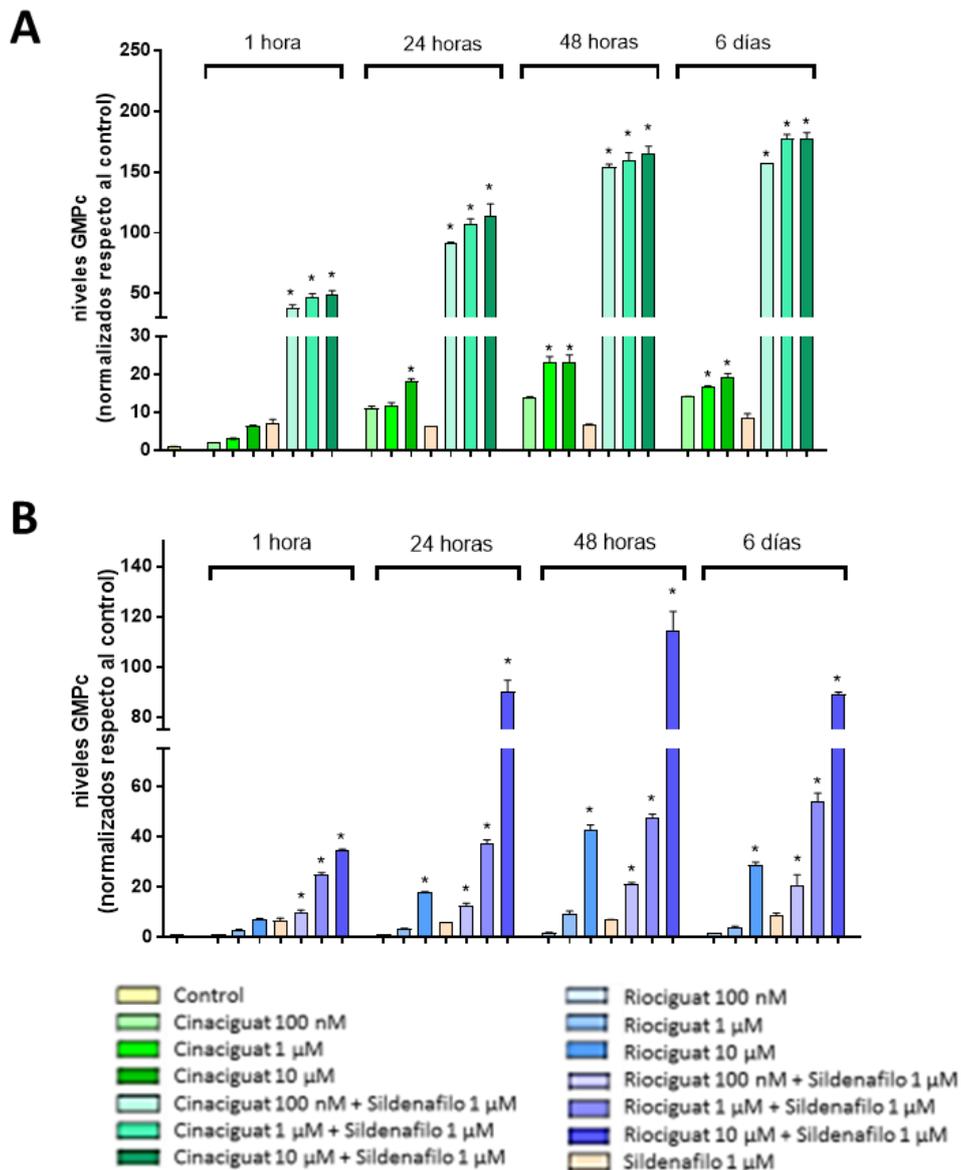
En la **Figura 36**, se observa que el tratamiento de los FPH únicamente con sildenafilo 1  $\mu$ M no provocó un aumento significativo de GMPc respecto al grupo control (sin tratar) a ninguno de los tiempos del tratamiento.

Por otro lado, el mayor incremento de GMPc se alcanzó a las 48 horas tanto en el caso del tratamiento con cinaciguat (**Figura 36 A**) como en el caso del tratamiento con riociguat (**Figura 36 B**). En el caso del tratamiento con cinaciguat durante 6 días los niveles de GMPc se mantuvieron similares a los obtenidos tras 48 horas de tratamiento. Sin embargo, tras el tratamiento de los FPH durante 6 días con riociguat los niveles de GMPc disminuyeron ligeramente respecto a los niveles de GMPc obtenidos tras el tratamiento con riociguat durante 48 horas.

Aunque el mayor incremento de GMPc se obtuviese tras el tratamiento de los FPH durante 48 horas, el tratamiento de los FPH con cinaciguat a cualquier dosis testada (100 nM, 1  $\mu$ M y 10  $\mu$ M) más sildenafilo 1  $\mu$ M produjo un incremento significativo de GMPc a partir de la primera hora del tratamiento. Concretamente, tras el tratamiento de los FPH con cinaciguat 10  $\mu$ M y sildenafilo 1  $\mu$ M de manera simultánea durante 48 horas se observó  $165,4 \pm 5,81$  veces más GMPc que el obtenido por los FPH control sin tratar. En cambio, no se obtuvieron los mismos resultados tras el tratamiento de los FPH únicamente con cinaciguat (sin sildenafilo). A la hora del tratamiento de los FPH con cinaciguat 100 nM, 1  $\mu$ M y 10  $\mu$ M no se produjo un incremento significativo de GMPc. A las 24 horas, únicamente la dosis de cinaciguat 10  $\mu$ M produjo un incremento de GMPc significativo, siendo ese incremento de  $18,27 \pm 0,55$  veces más de GMPc que el producido por las células control. Finalmente, tanto la dosis de cinaciguat 10  $\mu$ M, como la dosis de cinaciguat 1  $\mu$ M produjeron un aumento significativo de GMPc tras el tratamiento de los FPH durante 48 horas y 6 días (**Figura 36 A**).

Del mismo modo que el cinaciguat, el tratamiento de los FPH con riociguat a cualquier dosis testada (100 nM, 1  $\mu$ M y 10  $\mu$ M) más sildenafilo 1  $\mu$ M produjo un incremento significativo de GMPc a partir de la hora del tratamiento. Sin embargo, este incremento fue menor que el producido por el cinaciguat, sobre todo a las dosis más bajas (100 nM y 1  $\mu$ M). Específicamente, se observó que tras el tratamiento de los FPH durante 48

horas con riociguat 10  $\mu\text{M}$  y sildenafilo 1  $\mu\text{M}$  se incrementaba el GMPc  $114,7 \pm 7,40$  veces respecto al obtenido por los FPH sin tratar. Tras el tratamiento de los FPH únicamente con riociguat, sin la presencia de sildenafilo, únicamente la concentración de 10  $\mu\text{M}$  produjo un incremento significativo de GMPc tras el tratamiento durante 24 horas, 48 horas y 6 días. Ese incremento, que fue mayor tras el tratamiento durante 48 horas, fue de  $42,55 \pm 2,16$  veces más de GMPc que el producido por las células sin tratar (Figura 36 B).



**Figura 36.** Los niveles de guanosín 3,5-monofosfato cíclico (GMPc) aumentan al tratar fibroblastos pulmonares humanos (FPH) con cinaciguat o riociguat en presencia o ausencia de sildenafilo. Se cuantificó mediante ELISA el GMPc producido por los FPH tratados con diferentes concentraciones de cinaciguat y riociguat en presencia o no sildenafilo durante 1 hora, 24 horas, 48 horas y 6 días. A) GMPc obtenido tras el tratamiento de los FPH con cinaciguat 100 nM, 1  $\mu\text{M}$  y 10  $\mu\text{M}$ , en presencia o ausencia de sildenafilo 1  $\mu\text{M}$  durante 1 hora, 24 horas, 48 horas y 6 días. B) GMPc obtenido tras el tratamiento de los FPH con riociguat 100 nM, 1  $\mu\text{M}$  y 10  $\mu\text{M}$ , en presencia o ausencia de sildenafilo 1  $\mu\text{M}$  durante 1 hora, 24 horas, 48 horas y 6 días. Los niveles de GMPc se

expresan como la media de la ratio respecto al control  $\pm$  SD. Las comparaciones fueron analizadas mediante test ANOVA unidireccional seguido de un test post hoc de Bonferroni. \*P <0.05 respecto al control.

### 4.1.3.3 En células epiteliales de bronquio

De igual forma que en los FPH, con el fin de estudiar la modulación de la enzima GCs en las BEAS-2B, se trató a estas con cinaciguat o riociguat a las concentraciones 100 nM, 1  $\mu$ M y 10  $\mu$ M en presencia o ausencia de sildenafil 1  $\mu$ M durante 1 hora, 24 horas, 48 y 6 días y se cuantificó el GMPc.

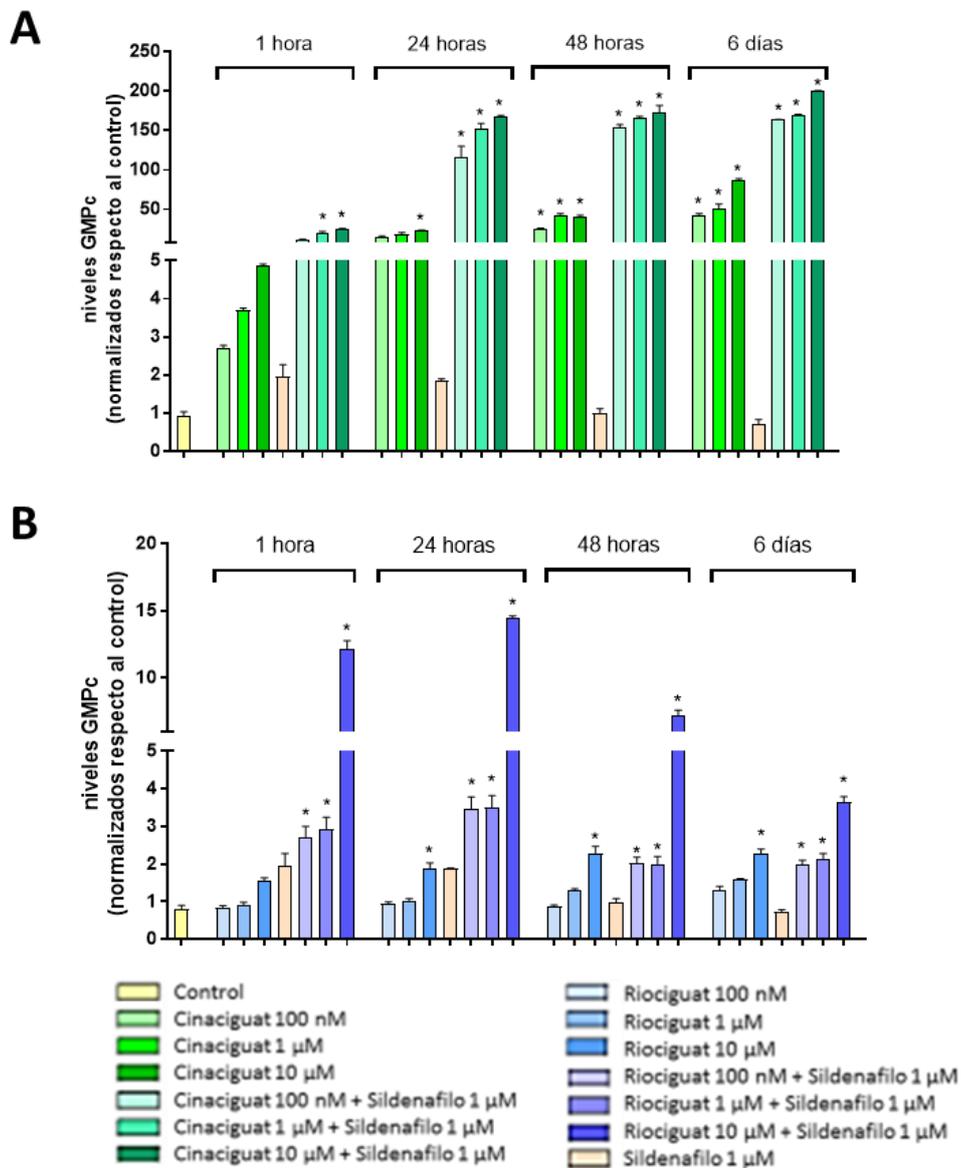
Tal y como se observa en la **Figura 37**, el tratamiento de las BEAS-2B únicamente con sildenafil 1  $\mu$ M no provocó un aumento significativo de GMPc respecto al grupo de células sin tratar a ninguno de los tiempos del tratamiento.

En el caso de las BEAS-2B, tras el tratamiento con cinaciguat (1  $\mu$ M y 10  $\mu$ M) en presencia de sildenafil 1  $\mu$ M durante 1 hora ya se observó un incremento significativo del GMPc. Sin embargo, el mayor incremento se observó a partir de las 24 horas del tratamiento con cinaciguat (100 nM, 1  $\mu$ M y 10  $\mu$ M) en presencia de sildenafil 1  $\mu$ M, incremento que aumentó ligeramente tras 6 días de tratamiento. Además, dicho incremento del GMPc en las BEAS-2B se produjo de manera dependiente a la dosis de cinaciguat utilizada. En particular, tras el tratamiento de las BEAS-2B con la concentración más alta de cinaciguat testada (10  $\mu$ M) y sildenafil 1  $\mu$ M durante 24 horas, se obtuvo  $167,8 \pm 1,57$  veces más GMPc que el obtenido a partir de las células sin tratar. Asimismo, tras el tratamiento durante 6 días con las mismas concentraciones de fármaco se obtuvo  $199,6 \pm 1,40$  veces más de GMPc que el obtenido por las células sin tratar (**Figura 37 A**).

Por otra parte, tras el tratamiento únicamente con cinaciguat (100 nM, 1  $\mu$ M y 10  $\mu$ M), sin la presencia del sildenafil 1  $\mu$ M, se obtuvo un mayor incremento de GMPc cuanto más tiempo duró el tratamiento. Por tanto, el mayor incremento de GMPc se obtuvo tras 6 días de tratamiento con cinaciguat 10  $\mu$ M, obteniendo  $87,49 \pm 1,26$  veces más de GMPc respecto al obtenido de las células sin tratar. Cabe destacar, además, que este incremento fue menor al obtenido para las mismas concentraciones del fármaco en presencia de sildenafil 1  $\mu$ M (**Figura 37 A**).

En el caso del tratamiento de las BEAS-2B con riociguat (100 nM, 1  $\mu$ M y 10  $\mu$ M) en presencia de sildenafil 1  $\mu$ M, se obtuvo un incremento significativo de los niveles de GMPc a partir de la primera hora del tratamiento y durante los 6 días. Además, el mayor incremento de estos niveles se obtuvo al tratar las células 24 horas con estos fármacos. En este periodo de tiempo, el tratamiento de las células con la dosis más alta de riociguat testada (10  $\mu$ M) en presencia de sildenafil 1  $\mu$ M produjo  $14,46 \pm 0,16$  veces más GMPc que las células sin tratar. En el caso del tratamiento de las células epiteliales BEAS-2B con riociguat (100 nM, 1  $\mu$ M y 10  $\mu$ M) en ausencia de sildenafil, únicamente la

concentración más alta produjo un aumento significativo de GMPc, y solo a partir de las 24 horas del tratamiento (**Figura 37 B**).

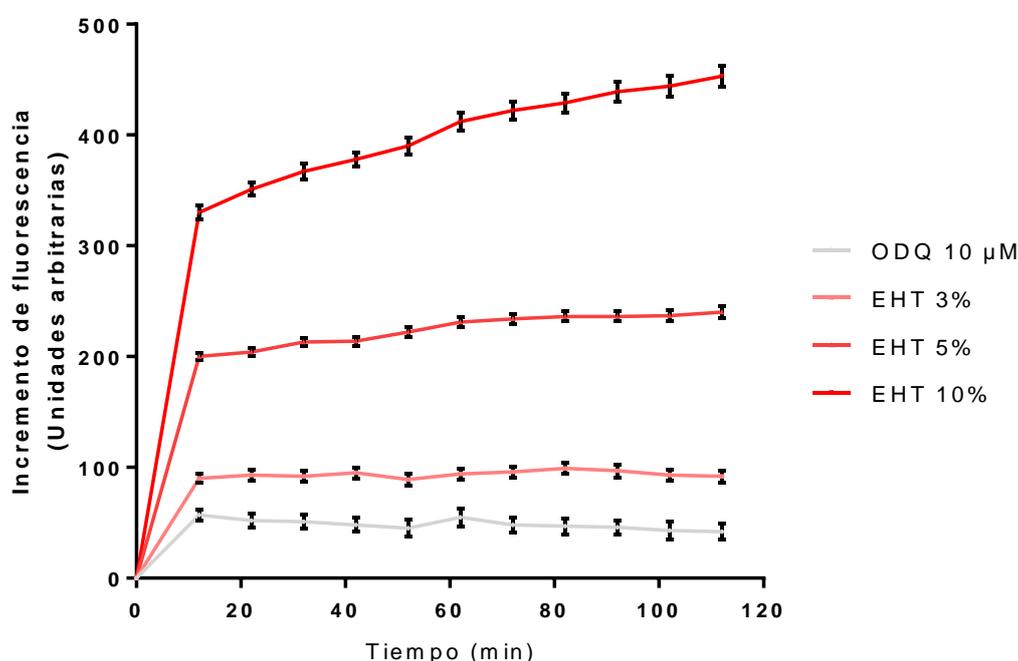


**Figura 37.** Los niveles de guanósín 3,5-monofosfato cíclico (GMPc) aumentan al tratar células epiteliales bronquiales con cinaciguat o riociguat en presencia o ausencia de sildenafil. Se cuantificó mediante ELISA el GMPc producido por las células BEAS-2B tratadas con diferentes concentraciones de cinaciguat y riociguat en presencia o no sildenafil durante 1 hora, 24 horas, 48 horas y 6 días. A) GMPc obtenido tras el tratamiento de las células BEAS-2B con cinaciguat 100 nM, 1 μM y 10 μM, en presencia o ausencia de sildenafil 1 μM durante 1 hora, 24 horas, 48 horas y 6 días. B) GMPc obtenido tras el tratamiento de las células BEAS-2B con riociguat 100 nM, 1 μM y 10 μM, en presencia o ausencia de sildenafil 1 μM durante 1 hora, 24 horas, 48 horas y 6 días. Los niveles de GMPc se expresan como la media de la ratio respecto al control ± SD. Las comparaciones fueron analizadas mediante test ANOVA unidireccional seguido de un test post hoc de Bonferroni. \*P <0.05 respecto al control.

#### 4.1.4 Influencia del estado redox de la enzima guanilato ciclasa soluble en la producción de guanosín 3',5'-monofosfato cíclico

##### 4.1.4.1 Efecto del tabaco en el estado de oxidación de la enzima

Se estudió el efecto del humo del tabaco en el estado redox de la enzima GCs. Para ello se transfectaron las células CHO-K1 con el plásmido que contiene la proteína GCs modificada genéticamente para su unión al reactivo FlasH, tal y como se detalla en la sección de 'Material y Métodos'. Una vez transfectadas las células y marcadas con el reactivo FlasH, se realizó una fotografía para obtener la fluorescencia verde basal de 10 campos de cada pocillo seleccionados aleatoriamente (filtro 488/543 nm). Tal y como se observa en la **Figura 38**, tras estimular las células tanto con ODQ como con diferentes concentraciones de tabaco se observó un incremento de la fluorescencia verde del reactivo FlasH respecto a la fluorescencia verde basal desde la primera toma de fotografías realizada a los 10 minutos del estímulo, y por tanto, una oxidación del grupo hemo ( $\text{Fe}^{+2} \rightarrow \text{Fe}^{+3}$ ) de la GCs. Este incremento de fluorescencia no se observó en el grupo control de células. La oxidación observada de la enzima GCs fue mayor tras estimular las células con EHT (a cualquiera de las concentraciones testadas) que tras el estímulo con el compuesto ODQ a 10  $\mu\text{M}$ , utilizado como control positivo en este experimento. Además, se observó que la oxidación de la enzima provocada por el EHT es dependiente a la concentración de EHT utilizada.



**Figura 38.** El ODQ y el extracto de humo de tabaco (EHT) provocan la oxidación de la enzima guanilato ciclasa soluble (GCs). Se midió el incremento de fluorescencia emitida por el reactivo FlasH, tras estimular con ODQ 10  $\mu\text{M}$  o EHT al 3%, 5% o 10% las células CHO-K1 sembradas en portaobjetos Ibidi de 8 pocillos y transfectadas con la proteína GCs modificada. Para ello, en primer lugar, tras marcar las células con el reactivo FlasH, se realizó una fotografía de la fluorescencia verde basal de 10 campos de cada pocillo seleccionados aleatoriamente (filtro 488/543

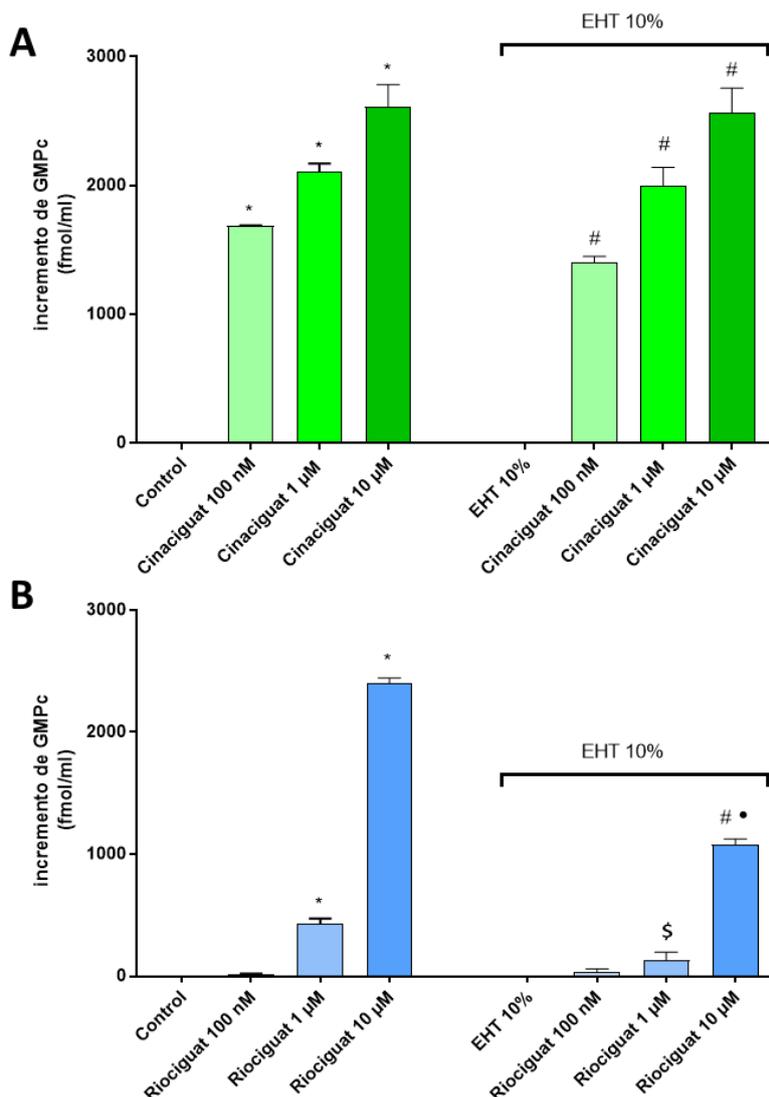
nm). Posteriormente, se añadió 10  $\mu\text{M}$  de ODQ o EHT a diferentes concentraciones (3%, 5% y 10%) y se incubó durante 110 minutos. En este tiempo se tomaron fotografías de la fluorescencia verde cada 10 minutos en los 10 campos seleccionados previamente en cada pocillo mediante un microscopio de fluorescencia Leica DMI8 para célula viva. Los resultados para cada tiempo se expresan como la media del incremento de fluorescencia observado para cada una de las células de los 10 campos seleccionados de cada pocillo  $\pm$  SD.

#### 4.1.4.2 Producción de guanosín 3',5'-monofosfato cíclico por parte del cinaciguat y el riociguat en función del estado redox de la enzima

Para ver la modulación de la actividad de la GCs por parte de los fármacos cinaciguat y riociguat se cuantificó el GMPc producido por las células CHO-K1 previamente transfectadas con el plásmido de la GCs y tratadas con cinaciguat o riociguat a las concentraciones 100 nM, 1  $\mu\text{M}$  y 10  $\mu\text{M}$  durante 1 hora en presencia o ausencia del estímulo EHT 10%.

Tal y como se observa en la **Figura 39 A**, el tratamiento de las CHO-K1 con cualquier concentración de cinaciguat testada (100 nM, 1  $\mu\text{M}$  y 10  $\mu\text{M}$ ) generó un aumento significativo de GMPc respecto a las células control. Además, este aumento se produjo de manera dosis dependiente, llegando a un incremento medio de  $2615 \pm 170,1$  fmol/ml tras tratar con cinaciguat 10  $\mu\text{M}$  respecto al control. Al estimular con EHT 10% a la vez que se trató con cinaciguat, no se observó una variación significativa del incremento producido por el fármaco sin estimular con EHT.

En el caso del riociguat, la concentración de 100 nM no provocó un aumento significativo de GMPc respecto al grupo control. Sin embargo, las concentraciones de riociguat 1  $\mu\text{M}$  y 10  $\mu\text{M}$  si provocaron un aumento significativo del GMPc de manera dosis dependiente (**Figura 39 B**). Concretamente, al tratar las células con riociguat 10  $\mu\text{M}$  se obtuvo un incremento de  $2398 \pm 47$  fmol/ml respecto al grupo de células sin tratar. Al estimular con EHT 10% simultáneamente al tratamiento con riociguat, se observó una disminución significativa del incremento de GMPc respecto al producido por las concentraciones de riociguat 1  $\mu\text{M}$  y 10  $\mu\text{M}$  en ausencia del estímulo. Concretamente, tras medir el incremento de GMPc tras el tratamiento de las células con riociguat 10  $\mu\text{M}$  y el estímulo de estas con EHT 10% se observó un aumento medio de  $1079 \pm 46,66$  fmol/ml respecto al grupo control de células únicamente estimuladas con EHT 10%. Sin embargo, este incremento de GMPc fue aproximadamente la mitad al incremento de GMPc obtenido por las células únicamente tratadas con riociguat 10  $\mu\text{M}$  sin estimular.



**Figura 39. La oxidación de la enzima guanilato ciclasa soluble (GCs) provocada por el extracto de humo de tabaco (EHT) atenúa el efecto del riociguat en la estimulación de la GCs. Sin embargo, no afecta a la activación de la GCs producida por el cinaciguat.** Se cuantificó mediante ELISA el guanosín 3,5-monofosfato cíclico (GMPc) producido por las células CHO-K1 transfectadas con el plásmido de la proteína GCs y tratadas con diferentes concentraciones de cinaciguat y riociguat en presencia o no del estímulo EHT 10% durante 1 hora. A) Incremento de GMPc obtenido tras el tratamiento de las CHO-K1 con cinaciguat 100 nM, 1 μM y 10 μM, sin estimular y estimuladas con EHT 10 % 1 hora. B) Incremento de GMPc obtenido tras el tratamiento de las CHO-K1 con riociguat 100 nM, 1 μM y 10 μM, sin estimular y estimuladas con EHT 10 % 1 hora. Los resultados se expresan como la media ± SD. Las comparaciones fueron analizadas mediante test ANOVA unidireccional seguido de un test post hoc de Bonferroni. \*P <0.05 respecto al control. #P <0.05 respecto a EHT 10%. \$P <0.05 respecto a riociguat 1 μM sin estimular con EHT 10%. •P <0.05 respecto a riociguat 10 μM sin estimular con EHT 10%.

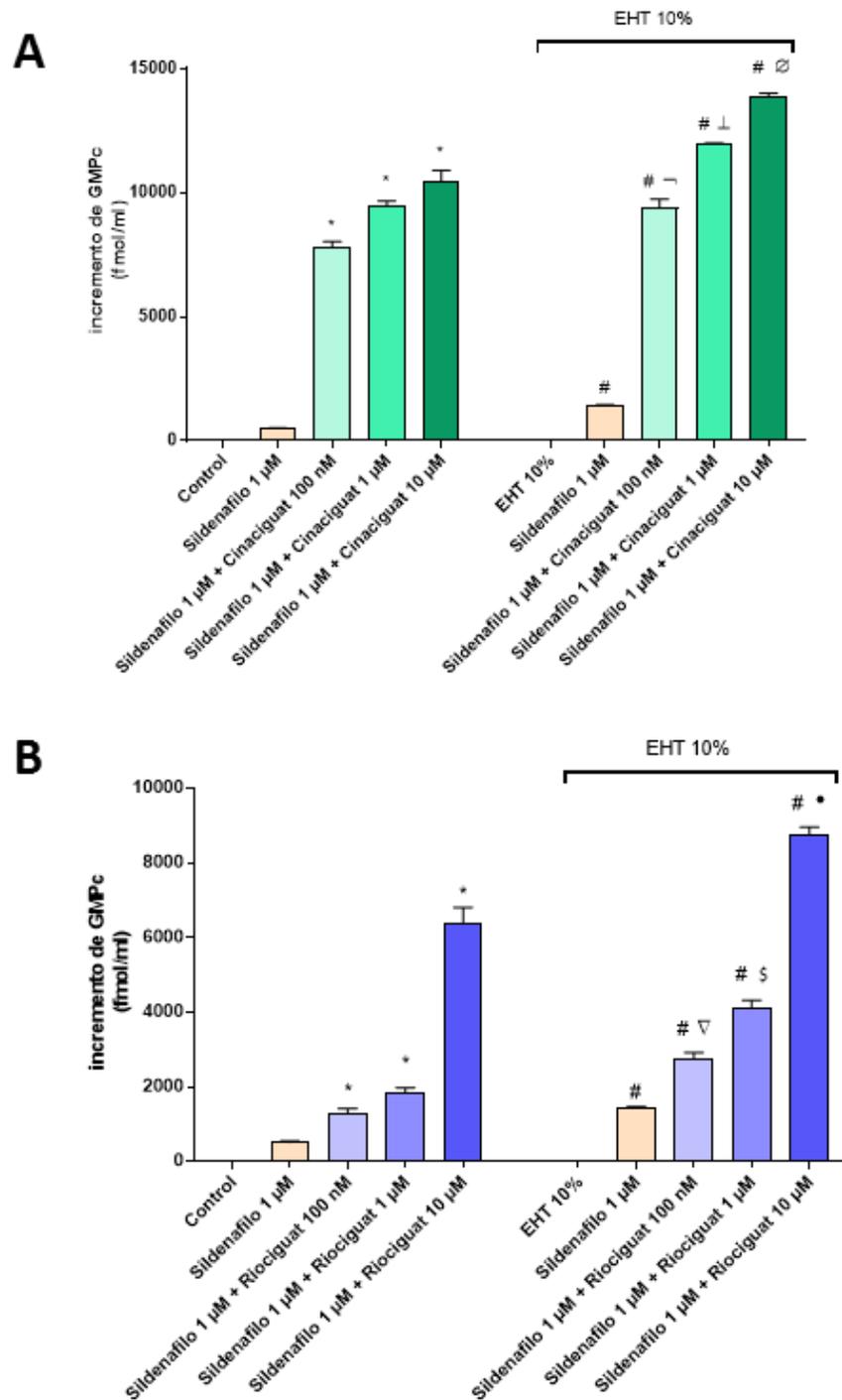
Por otro lado, para elucidar la generación de GMPc por parte de los fármacos cinaciguat y riociguat, en presencia del inhibidor de la PDE5 sildenafil, las células CHO-K1 previamente transfectadas con el plásmido de la GCs se trataron 15 minutos con sildenafil μM, seguido del tratamiento con cinaciguat o riociguat a las concentraciones

100 nM, 1  $\mu$ M y 10  $\mu$ M (con sildenafilo 1  $\mu$ M) durante 1 hora en presencia o ausencia del estímulo EHT 10%.

Tal y como se observa en la **Figura 40 A**, el tratamiento de las CHO-K1 con cualquier concentración de cinaciguat testada (100 nM, 1  $\mu$ M y 10  $\mu$ M), en presencia de sildenafilo 1  $\mu$ M, generó un aumento significativo de GMPc respecto a las células control. Además, este aumento se produjo de manera dosis dependiente, llegando a un incremento medio tras tratar con sildenafilo 1  $\mu$ M y cinaciguat 10  $\mu$ M, de manera simultánea, de  $10487 \pm 418,2$  fmol/ml respecto al control. Además, este incremento fue muy superior al obtenido tras tratar únicamente con cinaciguat 10  $\mu$ M (**Figura 39 A**).

En el caso del riociguat, todas las concentraciones de riociguat testadas (100 nM, 1  $\mu$ M y 10  $\mu$ M) en presencia de sildenafilo 1  $\mu$ M si provocaron un aumento significativo del GMPc de manera dosis dependiente (**Figura 40 B**). Concretamente, al tratar las células con riociguat 10  $\mu$ M en presencia de sildenafilo 1  $\mu$ M se obtuvo un incremento de  $6364 \pm 438,7$  fmol/ml respecto al grupo de células sin tratar. En este caso, el incremento de GMPc producido por el riociguat en presencia de sildenafilo, también fue muy superior al obtenido en ausencia del mismo (**Figura 39 B**).

Al estimular con EHT 10% las células CHO-K1 tratadas con cinaciguat o riociguat en presencia de sildenafilo 1  $\mu$ M, se obtuvo un ascenso de la concentración de GMPc respecto a los niveles obtenidos sin el estímulo del EHT. Además, en las CHO-K1 testadas únicamente con sildenafilo 1  $\mu$ M también se vio un ligero aumento de la concentración de GMPc al ser estimuladas con EHT (**Figura 40**).



**Figura 40.** En presencia de sildenafil, el cinaciguat y el riociguat provocan un aumento del guanosín 3,5-monofosfato cíclico (GMPc) que se incrementa con el extracto de humo de tabaco (EHT). Se cuantificó mediante ELISA el GMPc producido por las células CHO-K1 transfectadas con el plásmido de la proteína GCs y tratadas con diferentes concentraciones de cinaciguat y riociguat en presencia o no del estímulo EHT 10% durante 1 hora. A) Incremento de GMPc obtenido tras el tratamiento de las CHO-K1 con cinaciguat 100 nM, 1 μM y 10 μM, en presencia de sildenafil 1 μM, sin estimular y estimuladas con EHT 10 % 1 hora. B) Incremento de GMPc obtenido tras el tratamiento de las CHO-K1 con riociguat 100 nM, 1 μM y 10 μM, en presencia de sildenafil 1 μM, sin estimular y estimuladas con EHT 10 % 1 hora. Los resultados se expresan como la media ± SD. Las comparaciones fueron analizadas mediante test ANOVA unidireccional seguido de un test post hoc de Bonferroni. \*P <0.05 respecto al control. #P<0.05 respecto a EHT 10%. ▽P <0,05 respecto a sildenafil μM + cinaciguat 100 nM sin estimular con EHT

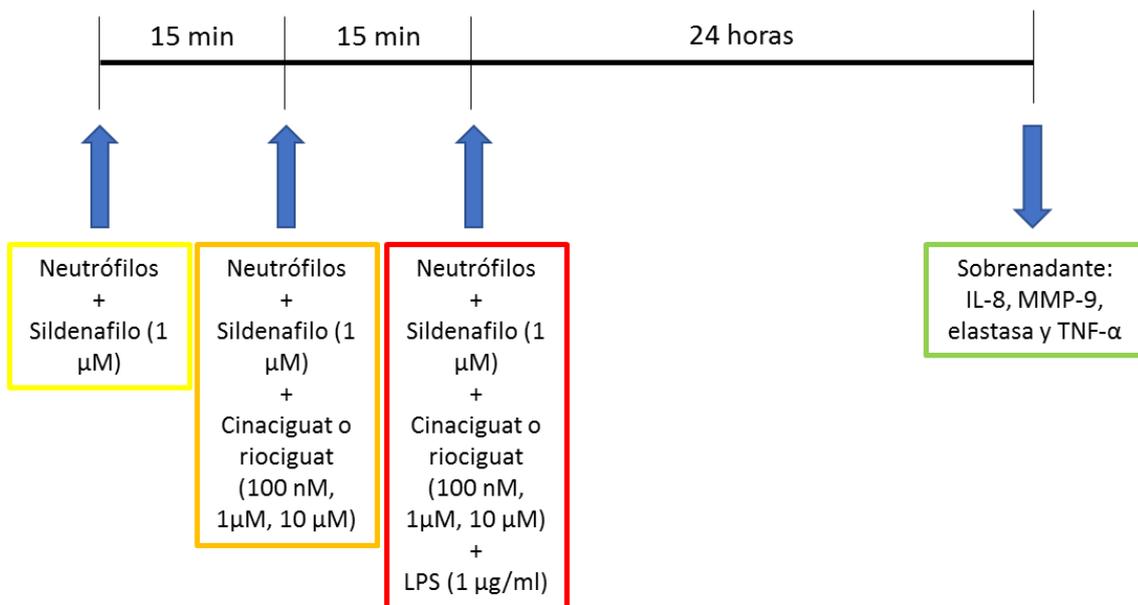
10%.  $\perp P < 0,05$  respecto a sildenafilo 1  $\mu\text{M}$  + cinaciguat 1  $\mu\text{M}$  sin estimular con EHT 10%.  $\emptyset P < 0,05$  respecto a sildenafilo  $\mu\text{M}$  + cinaciguat 10  $\mu\text{M}$  sin estimular con EHT 10%.  $\nabla P < 0,05$  respecto a sildenafilo  $\mu\text{M}$  + riociguat 100 nM sin estimular con EHT 10%.  $\$ P < 0,05$  respecto a sildenafilo  $\mu\text{M}$  + riociguat 1  $\mu\text{M}$  sin estimular con EHT 10%.  $\bullet P < 0,05$  respecto a sildenafilo  $\mu\text{M}$  + riociguat 10  $\mu\text{M}$  sin estimular con EHT 10%.

## 4.2 Efecto de los fármacos moduladores de la guanilato ciclasa soluble sobre la inflamación

### 4.2.1 Efecto en la liberación de mediadores inflamatorios por parte de los neutrófilos

#### 4.2.1.1 Neutrófilos extraídos de voluntarios sanos y estimulados con LPS

Los neutrófilos extraídos a partir de sangre de voluntarios sanos se trataron con diferentes concentraciones de cinaciguat o riociguat en presencia o ausencia de sildenafilo y se estimularon con LPS durante 24 horas (**Figura 41**). Este estímulo se ha utilizado en la presente tesis a una concentración de 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , tal como se ha descrito previamente <sup>149,150</sup>.



**Figura 41. Protocolo para los experimentos *in vitro* en neutrófilos extraídos a partir de sangre de voluntarios sanos, tratados con cinaciguat o riociguat, con o sin sildenafilo, y estimulados con LPS.** En los experimentos *in vitro* los neutrófilos fueron incubados con sildenafilo (1  $\mu\text{M}$ ) durante 15 minutos, seguido de la incubación con cinaciguat o riociguat (100 nM, 1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ ), en presencia o ausencia de sildenafilo, durante otros 15 minutos. A continuación, se añadió 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de LPS y se incubaron 24 horas, momento en el cual se recogió el medio celular sobrenadante para los posteriores análisis mediante ELISA. Imagen creada con PowerPoint.

En las **Tablas 14, 15, 16 y 17** se observa que ninguna concentración de los fármacos cinaciguat y riociguat (100 nM, 1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ ) en presencia o no de sildenafilo (1  $\mu\text{M}$ ) consiguió revertir el incremento de la concentración de los mediadores IL-8, MMP-9, elastasa y TNF- $\alpha$  producido por el LPS. Sin embargo, el fármaco roflumilast, utilizado como control positivo en el presente trabajo, a una concentración de 1  $\mu\text{M}$  si consiguió

atenuar la producción de estos mediadores inflamatorios en los neutrófilos estimulados con LPS.

IL-8 (ng/ml)		
LPS 1 µg/ml	Media	SD
Control (LPS 1 µg/ml)	43,01	3,35
Riociguat 100nM	36,61	2,8
Riociguat 1µM	36,99	5,24
Riociguat 10 µM	41,78	5,88
Cinaciguat 100 nM	34,16	8,6
Cinaciguat 1 µM	37,29	3,35
Cinaciguat 10 µM	37,15	6,62
Sildenafil 1 µM	50,34	1,88
Sildenafil 1 µM + riociguat 100nM	45,62	2,58
Sildenafil 1 µM + riociguat 1µM	41,05	4,23
Sildenafil 1 µM + riociguat 10 µM	48,95	7,31
Sildenafil 1 µM + cinaciguat 100 nM	39,45	5,48
Sildenafil 1 µM + cinaciguat 1 µM	42,35	4,23
Sildenafil 1 µM + cinaciguat 10 µM	40,33	1,97
Roflumilast 1 µM	11,45*	0,27

Tabla 14. El tratamiento de los neutrófilos obtenidos a partir de sangre de voluntarios sanos con cinaciguat y riociguat en presencia o no de sildenafil no impide el incremento de la concentración de IL-8 producido por el LPS. Se obtuvo mediante ELISA la concentración de IL-8 expresada en ng/ml en el sobrenadante de los neutrófilos estimulados con LPS 1 µg/ml en presencia de roflumilast 1 µM o diferentes concentraciones de cinaciguat o riociguat (100 nM, 1 µM, 10 µM) con o sin sildenafil 1 µM. Los resultados se expresan como la media del incremento de la concentración de IL-8 respecto a la concentración basal, y se indica la SD obtenida en cada caso. Las comparaciones fueron analizadas mediante test ANOVA unidireccional seguido de un test post hoc de Bonferroni. \*P <0.05 respecto al grupo control estimulado con LPS 1 µg/ml.

MMP-9 (ng/ml)		
LPS 1 µg/ml	Media	SD
Control (LPS 1 µg/ml)	308,53	50,88
Riociguat 100nM	308,22	43,815
Riociguat 1µM	285,195	46,64
Riociguat 10 µM	261,615	65,93
Cinaciguat 100 nM	264,305	20,3
Cinaciguat 1 µM	256,155	34,175
Cinaciguat 10 µM	253,465	36,09
Sildenafil 1 µM	289,115	28,425
Sildenafil 1 µM + riociguat 100nM	297,31	42,68
Sildenafil 1 µM + riociguat 1µM	306,175	39,48
Sildenafil 1 µM + riociguat 10 µM	302,105	43,425
Sildenafil 1 µM + cinaciguat 100 nM	305,62	39,625
Sildenafil 1 µM + cinaciguat 1 µM	299,31	33,27
Sildenafil 1 µM + cinaciguat 10 µM	293,16	34,76

<b>Roflumilast 1 µM</b>	<b>139,3*</b>	<b>34,96</b>
-------------------------	---------------	--------------

**Tabla 15. El tratamiento de los neutrófilos obtenidos a partir de sangre de voluntarios sanos con cinaciguat y riociguat en presencia o no de sildenafil no impide el incremento de la concentración de MMP-9 producido por el LPS.** Se obtuvo mediante ELISA la concentración de MMP-9 expresada en ng/ml en el sobrenadante de los neutrófilos estimulados con LPS 1 µg/ml en presencia de roflumilast 1 µM o diferentes concentraciones de cinaciguat o riociguat (100 nM, 1 µM, 10 µM) con o sin sildenafil 1 µM. Los resultados se expresan como la media del incremento de la concentración de MMP-9 respecto a la concentración basal, y se indica la SD obtenida en cada caso. Las comparaciones fueron analizadas mediante test ANOVA unidireccional seguido de un test post hoc de Bonferroni. \*P <0.05 respecto al grupo control estimulado con LPS 1 µg/ml.

<b>TNF-α (pg/ml)</b>		
<b>LPS 1 µg/ml</b>	<b>Media</b>	<b>SD</b>
<b>Control (LPS 1 µg/ml)</b>	223,17	6,33
<b>Riociguat 100nM</b>	225,81	1,69
<b>Riociguat 1µM</b>	212,41	4,95
<b>Riociguat 10 µM</b>	191,71	8,77
<b>Cinaciguat 100 nM</b>	218,41	9,89
<b>Cinaciguat 1 µM</b>	216,56	8,41
<b>Cinaciguat 10 µM</b>	213,46	24,39
<b>Sildenafil 1 µM</b>	208,65	7,65
<b>Sildenafil 1 µM + riociguat 100nM</b>	210,58	2,65
<b>Sildenafil 1 µM + riociguat 1µM</b>	198,57	3,48
<b>Sildenafil 1 µM + riociguat 10 µM</b>	197,58	5,69
<b>Sildenafil 1 µM + cinaciguat 100 nM</b>	205,89	6,58
<b>Sildenafil 1 µM + cinaciguat 1 µM</b>	209,65	6,95
<b>Sildenafil 1 µM + cinaciguat 10 µM</b>	204,65	4,65
<b>Roflumilast 1 µM</b>	<b>70,81*</b>	<b>19,5</b>

**Tabla 16. El tratamiento de los neutrófilos obtenidos a partir de sangre de voluntarios sanos con cinaciguat y riociguat en presencia o no de sildenafil no impide el incremento de la concentración de TNF-α producido por el LPS.** Se obtuvo mediante ELISA la concentración de TNF-α expresada en pg/ml en el sobrenadante de los neutrófilos estimulados con LPS 1 µg/ml en presencia de roflumilast 1 µM o diferentes concentraciones de cinaciguat o riociguat (100 nM, 1 µM, 10 µM) con o sin sildenafil 1 µM. Los resultados se expresan como la media del incremento de la concentración de TNF-α respecto a la concentración basal, y se indica la SD obtenida en cada caso. Las comparaciones fueron analizadas mediante test ANOVA unidireccional seguido de un test post hoc de Bonferroni. \*P <0.05 respecto al grupo control estimulado con LPS 1 µg/ml.

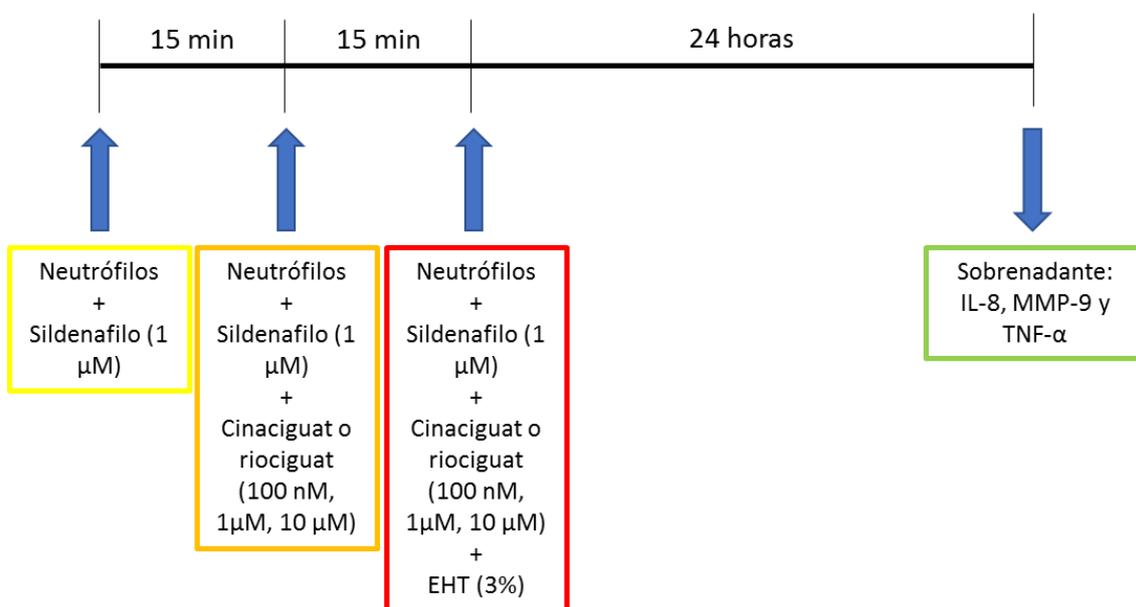
<b>Elastasa (ng/ml)</b>		
<b>LPS 1 µg/ml</b>	<b>Media</b>	<b>SD</b>
<b>Control (LPS 1 µg/ml)</b>	281,45	47,05
<b>Riociguat 100nM</b>	227,56	11,22
<b>Riociguat 1µM</b>	228,89	7,1
<b>Riociguat 10 µM</b>	226,26	14,59
<b>Cinaciguat 100 nM</b>	290,31	48,45
<b>Cinaciguat 1 µM</b>	298,18	12,34
<b>Cinaciguat 10 µM</b>	270,54	17,17
<b>Sildenafil 1 µM</b>	261,53	15,25

Sildenafil 1 $\mu$ M + riociguat 100nM	286,32	32,56
Sildenafil 1 $\mu$ M + riociguat 1 $\mu$ M	287,65	18,95
Sildenafil 1 $\mu$ M + riociguat 10 $\mu$ M	275,65	8,97
Sildenafil 1 $\mu$ M + cinaciguat 100 nM	270,45	7,58
Sildenafil 1 $\mu$ M + cinaciguat 1 $\mu$ M	265,68	6,58
Sildenafil 1 $\mu$ M + cinaciguat 10 $\mu$ M	290,32	8,65
Roflumilast 1 $\mu$ M	133,97*	52,86

**Tabla 17.** El tratamiento de los neutrófilos obtenidos a partir de sangre de voluntarios sanos con cinaciguat y riociguat en presencia o no de sildenafil no impide el incremento de la concentración de elastasa producido por el LPS. Se obtuvo mediante ELISA la concentración de elastasa expresada en ng/ml en el sobrenadante de los neutrófilos estimulados con LPS 1  $\mu$ g/ml en presencia de roflumilast 1  $\mu$ M o diferentes concentraciones de cinaciguat o riociguat (100 nM, 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M) con o sin sildenafil 1  $\mu$ M. Los resultados se expresan como la media del incremento de la concentración de elastasa respecto a la concentración basal, y se indica la SD obtenida en cada caso. Las comparaciones fueron analizadas mediante test ANOVA unidireccional seguido de un test post hoc de Bonferroni. \*P <0.05 respecto al grupo control estimulado con LPS 1  $\mu$ g/ml.

#### 4.2.1.2 Neutrófilos extraídos de voluntarios sanos y estimulados con extracto de humo de tabaco

A partir de sangre de voluntarios sanos, se extrajeron neutrófilos que se trataron con diferentes concentraciones de los fármacos cinaciguat o riociguat en presencia o ausencia de sildenafil y se estimularon con EHT como se muestra en la **Figura 42**. El EHT se utilizó para estimular los neutrófilos a una concentración del 3%, tal y como se ha descrito previamente <sup>151</sup>.



**Figura 42.** Protocolo para los experimentos *in vitro* en neutrófilos extraídos a partir de sangre de voluntarios sanos, tratados con cinaciguat o riociguat, con o sin sildenafil, y estimulados con extracto de humo de tabaco (EHT). En los experimentos *in vitro* los neutrófilos fueron incubados con sildenafil (1  $\mu$ M) durante 15 minutos, seguido de la incubación con cinaciguat o riociguat (100 nM, 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M), en presencia o ausencia de sildenafil, durante otros 15 minutos. A continuación, se añadió 3% de EHT y se incubaron 24 horas, momento en el cual se recogió el medio celular sobrenadante para los posteriores análisis mediante ELISA. Imagen creada con PowerPoint.

Tal y como se muestra en las **Tablas 18 y 19** únicamente el fármaco cinaciguat a la concentración de 10  $\mu\text{M}$  en presencia de sildenafilo 1  $\mu\text{M}$ , consiguió atenuar el incremento de la concentración de IL-8 y TNF- $\alpha$  producido por el EHT al 3%. Sin embargo, ninguna concentración de riociguat (100 nM, 1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ ), ni sola ni en presencia de sildenafilo 1  $\mu\text{M}$ , consiguió revertir dicho incremento.

Por otro lado, tal y como se observa en las **Tabla 20** ninguna concentración de los fármacos cinaciguat y riociguat (100 nM, 1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ ) en presencia o no de sildenafilo (1  $\mu\text{M}$ ) consiguió revertir el aumento de la concentración MMP-9 producido por el EHT al 3%.

El fármaco roflumilast (1  $\mu\text{M}$ ) si consiguió atenuar la producción de IL-8, MMP-9 y TNF- $\alpha$  en los neutrófilos estimulados con EHT al 3%.

Cuando se midió la concentración de elastasa producida por los neutrófilos tras el estímulo con el EHT al 3%, no se observó una diferencia significativa respecto a la concentración basal de neutrófilos no estimulados con EHT. Por esta razón, no se pudo determinar el potencial de los fármacos cinaciguat, riociguat y sildenafilo en la reducción de este marcador tras el estímulo con EHT. Estos resultados van en línea con los obtenidos por el grupo de Koethe et al. que únicamente observaron diferencia entre la expresión basal de elastasa y el estímulo con tabaco al adicionar también N-Formilmetionina Leucil-Fenilalanina (fMLP), un activador de leucocitos <sup>152</sup>.

IL-8 (ng/ml)		
EHT 3%	Media	SD
Control (EHT 3%)	16,29	2,1
Riociguat 100nM	14,86	2,65
Riociguat 1 $\mu\text{M}$	14,62	1,65
Riociguat 10 $\mu\text{M}$	17,47	0,15
Cinaciguat 100 nM	16,23	2,15
Cinaciguat 1 $\mu\text{M}$	15,24	1,79
Cinaciguat 10 $\mu\text{M}$	14,78	1,61
Sildenafilo 1 $\mu\text{M}$	14,25	1,79
Sildenafilo 1 $\mu\text{M}$ + riociguat 100nM	15,64	0,68
Sildenafilo 1 $\mu\text{M}$ + riociguat 1 $\mu\text{M}$	16,42	0,52
Sildenafilo 1 $\mu\text{M}$ + riociguat 10 $\mu\text{M}$	15,29	0,55
Sildenafilo 1 $\mu\text{M}$ + cinaciguat 100 nM	14,98	2,1
Sildenafilo 1 $\mu\text{M}$ + cinaciguat 1 $\mu\text{M}$	13,36	3,18
Sildenafilo 1 $\mu\text{M}$ + cinaciguat 10 $\mu\text{M}$	9,92*	1,7
Roflumilast 1 $\mu\text{M}$	2,27*	0,92

Tabla 18. El tratamiento de los neutrófilos obtenidos a partir de sangre de voluntarios sanos con cinaciguat 10  $\mu\text{M}$  en presencia de sildenafilo 1  $\mu\text{M}$  atenúa el incremento de la concentración de IL-8 producido por el EHT. Sin embargo, ninguna concentración de riociguat en presencia o ausencia de

## RESULTADOS

**sildenafil consigue disminuir dicho incremento.** Se obtuvo mediante ELISA la concentración de IL-8 expresada en ng/ml en el sobrenadante de los neutrófilos estimulados con EHT al 3 % en presencia de roflumilast 1  $\mu$ M o diferentes concentraciones de cinaciguat o riociguat (100 nM, 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M) con o sin sildenafil 1  $\mu$ M. Los resultados se expresan como la media del incremento de la concentración de IL-8 respecto a la concentración basal, y se indica la SD obtenida en cada caso. Las comparaciones fueron analizadas mediante test ANOVA unidireccional seguido de un test post hoc de Bonferroni. \*P <0.05 respecto al grupo control estimulado con EHT al 3%.

TNF- $\alpha$ (pg/ml)		
EHT 3%	Media	SD
Control (EHT 3%)	102,54	2,36
Riociguat 100nM	95,63	2,59
Riociguat 1 $\mu$ M	97,14	3,65
Riociguat 10 $\mu$ M	89,36	4,65
Cinaciguat 100 nM	96,53	5,32
Cinaciguat 1 $\mu$ M	111,11	1,89
Cinaciguat 10 $\mu$ M	114,92	1,65
Sildenafil 1 $\mu$ M	80,95	0,84
Sildenafil 1 $\mu$ M + riociguat 100nM	89,96	0,57
Sildenafil 1 $\mu$ M + riociguat 1 $\mu$ M	76,66	2,36
Sildenafil 1 $\mu$ M + riociguat 10 $\mu$ M	85,38	3,65
Sildenafil 1 $\mu$ M + cinaciguat 100 nM	89,63	5,65
Sildenafil 1 $\mu$ M + cinaciguat 1 $\mu$ M	121,09	4,21
Sildenafil 1 $\mu$ M + cinaciguat 10 $\mu$ M	15,14*	3,32
Roflumilast 1 $\mu$ M	16,51*	1,35

**Tabla 19.** El tratamiento de los neutrófilos obtenidos a partir de sangre de voluntarios sanos con cinaciguat 10  $\mu$ M en presencia de sildenafil 1  $\mu$ M atenúa el incremento de la concentración de TNF- $\alpha$  producido por el EHT. Sin embargo, ninguna concentración de riociguat en presencia o ausencia de sildenafil consigue disminuir dicho incremento. Se obtuvo mediante ELISA la concentración de TNF- $\alpha$  expresada en pg/ml en el sobrenadante de los neutrófilos estimulados con EHT al 3 % en presencia de roflumilast 1  $\mu$ M o diferentes concentraciones de cinaciguat o riociguat (100 nM, 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M) con o sin sildenafil 1  $\mu$ M. Los resultados se expresan como la media del incremento de la concentración de TNF- $\alpha$  respecto a la concentración basal, y se indica la SD obtenida en cada caso. Las comparaciones fueron analizadas mediante test ANOVA unidireccional seguido de un test post hoc de Bonferroni. \*P <0.05 respecto al grupo control estimulado con EHT al 3%.

MMP-9 (ng/ml)		
EHT 3%	Media	SD
Control (EHT 3%)	293,11	92,1
Riociguat 100nM	285,65	68,95
Riociguat 1 $\mu$ M	254,04	120,13
Riociguat 10 $\mu$ M	307,26	38,84
Cinaciguat 100 nM	298,63	65,32
Cinaciguat 1 $\mu$ M	329,93	100,73
Cinaciguat 10 $\mu$ M	279,97	76,86
Sildenafil 1 $\mu$ M	298,63	89,65
Sildenafil 1 $\mu$ M + riociguat 100nM	309,39	125,03

Sildenafil 1 $\mu$ M + riociguat 1 $\mu$ M	262,98	112,32
Sildenafil 1 $\mu$ M + riociguat 10 $\mu$ M	287,96	58,65
Sildenafil 1 $\mu$ M + cinaciguat 100 nM	296,9	44,41
Sildenafil 1 $\mu$ M + cinaciguat 1 $\mu$ M	276,47	66,6
Sildenafil 1 $\mu$ M + cinaciguat 10 $\mu$ M	274,98	75,32
Roflumilast 1 $\mu$ M	62,17*	41,44

Tabla 20. El tratamiento de los neutrófilos obtenidos a partir de sangre de voluntarios sanos con cinaciguat y riociguat en presencia o no de sildenafil no impide el incremento de la concentración de MMP-9 producido por el EHT. Se obtuvo mediante ELISA la concentración de MMP-9 expresada en ng/ml en el sobrenadante de los neutrófilos estimulados con ENT al 3% en presencia de roflumilast 1  $\mu$ M o diferentes concentraciones de cinaciguat o riociguat (100 nM, 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M) con o sin sildenafil 1  $\mu$ M. Los resultados se expresan como la media del incremento de la concentración de MMP-9 respecto a la concentración basal, y se indica la SD obtenida en cada caso. Las comparaciones fueron analizadas mediante test ANOVA unidireccional seguido de un test post hoc de Bonferroni. \*P <0.05 respecto al grupo control estimulado con EHT al 3%.

#### 4.2.1.3 Neutrófilos extraídos de pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica o asma y estimulados con LPS

A partir de sangre de pacientes con EPOC o asmáticos, se extrajeron neutrófilos que se trataron con diferentes concentraciones de los fármacos cinaciguat o riociguat en presencia o ausencia de sildenafil y se estimularon con LPS, tal y como se detalla en la Figura 43.

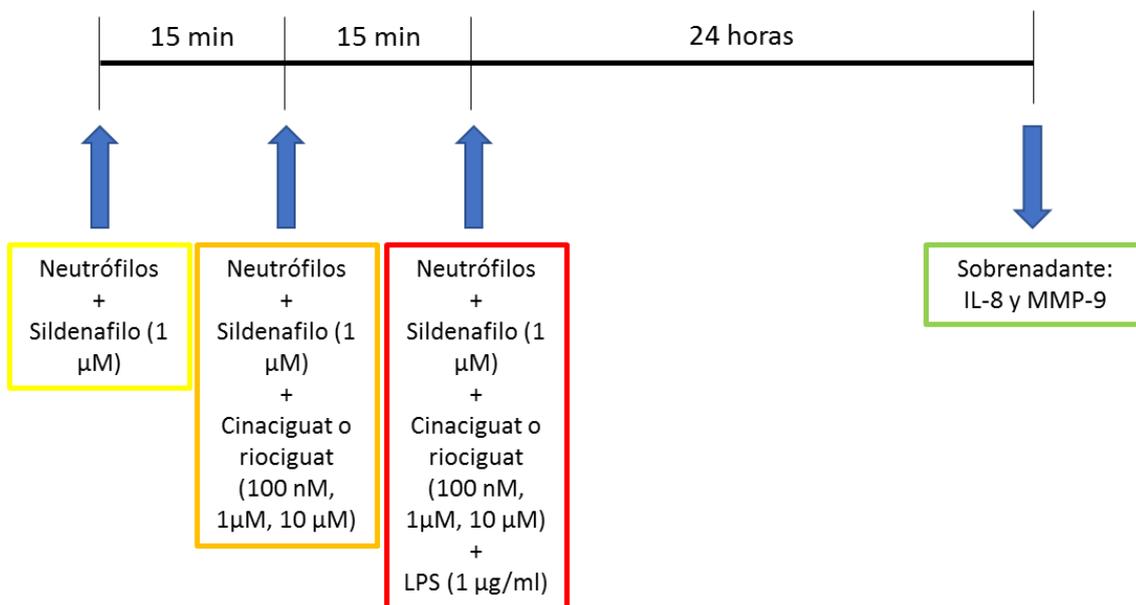


Figura 43. Protocolo para los experimentos *in vitro* en neutrófilos extraídos a partir de sangre de pacientes EPOC o asmáticos, tratados con cinaciguat o riociguat, con o sin sildenafil, y estimulados con LPS. En los experimentos *in vitro* los neutrófilos fueron incubados con sildenafil (1  $\mu$ M) durante 15 minutos, seguido de la incubación con cinaciguat o riociguat (100 nM, 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M), en presencia o ausencia de sildenafil, durante otros 15 minutos. A continuación, se añadió 1  $\mu$ g/ml de LPS y se incubaron 24 horas, momento en el cual se recogió el medio celular sobrenadante para los posteriores análisis mediante ELISA. Imagen creada con PowerPoint.

## RESULTADOS

Como en el caso de los neutrófilos extraídos a partir de la sangre de voluntarios sanos, ninguna concentración de los fármacos cinaciguat y riociguat (100 nM, 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M) en presencia o no de sildenafil (1  $\mu$ M) consiguió revertir el incremento de la concentración de los mediadores IL-8 y MMP-9 producido por 1  $\mu$ g/ml de LPS. Sin embargo, el fármaco roflumilast a una concentración de 1  $\mu$ M si consiguió atenuar de forma significativa la producción de estos mediadores inflamatorios en los neutrófilos estimulados con LPS. Los resultados obtenidos en neutrófilos provenientes de pacientes con EPOC se muestran en las **Tablas 21 y 22**, los resultados obtenidos en neutrófilos de pacientes asmáticos se muestran en las **Tablas 23 y 24**.

Los resultados obtenidos fueron similares a los obtenidos en neutrófilos extraídos a partir de sangre de voluntarios sanos, ya que no se observó un mayor potencial antiinflamatorio de estos fármacos en la liberación de IL-8 y MMP-9 de los neutrófilos provenientes de sangre de pacientes con EPOC o asma respecto a los provenientes de sangre de voluntarios sanos. Por este motivo y dado que el acceso a muestras de sangre de pacientes con EPOC o asmáticos es limitado, no se cuantificó la expresión de los marcadores TNF- $\alpha$  y elastasa, tras el tratamiento con los fármacos moduladores de la GCs y el estímulo con LPS. Además, por las mismas razones, tampoco se determinó la concentración de los marcadores inflamatorios producidos por los neutrófilos de estos pacientes al ser tratados con los distintos fármacos del presente trabajo y estimulados con EHT.

IL-8 (ng/ml)		
LPS 1 $\mu$ g/ml	Media	SD
Control (LPS 1 $\mu$ g/ml)	59,67	4,77
Riociguat 100nM	53,62	4,37
Riociguat 1 $\mu$ M	52,12	3,21
Riociguat 10 $\mu$ M	53,26	4,15
Cinaciguat 100 nM	50,12	1,73
Cinaciguat 1 $\mu$ M	52,99	1,92
Cinaciguat 10 $\mu$ M	52,64	4,49
Sildenafil 1 $\mu$ M	51,74	1,24
Sildenafil 1 $\mu$ M + riociguat 100nM	53,65	3,65
Sildenafil 1 $\mu$ M + riociguat 1 $\mu$ M	55,65	2,65
Sildenafil 1 $\mu$ M + riociguat 10 $\mu$ M	55,8	6,51
Sildenafil 1 $\mu$ M + cinaciguat 100 nM	56,87	1,98
Sildenafil 1 $\mu$ M + cinaciguat 1 $\mu$ M	59,21	5,65
Sildenafil 1 $\mu$ M + cinaciguat 10 $\mu$ M	62,38	6,29
Roflumilast 1 $\mu$ M	<b>32,3*</b>	3,84

**Tabla 21.** El tratamiento de los neutrófilos obtenidos a partir de sangre de pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) con cinaciguat y riociguat en presencia o no de sildenafil no impide el incremento de la concentración de IL-8 producido por el LPS. Se obtuvo mediante ELISA la concentración de IL-8 expresada en ng/ml en el sobrenadante de los neutrófilos estimulados con LPS 1  $\mu$ g/ml en presencia de roflumilast 1  $\mu$ M o diferentes concentraciones de cinaciguat o riociguat (100 nM, 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M) con o sin sildenafil 1  $\mu$ M. Los resultados se expresan como la media del incremento de la concentración de IL-8 respecto a

la concentración basal, y se indica la SD obtenida en cada caso. Las comparaciones fueron analizadas mediante test ANOVA unidireccional seguido de un test post hoc de Bonferroni. \*P <0.05 respecto al grupo control estimulado con LPS 1 µg/ml.

MMP-9 (ng/ml)		
LPS 1 µg/ml	Media	SD
Control (LPS 1 µg/ml)	418,26	15,26
Riociguat 100nM	413,97	30,53
Riociguat 1µM	487,18	30,52
Riociguat 10 µM	479,95	34,85
Cinaciguat 100 nM	481,61	48,12
Cinaciguat 1 µM	489,6	32,29
Cinaciguat 10 µM	403,56	114,22
Sildenafil 1 µM	421,85	21,36
Sildenafil 1 µM + riociguat 100nM	413,34	56,36
Sildenafil 1 µM + riociguat 1µM	421,65	25,32
Sildenafil 1 µM + riociguat 10 µM	415,32	30,62
Sildenafil 1 µM + cinaciguat 100 nM	436,21	27,98
Sildenafil 1 µM + cinaciguat 1 µM	414,52	36,56
Sildenafil 1 µM + cinaciguat 10 µM	413,25	29,65
Roflumilast 1 µM	65,65*	28,41

Tabla 22. El tratamiento de los neutrófilos obtenidos a partir de sangre de pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) con cinaciguat y Riociguat en presencia o no de sildenafil no impide el incremento de la concentración de MMP-9 producido por el LPS. Se obtuvo mediante ELISA la concentración de MMP-9 expresada en ng/ml en el sobrenadante de los neutrófilos estimulados con LPS 1 µg/ml en presencia de roflumilast 1 µM o diferentes concentraciones de cinaciguat o riociguat (100 nM, 1 µM, 10 µM) con o sin sildenafil 1 µM. Los resultados se expresan como la media del incremento de la concentración de MMP-9 respecto a la concentración basal, y se indica la SD obtenida en cada caso. Las comparaciones fueron analizadas mediante test ANOVA unidireccional seguido de un test post hoc de Bonferroni. \*P <0.05 respecto al grupo control estimulado con LPS 1 µg/ml.

IL-8 (ng/ml)		
LPS 1 µg/ml	Media	SD
Control (LPS 1 µg/ml)	37,33	4,02
Riociguat 100nM	33,01	3,06
Riociguat 1µM	34,72	4,99
Riociguat 10 µM	32,51	5,27
Cinaciguat 100 nM	30,32	2,5
Cinaciguat 1 µM	27,89	2,59
Cinaciguat 10 µM	32,66	5,84
Sildenafil 1 µM	36,44	2,36
Sildenafil 1 µM + riociguat 100nM	35,98	5,84
Sildenafil 1 µM + riociguat 1µM	34,87	3,72
Sildenafil 1 µM + riociguat 10 µM	35,64	3,36
Sildenafil 1 µM + cinaciguat 100 nM	35,41	2,98

Sildenafil 1 $\mu$ M + cinaciguat 1 $\mu$ M	29,52	2,61
Sildenafil 1 $\mu$ M + cinaciguat 10 $\mu$ M	32,33	2,95
Roflumilast 1 $\mu$ M	<b>14,97*</b>	3,73

**Tabla 23.** El tratamiento de los neutrófilos obtenidos a partir de sangre de pacientes asmáticos con cinaciguat y riociguat en presencia o no de sildenafil no impide el incremento de la concentración de IL-8 producido por el LPS. Se obtuvo mediante ELISA la concentración de IL-8 expresada en ng/ml en el sobrenadante de los neutrófilos estimulados con LPS 1  $\mu$ g/ml en presencia de roflumilast 1  $\mu$ M o diferentes concentraciones de cinaciguat o riociguat (100 nM, 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M) con o sin sildenafil 1  $\mu$ M. Los resultados se expresan como la media del incremento de la concentración de IL-8 respecto a la concentración basal, y se indica la SD obtenida en cada caso. Las comparaciones fueron analizadas mediante test ANOVA unidireccional seguido de un test post hoc de Bonferroni. \*P <0.05 respecto al grupo control estimulado con LPS 1  $\mu$ g/ml.

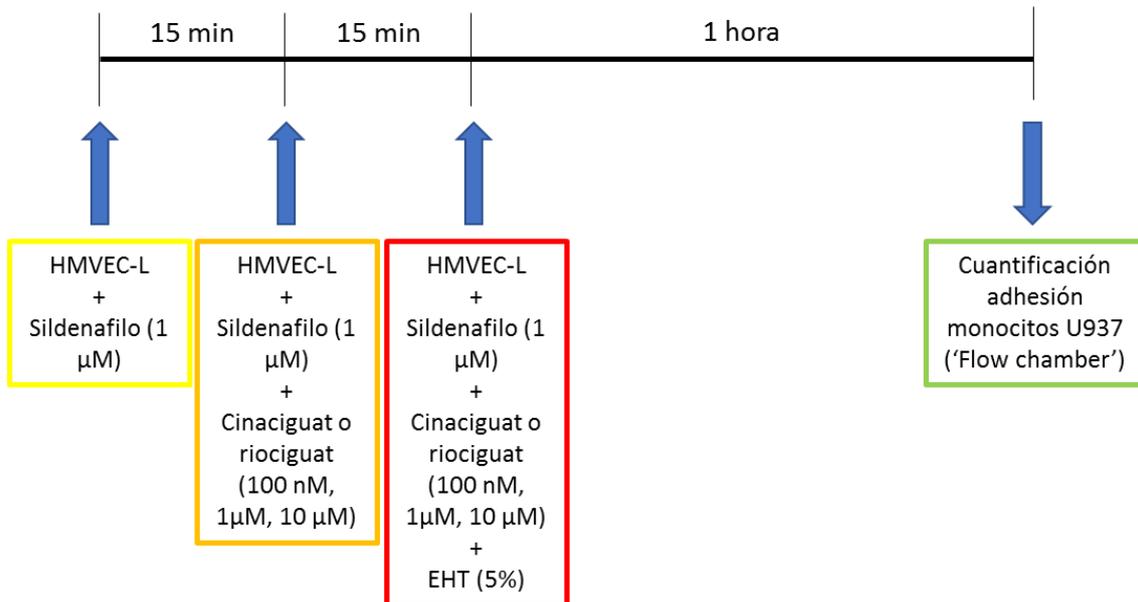
MMP-9 (ng/ml)		
LPS 1 $\mu$ g/ml	Media	SD
Control (LPS 1 $\mu$ g/ml)	415,79	58,43
Riociguat 100nM	441,18	98,65
Riociguat 1 $\mu$ M	459,1	68,38
Riociguat 10 $\mu$ M	432,6	68,19
Cinaciguat 100 nM	339,36	78,88
Cinaciguat 1 $\mu$ M	321,15	49,09
Cinaciguat 10 $\mu$ M	350,3	88,81
Sildenafil 1 $\mu$ M	412,35	54,82
Sildenafil 1 $\mu$ M + riociguat 100nM	433,65	55,27
Sildenafil 1 $\mu$ M + riociguat 1 $\mu$ M	438,91	63,87
Sildenafil 1 $\mu$ M + riociguat 10 $\mu$ M	398,62	65,91
Sildenafil 1 $\mu$ M + cinaciguat 100 nM	384,53	85,34
Sildenafil 1 $\mu$ M + cinaciguat 1 $\mu$ M	402,38	52,73
Sildenafil 1 $\mu$ M + cinaciguat 10 $\mu$ M	414,87	54,86
Roflumilast 1 $\mu$ M	<b>136,08*</b>	63,27

**Tabla 24.** El tratamiento de los neutrófilos obtenidos a partir de sangre de pacientes asmáticos con cinaciguat y riociguat en presencia o no de sildenafil no impide el incremento de la concentración de MMP-9 producido por el LPS. Se obtuvo mediante ELISA la concentración de MMP-9 expresada en ng/ml en el sobrenadante de los neutrófilos estimulados con LPS 1  $\mu$ g/ml en presencia de roflumilast 1  $\mu$ M o diferentes concentraciones de cinaciguat o riociguat (100 nM, 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M) con o sin sildenafil 1  $\mu$ M. Los resultados se expresan como la media del incremento de la concentración de MMP-9 respecto a la concentración basal, y se indica la SD obtenida en cada caso. Las comparaciones fueron analizadas mediante test ANOVA unidireccional seguido de un test post hoc de Bonferroni. \*P <0.05 respecto al grupo control estimulado con LPS 1  $\mu$ g/ml.

#### 4.2.2 Efecto sobre la adhesión y la migración de las células inflamatorias

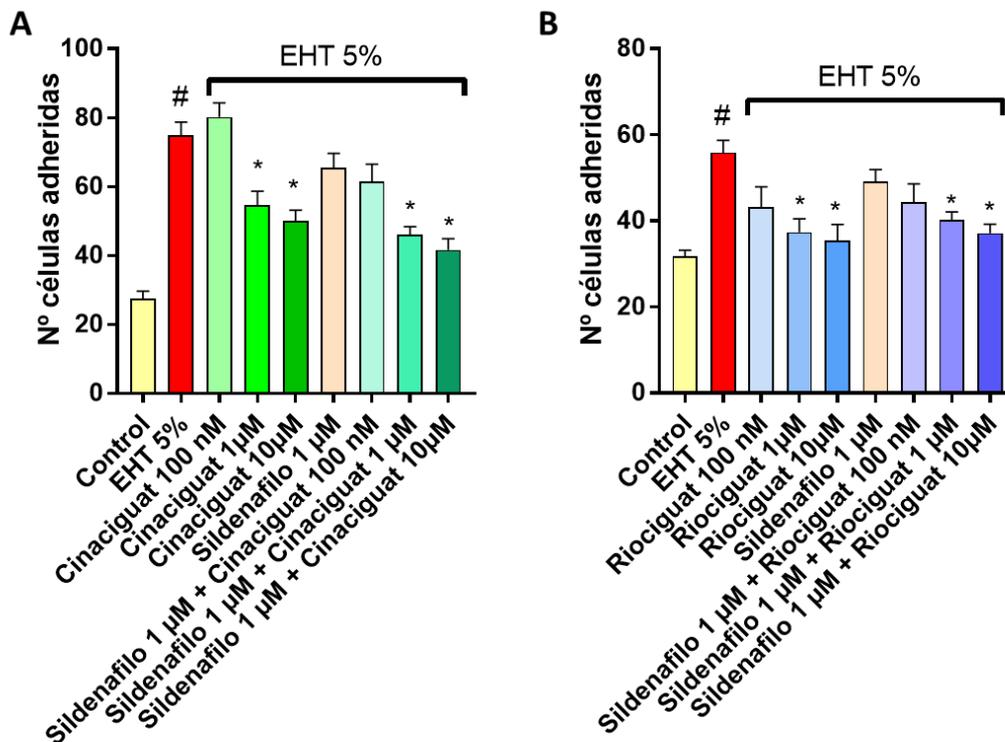
El ensayo de adhesión consistió en la técnica 'Flow chamber' por la que las células inflamatorias en suspensión U937 se perfundieron sobre una monocapa de endotelio (HMVEC-L) y se contabilizó el número de células U937 adheridas. Previamente al ensayo, las HMVEC-L fueron tratadas con los fármacos cinaciguat y riociguat en presencia o ausencia de sildenafil y estimuladas con EHT tal y como se muestra en la **Figura 44**. El

estímulo de adhesión EHT se ha utilizado en los ensayos con HMVEC-L a una concentración del 5%, siguiendo los resultados previos publicados <sup>110</sup>.



**Figura 44. Protocolo de la cuantificación de la adhesión de monocitos a una monocapa de células endoteliales (HMVEC-L) tratadas con cinaciguat o riociguat, con o sin sildenafil, y estimuladas con extracto de humo de tabaco (EHT).** Las HMVEC-L fueron incubadas con sildenafil (1 μM) durante 15 minutos, seguido de la incubación con cinaciguat o riociguat (100 nM, 1 μM, 10 μM), en presencia o ausencia de sildenafil, durante otros 15 minutos. A continuación, se añadió 5% de EHT y se incubaron 1 hora, momento en el cual se cuantificó la adhesión de los monocitos U937 a la monocapa de HMVEC-L mediante la técnica 'Flow chamber'. Imagen creada con PowerPoint.

En la **Figura 45** se observa que el número de células U937 adheridas a la monocapa de células endoteliales aumenta cuando se estimulan 1 hora con EHT al 5% las HMVEC-L. Dicho incremento de la adhesión disminuye significativamente al ser tratadas con cinaciguat o riociguat (1 μM y 10 μM), tanto en presencia de sildenafil 1 μM como en ausencia del mismo. Además, en la **Figura 45** se observa que la disminución de la adhesión de los monocitos provocada por los fármacos riociguat y cinaciguat ocurre de manera dosis-dependiente.



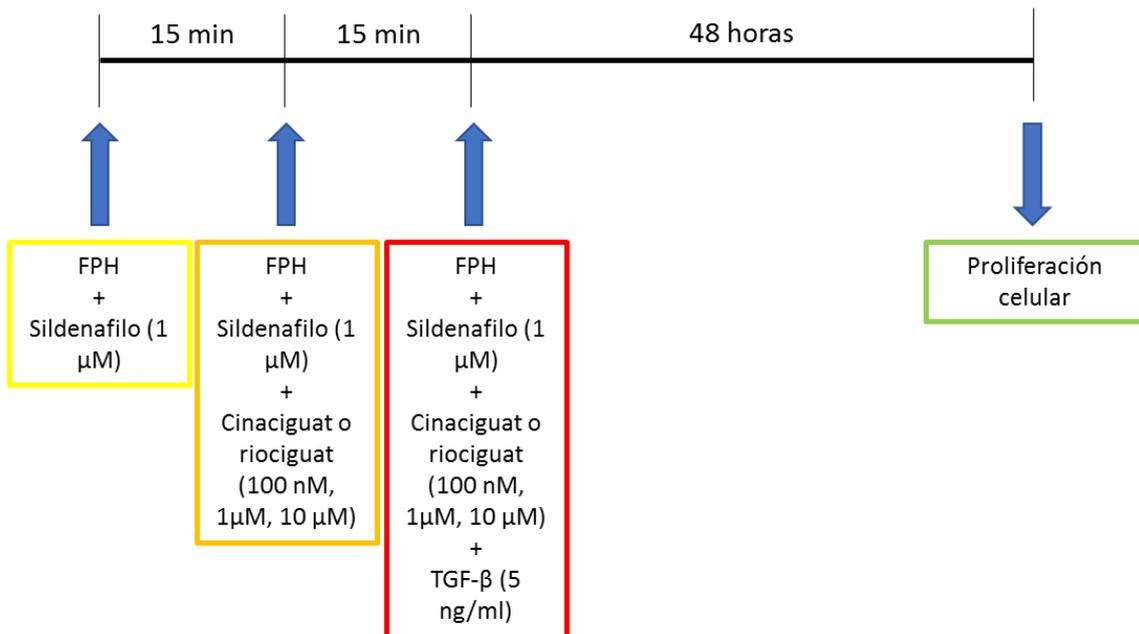
**Figura 45.** El tratamiento de las células endoteliales HMVEC-L con cinaciguat o riociguat, tanto en presencia como en ausencia de sildenafil, revierte la adhesión celular provocada por el extracto del humo de tabaco (EHT). Mediante la técnica ‘Flow chamber’ se midió la adhesión de las células inflamatorias U937 en una monocapa de células endoteliales. A) Se trataron las células durante 15 minutos con sildenafil 1 µM, seguido de 15 minutos con cinaciguat 100 nM, 1 µM y 10 µM (en presencia o ausencia de sildenafil) y se estimularon 1 hora con EHT al 5%. B) Se trataron las células durante 15 minutos con sildenafil 1 µM, seguido de 15 minutos con riociguat 100 nM, 1 µM y 10 µM (en presencia o ausencia de sildenafil 1 µM) y se estimularon 1 hora con EHT al 5%. Los resultados se expresan como la media ± SD. Las comparaciones fueron analizadas mediante test ANOVA unidireccional seguido de un test post hoc de Bonferroni. #P <0.05 respecto al control. \*P<0.05 respecto al estímulo EHT 5%.

### 4.3 Efecto de los fármacos moduladores de la guanilato ciclasa soluble en el remodelado pulmonar

#### 4.3.1 En fibroblastos pulmonares humanos

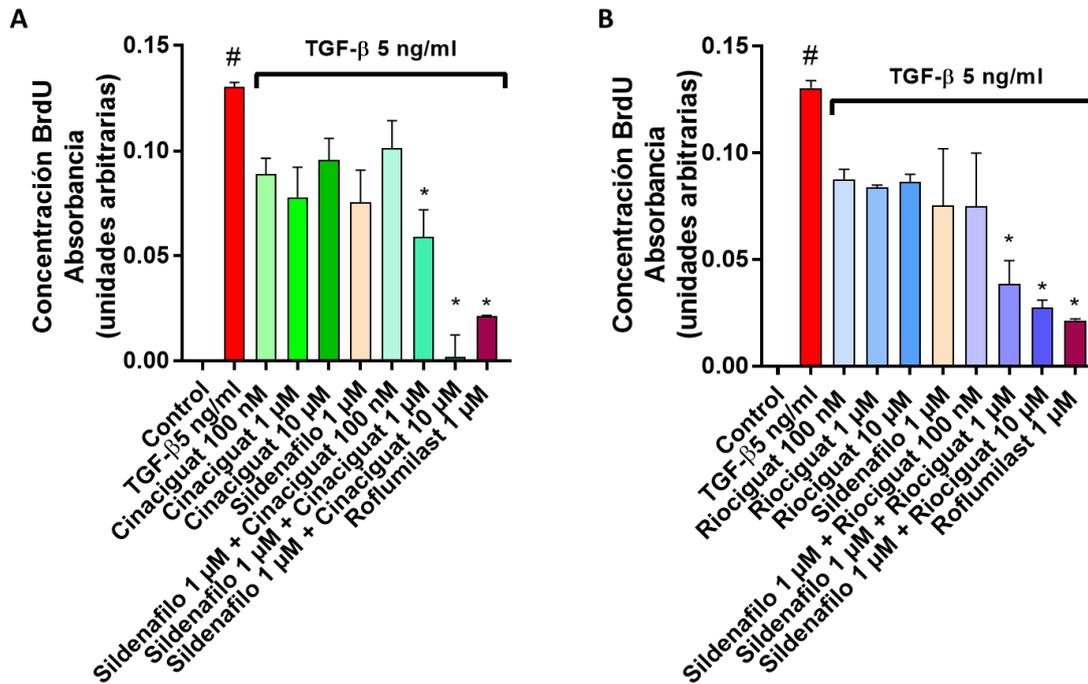
##### 4.3.1.1 Proliferación

Para el estudio de proliferación los FPH fueron tratados tal y como se puede observar en la **Figura 46**. Paralelamente, una parte de los FPH se trataron 30 minutos con roflumilast 1 µM seguido del mismo estímulo con TGF-β. Este fármaco previene la proliferación de fibroblastos pulmonares<sup>153</sup> por lo que se utilizó como control positivo en este experimento.



**Figura 46. Protocolo para la medida de la proliferación de fibroblastos pulmonares humanos (FPH) tratados con cinaciguat o riociguat, con o sin sildenafil, y estimulados con TGF-β.** Los FPH se incubaron con sildenafil (1 μM) durante 15 minutos, seguido de la incubación con cinaciguat o riociguat (100 nM, 1 μM, 10 μM), en presencia o ausencia de sildenafil, durante otros 15 minutos. A continuación, se añadió TGF-β a una concentración de 5 ng/ml y se incubaron 48 horas, momento en el cual determinó la proliferación celular mediante inmunoensayo colorimétrico basado en la incorporación de la bromodesoxiuridina (BrdU). Imagen creada con PowerPoint.

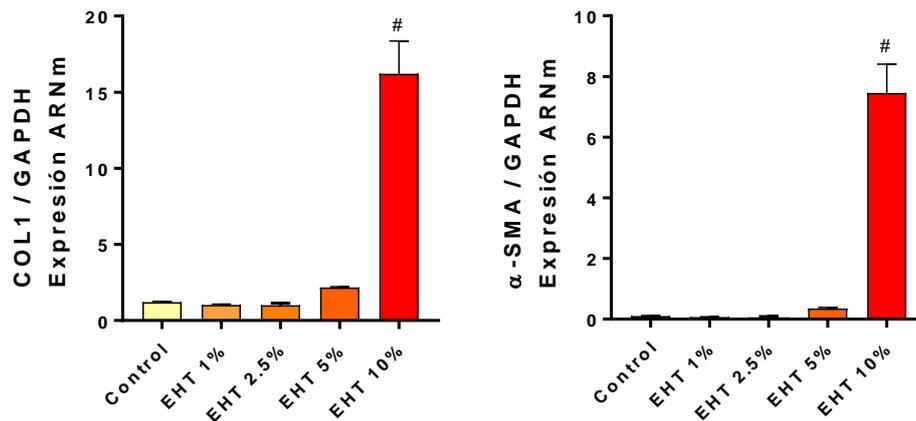
Como se observa en la **Figura 47**, el estímulo TGF-β consiguió incrementar la proliferación de los fibroblastos de manera significativa y, únicamente las concentraciones más altas de cinaciguat y riociguat (1 μM y 10 μM) en presencia de sildenafil 1 μM consiguieron revertir de manera significativa dicho incremento.



**Figura 47. El Cinaciguat y el riociguat en presencia de sildenafil inhiben la hiperproliferación de los fibroblastos pulmonares humanos (FPH).** La proliferación celular se evaluó mediante el ensayo de bromodesoxiuridina (BrdU) durante 48 h. A) Se trataron las células durante 15 minutos con sildenafil 1 μM, seguido de 15 minutos con cinaciguat 100 nM, 1 μM y 10 μM (en presencia o ausencia de sildenafil) y se estimuló la proliferación con 5 ng/ml de TGF-β durante 48 horas. B) Se trataron las células durante 15 minutos con sildenafil 1 μM, seguido de 15 minutos con riociguat 100 nM, 1 μM y 10 μM (en presencia o ausencia de sildenafil 1 μM) y se estimuló la proliferación con 5 ng/ml de TGF-β durante 48 horas. Los resultados se expresan como la media del incremento de BrdU ± SD. Las comparaciones fueron analizadas mediante test ANOVA unidireccional seguido de un test post hoc de Bonferroni. #P <0.05 respecto al control. \*P<0.05 respecto al estímulo TGF-β 5 ng/ml.

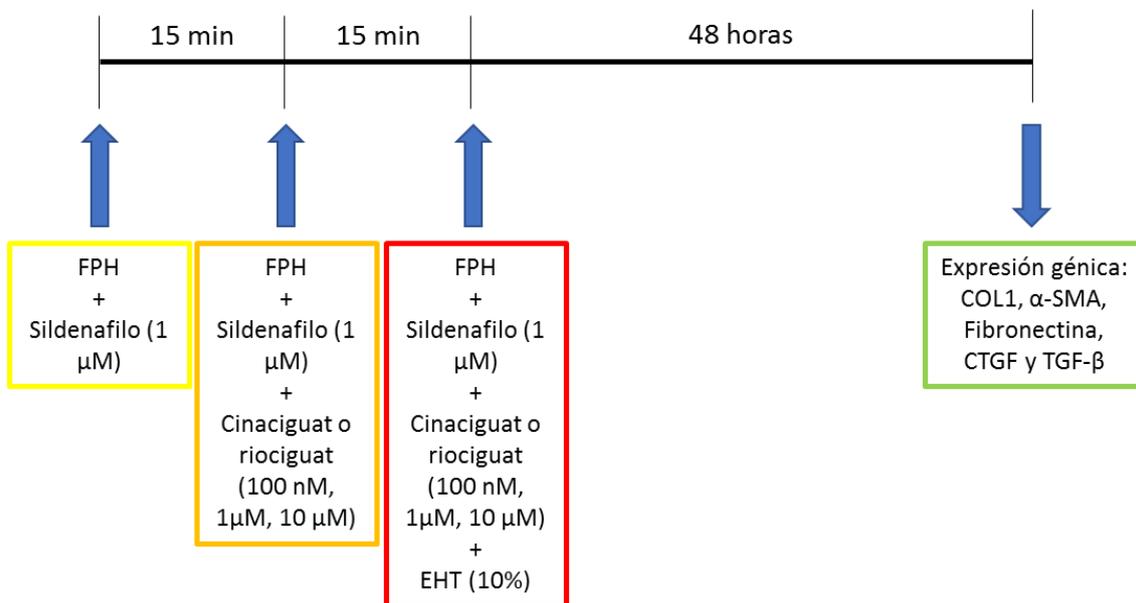
#### 4.3.1.2 Expresión de los marcadores de la transición fibroblasto mesenquimal

En primer lugar, se realizaron pruebas preliminares para determinar la dosis óptima del estímulo EHT a utilizar en los experimentos con FPH. Para ello, se incubaron las células con diferentes concentraciones de EHT durante 48 horas y se midió la expresión de los marcadores mesenquimales COL1 y α-SMA (**Figura 48**). A partir de los resultados obtenidos, se seleccionó la concentración de 10% de EHT para todos los experimentos en FPH.



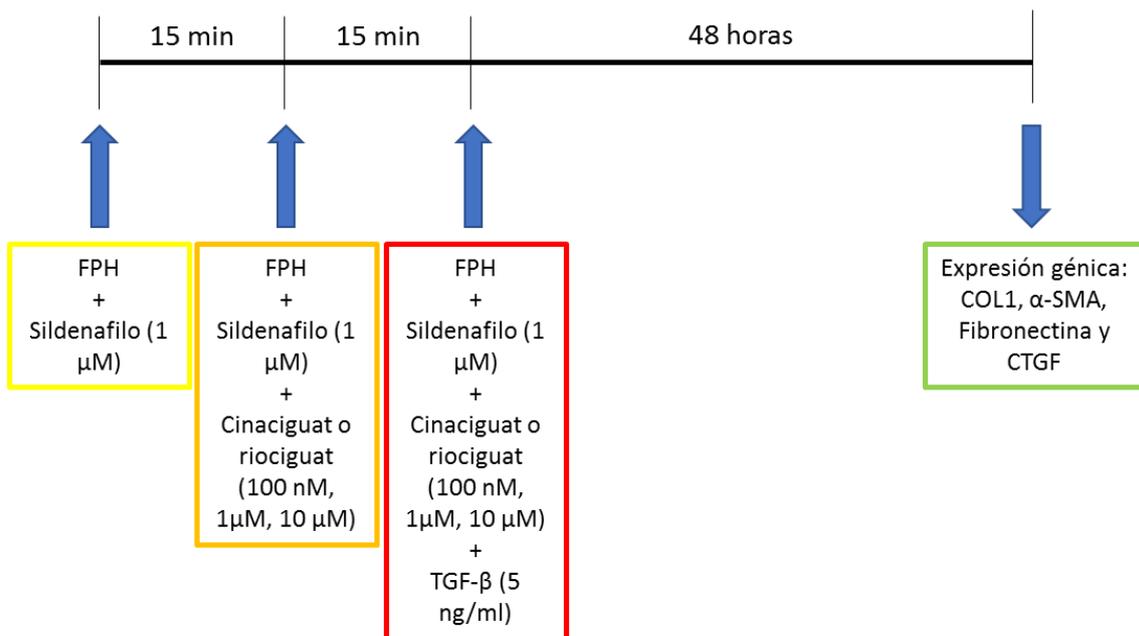
**Figura 48.** El extracto de humo de tabaco (EHT) aumenta la expresión de los marcadores mesenquimales en fibroblastos pulmonares humanos (FPH) de manera dosis dependiente. La expresión génica de los marcadores de la transición fibroblasto mesenquimal (TFM): COL1 y  $\alpha$ -SMA se cuantificó mediante retrotranscripción (RT) y PCR a tiempo real tras estimular los FPH con diferentes concentraciones de EHT durante 48 h. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SD. Las comparaciones fueron analizadas mediante test ANOVA unidireccional seguido de un test post hoc de Bonferroni. #P <0.05 respecto al control.

Posteriormente, se estudió el efecto de los fármacos moduladores de la GCs en la expresión génica de los marcadores de la TFM: COL1,  $\alpha$ -SMA, fibronectina, CTGF y TGF- $\beta$  en FPH. Para ello, los FPH se trataron según se indica en las **Figuras 49 y 50**.



**Figura 49.** Protocolo para la medida de los marcadores de la transición fibroblasto mesenquimal (TFM) en fibroblastos pulmonares humanos (FPH) tratados con cinaciguat o riociguat, con o sin sildenafil, y estimulados con extracto de humo de tabaco (EHT). Los FPH se incubaron con sildenafil (1  $\mu$ M) durante 15 minutos, seguido de la incubación con cinaciguat o riociguat (100 nM, 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M), en presencia o ausencia de sildenafil, durante otros 15 minutos. A continuación, se añadió EHT al 10% y se incubaron 48 horas, momento en el cual determinó la expresión génica de los marcadores de la TFM: COL1,  $\alpha$ -SMA, fibronectina, CTGF y TGF- $\beta$ . Imagen creada con PowerPoint.

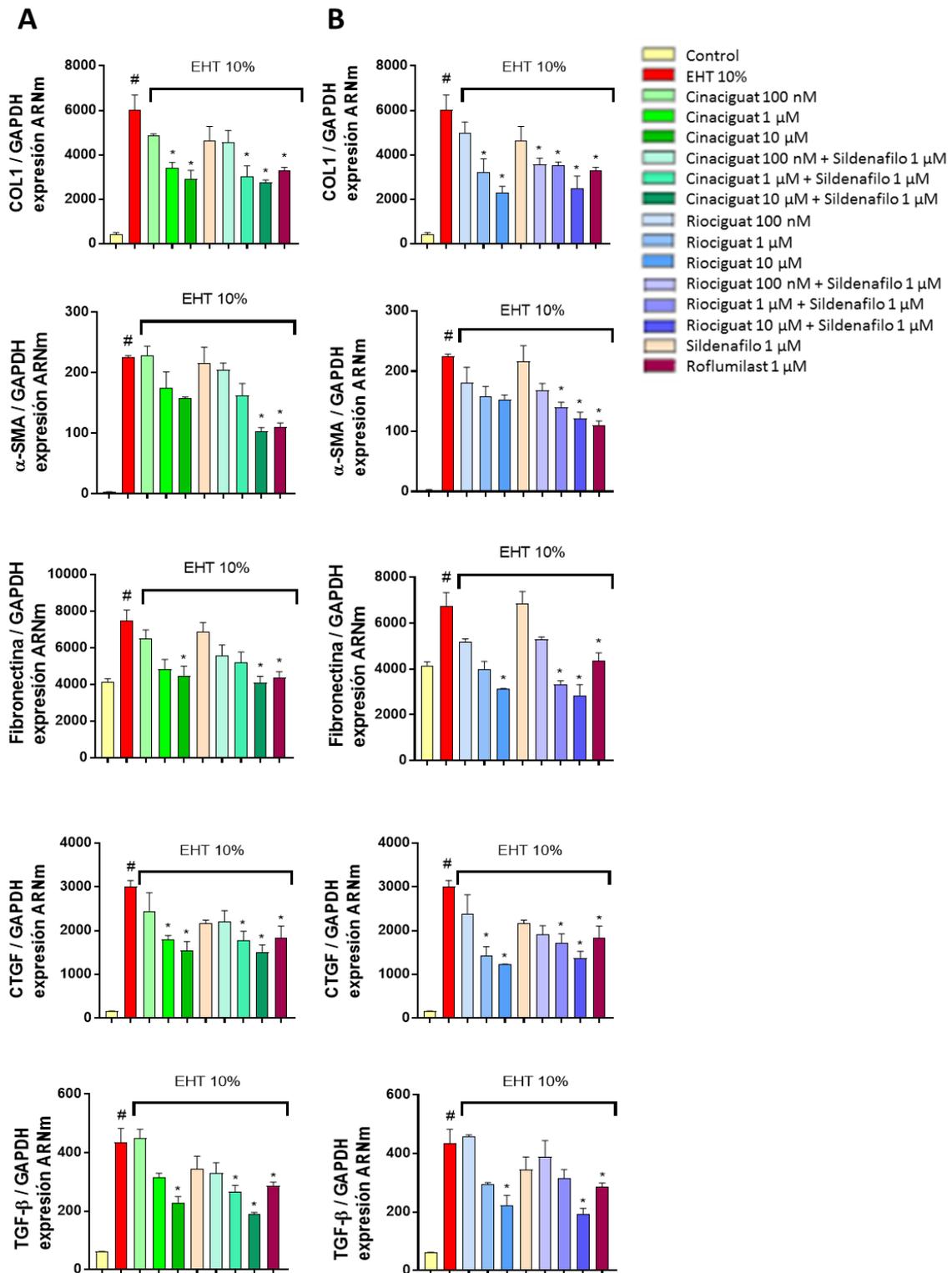
## RESULTADOS



**Figura 50. Protocolo para la medida de los marcadores de la transición fibroblasto mesenquimal (TFM) en fibroblastos pulmonares humanos (FPH) tratados con cinaciguat o riociguat, con o sin sildenafil, y estimulados con TGF-β.** Los FPH se incubaron con sildenafil (1 μM) durante 15 minutos, seguido de la incubación con cinaciguat o riociguat (100 nM, 1 μM, 10 μM), en presencia o ausencia de sildenafil, durante otros 15 minutos. A continuación, se añadió TGF-β a una concentración de 5 ng/ml y se incubaron 48 horas, momento en el cual determinó la expresión génica de los marcadores de la TFM: COL1, α-SMA, fibronectina y CTGF. Imagen creada con PowerPoint.

Todos los marcadores de la TFM aumentaron su expresión significativamente respecto al control tras estimular a los FPH con EHT al 10% (**Figura 51**) o TGF-β 5 ng/ml (**Figura 52**) durante 48 horas. Además, se observó que tanto en el caso de las células estimuladas con EHT, como en el caso de las células estimuladas con TGF-β, los fármacos cinaciguat y riociguat en presencia y ausencia de sildenafil 1 μM consiguieron atenuar el incremento de estos marcadores de la TFM. Sin embargo, el sildenafil 1 μM únicamente no mostró efecto en la disminución de la TFM. De nuevo, se utilizó el roflumilast a una concentración de 1 μM como control positivo de estos experimentos **Figuras 51 y 52**.

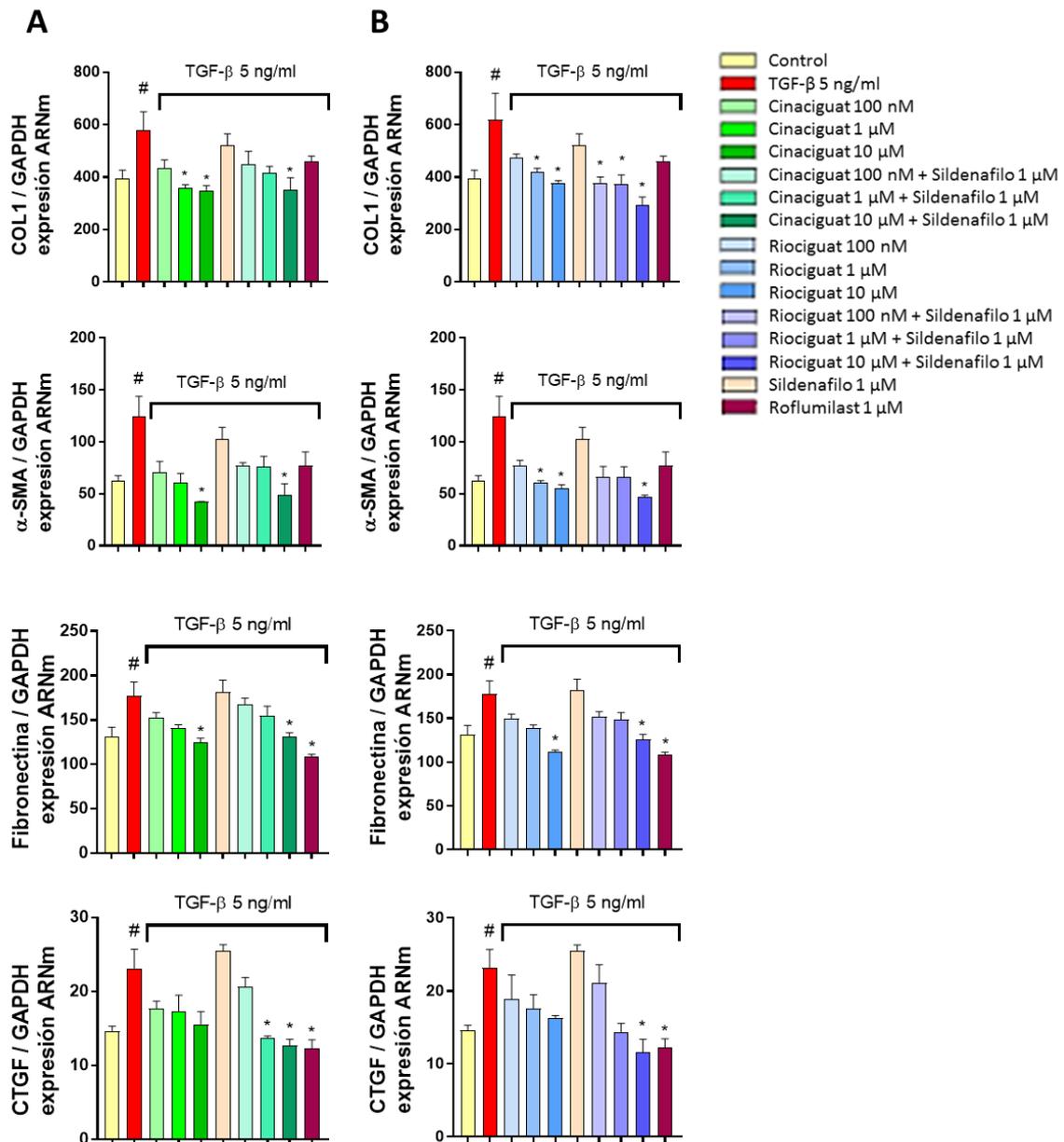
Además, en el caso de los FPH estimulados durante 48 horas con EHT 10% se midió la expresión génica del factor de crecimiento TGF-β. La expresión de TGF-β incrementó tras el estímulo con el EHT y, el cinaciguat y el riociguat, en presencia o ausencia de sildenafil, consiguieron atenuar ese incremento (**Figura 51**). Por este motivo y debido a la similitud de los resultados obtenidos tras estimular los FPH con EHT o con TGF-β el resto de los experimentos que se realizaron para el estudio de la TFM se realizaron únicamente con el estímulo TGF-β 5 ng/ml.



**Figura 51. Cinaciguat y riociguat en presencia y ausencia de sildenafil disminuyen el incremento de la expresión génica de los marcadores de la transición fibroblasto mesénquima (TFM) provocado por el extracto de humo de tabaco (EHT) en fibroblastos pulmonares humanos (FPH).** La expresión génica de los marcadores de TFM: COL1,  $\alpha$ -SMA, fibronectina, CTGF y TGF- $\beta$  se cuantificó mediante retrotranscripción (RT) y PCR a tiempo real. A) Expresión génica de los marcadores de TFM en FPH incubados 15 minutos con sildenafil 1  $\mu\text{M}$ , seguido de 15 minutos con cinaciguat (100 nM, 1  $\mu\text{M}$  y 10  $\mu\text{M}$ ), en presencia o ausencia de sildenafil 1  $\mu\text{M}$  y estimulados con EHT 10% durante 48 h. B) Expresión génica de los marcadores de TFM en FPH incubados 15 minutos con sildenafil 1  $\mu\text{M}$ , seguido de 15 minutos con riociguat (100 nM, 1  $\mu\text{M}$  y 10  $\mu\text{M}$ ), en presencia o ausencia de

## RESULTADOS

sildenafil 1  $\mu\text{M}$  y estimulados con EHT 10% durante 48 h. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SD. Las comparaciones fueron analizadas mediante test ANOVA unidireccional seguido de un test post hoc de Bonferroni.  $\#P < 0.05$  respecto al control.  $*P < 0.05$  respecto al estímulo EHT 10%.



**Figura 52. Cinaciguat y riociguat en presencia y ausencia de sildenafil disminuyen el incremento de la expresión génica de los marcadores de la transición fibroblasto mesénquima (TFM) provocada por TGF- $\beta$  en fibroblastos pulmonares humanos (FPH).** La expresión génica de los marcadores de TFM: COL1,  $\alpha$ -SMA, fibronectina y CTGF se cuantificó mediante retrotranscripción (RT) y PCR a tiempo real. A) Expresión génica de los marcadores de TFM en FPH incubados 15 minutos con sildenafil 1  $\mu\text{M}$ , seguido de 15 minutos con cinaciguat (100 nM, 1  $\mu\text{M}$  y 10  $\mu\text{M}$ ), en presencia o ausencia de sildenafil 1  $\mu\text{M}$  y estimulados con 5 ng/ml de TGF- $\beta$  durante 48 h. B) Expresión génica de los marcadores de TFM en FPH incubados 15 minutos con sildenafil 1  $\mu\text{M}$ , seguido de 15 minutos con riociguat (100 nM, 1  $\mu\text{M}$  y 10  $\mu\text{M}$ ), en presencia o ausencia de sildenafil 1  $\mu\text{M}$  y estimulados con 5 ng/ml de TGF- $\beta$  durante 48 h. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SD. Las comparaciones fueron analizadas mediante test ANOVA unidireccional seguido de un test post hoc de Bonferroni.  $\#P < 0.05$  respecto al control.  $*P < 0.05$  respecto al estímulo TGF- $\beta$  5 ng/ml.

A continuación, se estudió si la expresión proteica de los marcadores de la TFM coincidía con la expresión génica. Para ello se midió la expresión proteica de los marcadores COL1 y  $\alpha$ -SMA tras la incubación de los FPH con los fármacos y TGF- $\beta$  los mismos tiempos que se muestran en la **Figura 50**.

Tal y como se observa en la **Figura 53**, la expresión de estos marcadores también se ve incrementada tras estimular los FPH con TGF- $\beta$  5 ng/ml. Como en el caso de la expresión génica, el tratamiento previo de los FPH con los fármacos cinaciguat y riociguat (en presencia o ausencia de sildenafil) consiguió atenuar ese incremento de la expresión provocado por el estímulo con TGF- $\beta$  de manera dosis dependiente.

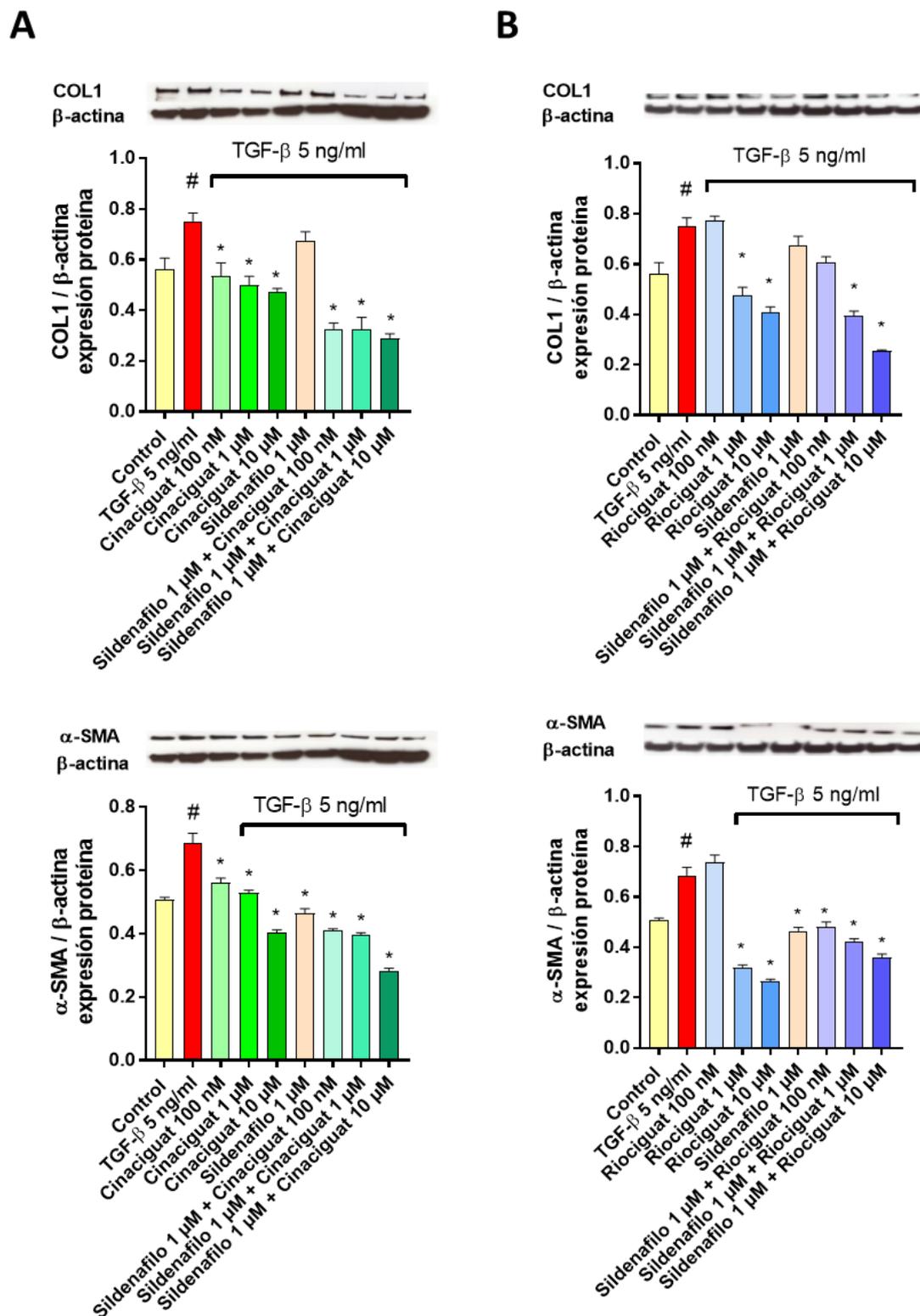
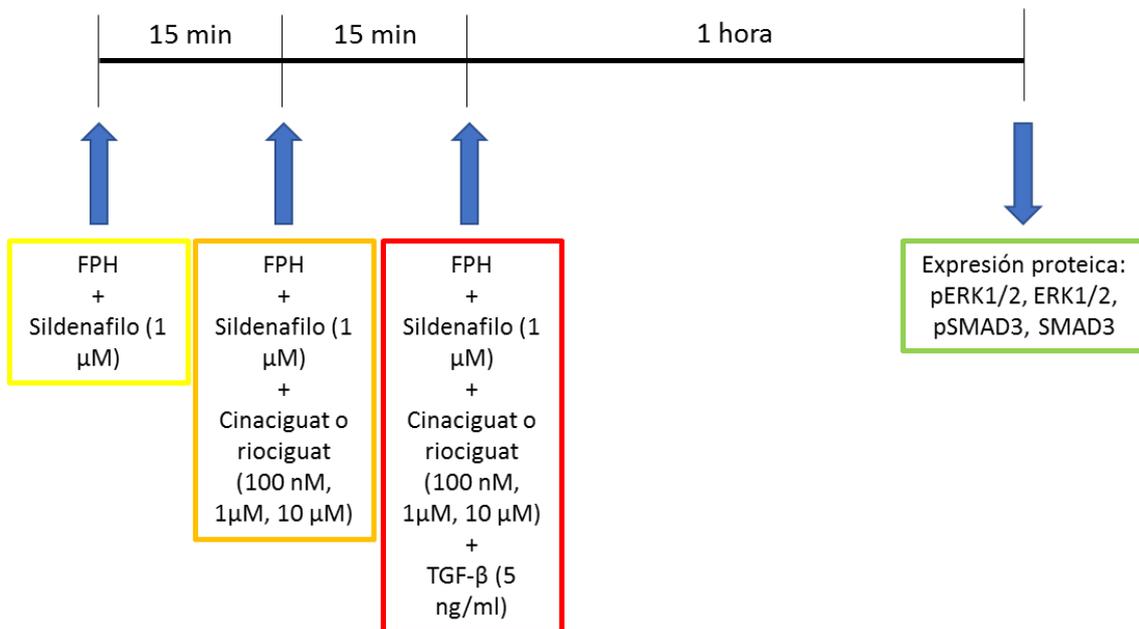


Figura 53. Cinaciguat y riociguat en presencia y ausencia de sildenafil disminuyen el incremento de la expresión proteica de los marcadores de la transición fibroblasto mesénquima (TFM) provocada por TGF- $\beta$  en fibroblastos pulmonares humanos (FPH). La expresión proteica de los marcadores de TFM: COL1 y  $\alpha$ -SMA se analizó mediante Western Blot y se cuantificó mediante densitometría con respecto al control interno  $\beta$ -actina. A) Expresión proteica de los marcadores de TFM en FPH incubados 15 minutos con sildenafil 1  $\mu$ M, seguido de 15 minutos con cinaciguat (100 nM, 1  $\mu$ M y 10  $\mu$ M), en presencia o ausencia de sildenafil 1  $\mu$ M y estimulados con

5 ng/ml de TGF- $\beta$  durante 48 h. B) Expresión proteica de los marcadores de TFM en FPH incubados 15 minutos con sildenafil 1  $\mu$ M, seguido de 15 minutos con riociguat (100 nM, 1  $\mu$ M y 10  $\mu$ M), en presencia o ausencia de sildenafil 1  $\mu$ M y estimulados con 5 ng/ml de TGF- $\beta$  durante 48 h. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SD. Las comparaciones fueron analizadas mediante test ANOVA unidireccional seguido de un test post hoc de Bonferroni. #P <0.05 respecto al control. \*P<0.05 respecto al estímulo TGF- $\beta$  5 ng/ml.

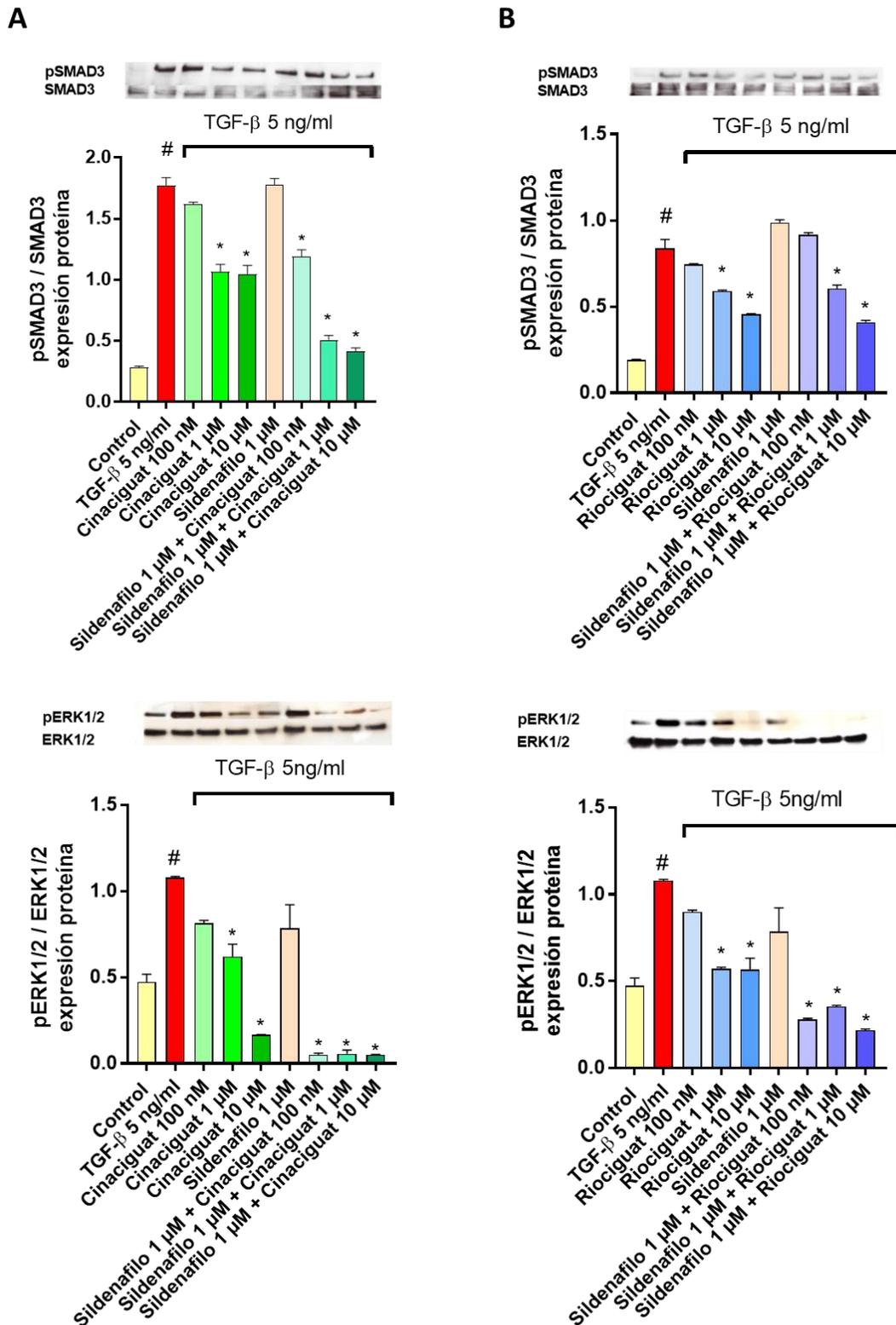
#### 4.3.1.3 Fosforilación de ERK1/2 y SMAD3

Para dilucidar como los fármacos moduladores de la enzima GCs actúan sobre la TFM inducida por TGF- $\beta$  se trataron los FPH tal y como se muestra en el esquema de la **Figura 54**. El objetivo de este ensayo fue evaluar el efecto de estos fármacos en la fosforilación de las proteínas ERK1/2 y SMAD3 implicadas en la señalización de TGF- $\beta$ .



**Figura 54. Protocolo para la medida de la fosforilación de ERK1/2 y SMAD3 en fibroblastos pulmonares humanos (FPH) tratados con cinaciguat o riociguat, con o sin sildenafil, y estimulados con TGF- $\beta$ .** Los FPH se incubaron con sildenafil (1  $\mu$ M) durante 15 minutos, seguido de la incubación con cinaciguat o riociguat (100 nM, 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M), en presencia o ausencia de sildenafil, durante otros 15 minutos. A continuación, se añadió TGF- $\beta$  a una concentración de 5 ng/ml y se incubaron 1 hora, momento en el cual determinó la expresión proteica de pERK1/2, ERK1/2, pSMAD3 y SMAD3. Imagen creada con PowerPoint.

Tanto el cinaciguat como el riociguat, en presencia y ausencia de sildenafil, consiguieron atenuar la fosforilación de SMAD3 de manera dosis dependiente. Por otro lado, el cinaciguat y el riociguat en ausencia de sildenafil consiguieron atenuar de manera dosis dependiente la fosforilación de ERK1/2. Además, cabe destacar que todas las concentraciones de cinaciguat y riociguat testadas en combinación con el sildenafil 1  $\mu$ M consiguieron evitar de manera completa la fosforilación de ERK1/2, pues en estos casos se obtuvo niveles de proteína fosforilada similares o menores a los de las células control (**Figura 55**).



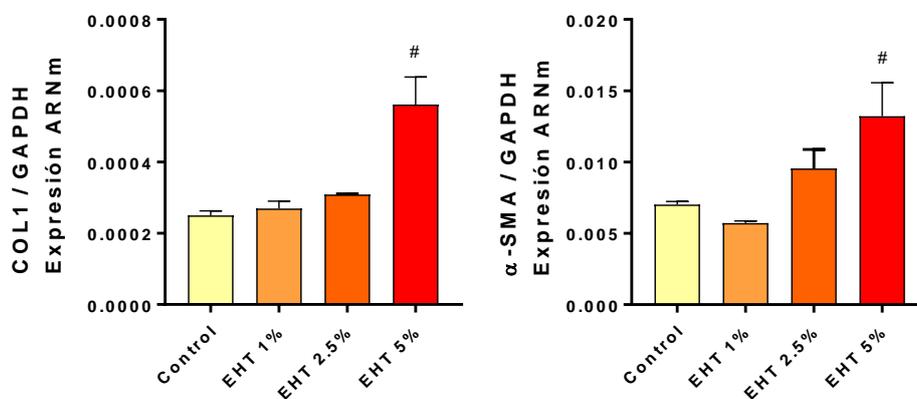
**Figura 55. Cinaciguat y riociguat en presencia y ausencia de sildenafil evitan la fosforilación de ERK1/2 y SMAD3 producida por TGF-β en fibroblastos pulmonares humanos (FPH).** La expresión proteica de pERK1/2 y pSMAD3 se analizó mediante Western Blot y se cuantificó mediante densitometría con respecto a los niveles de proteína sin fosforilar. A) Expresión proteica de pERK1/2 y pSMAD3 en FPH incubados 15 minutos con sildenafil 1 μM, seguido de 15 minutos con cinaciguat (100 nM, 1 μM y 10 μM), en presencia o ausencia de sildenafil 1 μM y estimulados con 5 ng/ml de TGF-β durante 1 h. B) Expresión proteica de pERK1/2 y pSMAD3 en FPH incubados 15 minutos con sildenafil 1 μM, seguido de 15 minutos con riociguat (100 nM, 1 μM y 10 μM), en presencia o

ausencia de sildenafilo 1  $\mu$ M y estimulados con 5 ng/ml de TGF- $\beta$  durante 1 h. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SD. Las comparaciones fueron analizadas mediante test ANOVA unidireccional seguido de un test post hoc de Bonferroni. #P <0.05 respecto al control. \*P <0.05 respecto al estímulo TGF- $\beta$  5 ng/ml.

### 4.3.2 En células epiteliales de bronquio humano

#### 4.3.2.1 Expresión de los marcadores de la transición epitelio mesenquimal

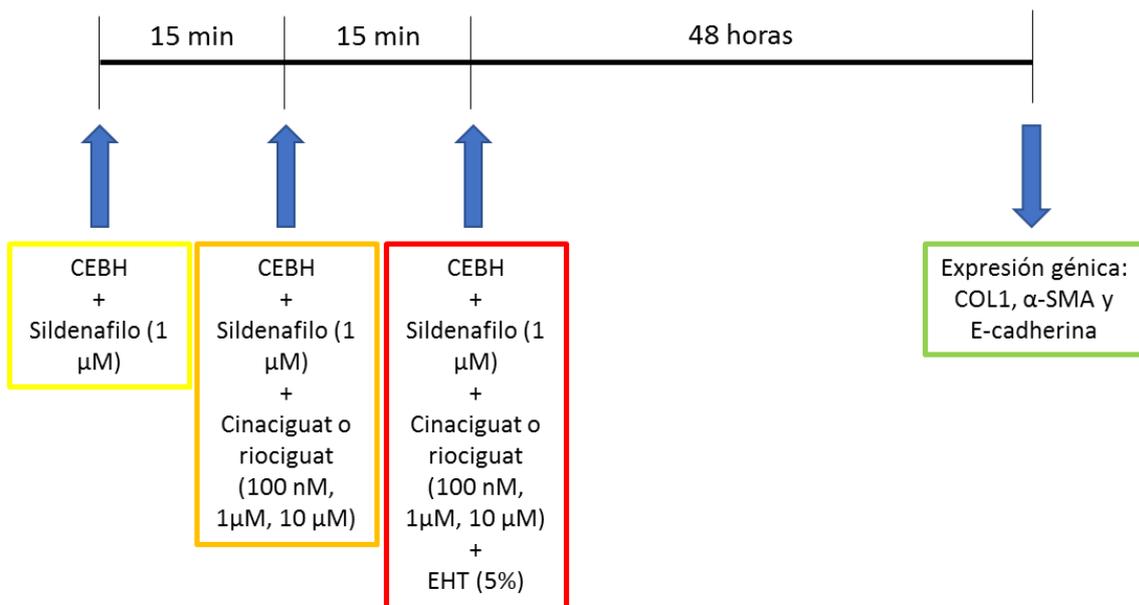
En primer lugar, igual que en el caso de los FPH, se realizaron pruebas preliminares para establecer la concentración de EHT óptima para el estímulo de la TEM. Para ello, se incubaron las CEBH con diferentes concentraciones de EHT durante 48 horas y se midió la expresión de los marcadores fibróticos COL1 y  $\alpha$ -SMA (Figura 56). Con los resultados obtenidos, se escogió la concentración de EHT 5% que se utilizó también para el resto de los experimentos realizados en CEBH.



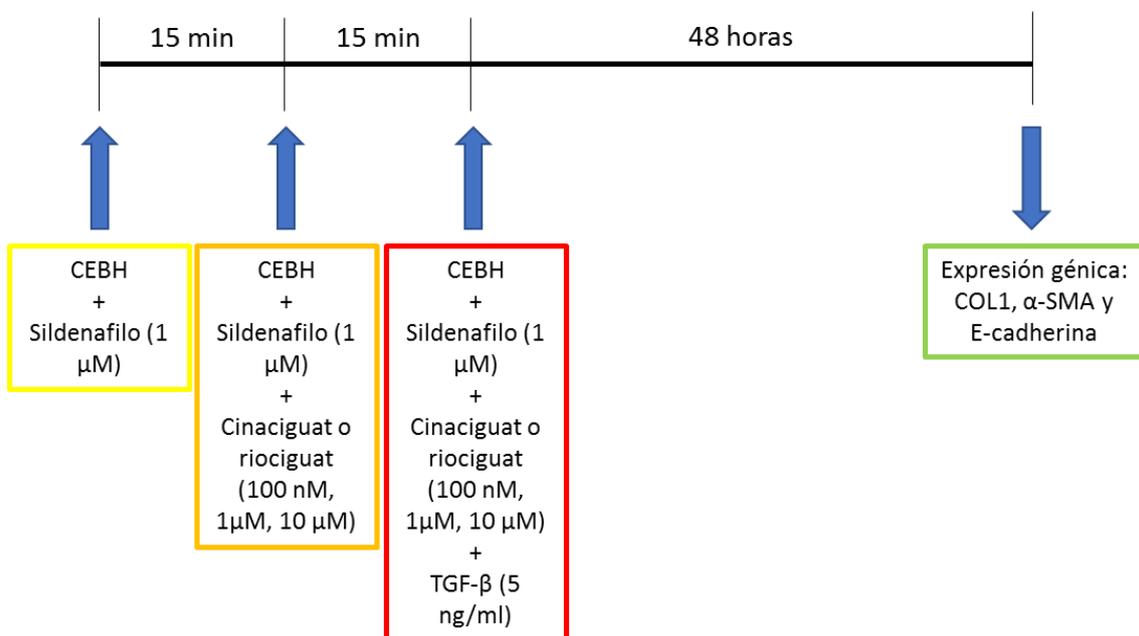
**Figura 56. El extracto de humo de tabaco (EHT) aumenta la expresión de los marcadores mesenquimales en células epiteliales de bronquio humano (CEBH) de manera dosis dependiente.** La expresión génica de los marcadores de la transición epitelio mesenquimal (TEM): COL1 y  $\alpha$ -SMA se cuantificó mediante retrotranscripción (RT) y PCR a tiempo real tras estimular las CEBH con diferentes concentraciones de EHT durante 48 h. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SD. Las comparaciones fueron analizadas mediante test ANOVA unidireccional seguido de un test post hoc de Bonferroni. #P <0.05 respecto al control.

A continuación, se estudió el efecto de los fármacos moduladores de la GCs en la TEM. Para ello se midió la expresión génica de los marcadores COL1,  $\alpha$ -SMA, y E-cadherina en CEBH tras tratar las células siguiendo el esquema que se muestra en las Figuras 57 y 58.

## RESULTADOS



**Figura 57. Protocolo para la medida de los marcadores de la transición epitelio mesenquimal (TEM) en células epiteliales de bronquio humano (CEBH) tratadas con cinaciguat o riociguat, con o sin sildenafil, y estimuladas con extracto de humo de tabaco (EHT).** Las CEBH se incubaron con sildenafil (1  $\mu$ M) durante 15 minutos, seguido de la incubación con cinaciguat o riociguat (100 nM, 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M), en presencia o ausencia de sildenafil, durante otros 15 minutos. A continuación, se añadió EHT al 5% y se incubaron 48 horas, momento en el cual determinó la expresión génica de los marcadores de la TEM: COL1,  $\alpha$ -SMA y E-cadherina. Imagen creada con PowerPoint.

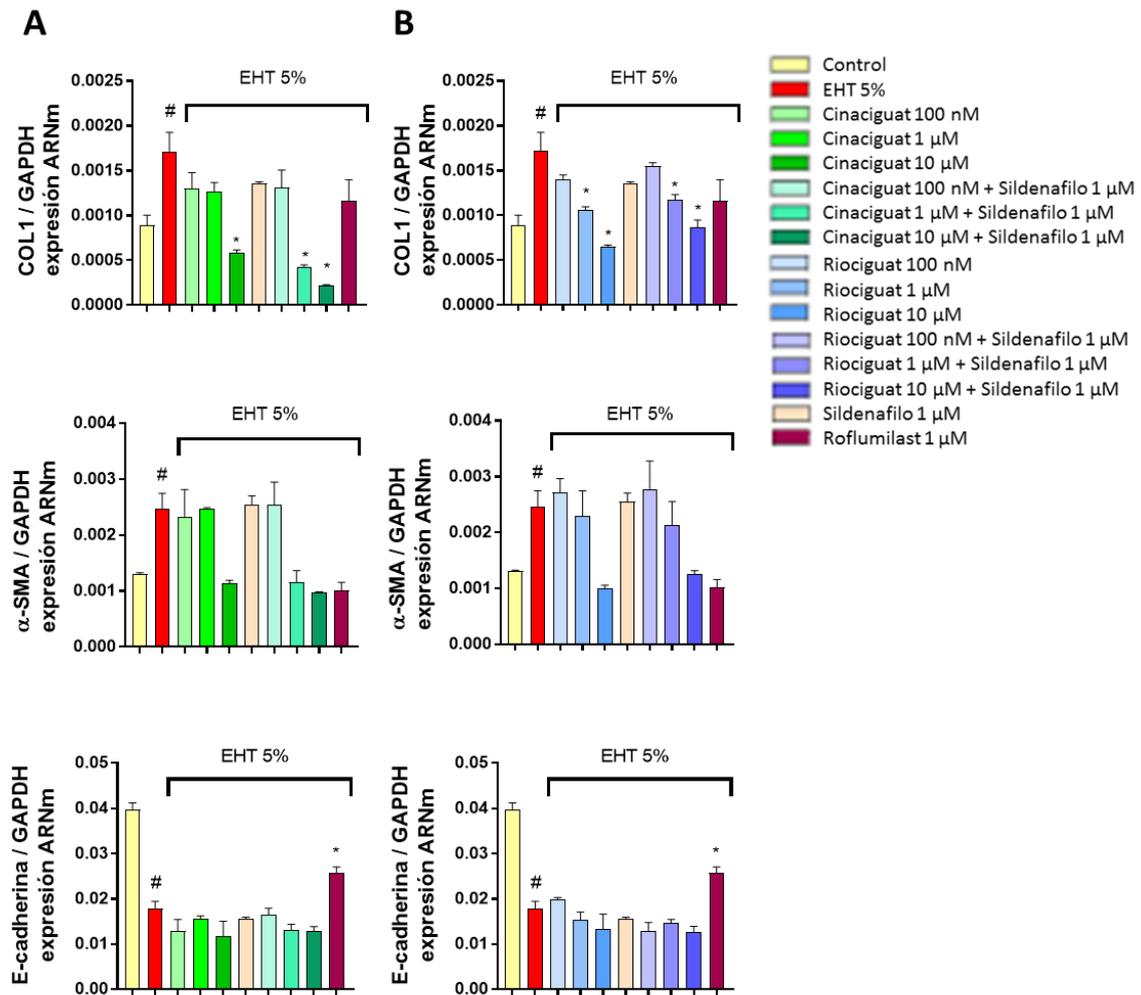


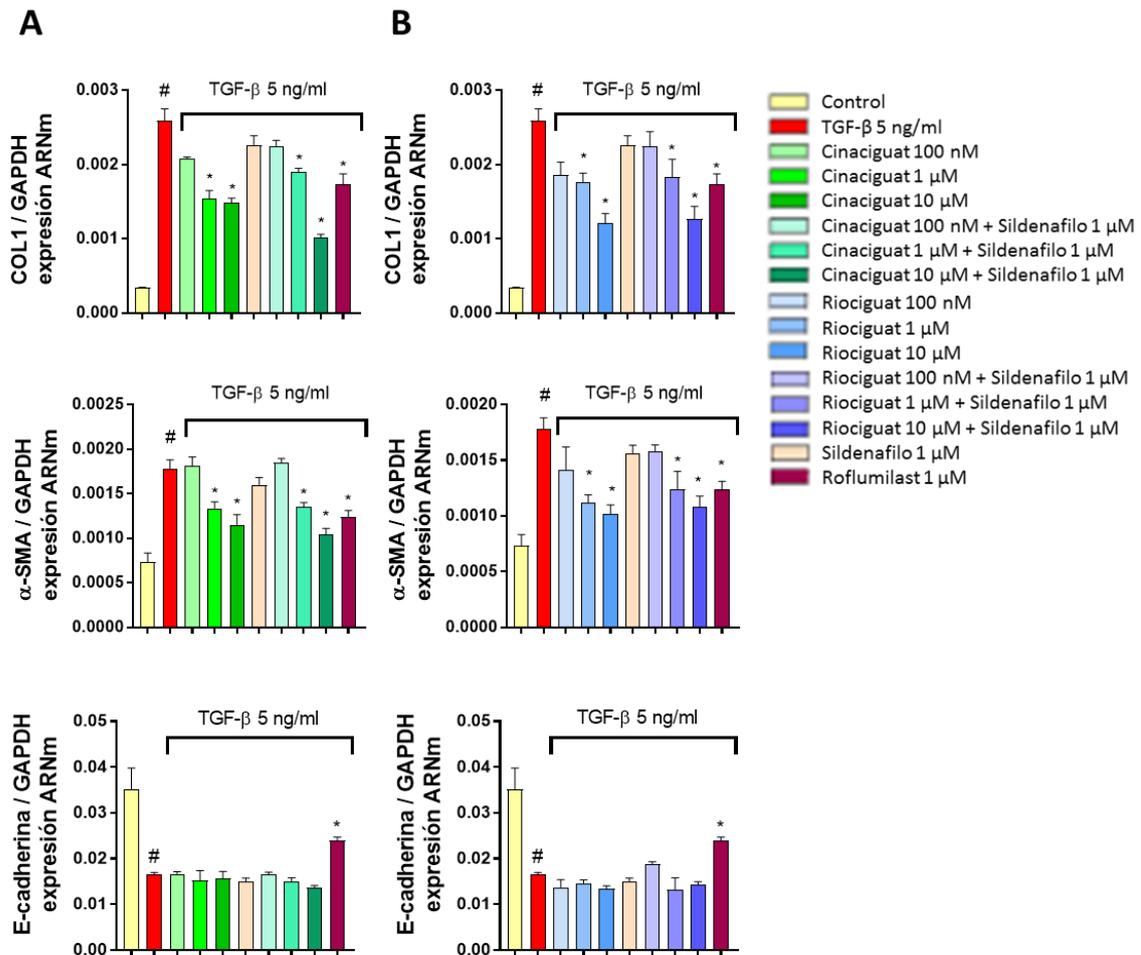
**Figura 58. Protocolo para la medida de los marcadores de la transición epitelio mesenquimal (TEM) en células epiteliales de bronquio humano (CEBH) tratadas con cinaciguat o riociguat, con o sin sildenafil, y estimuladas con TGF- $\beta$ .** Las CEBH se incubaron con sildenafil (1  $\mu$ M) durante 15 minutos, seguido de la incubación con cinaciguat o riociguat (100 nM, 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M), en presencia o ausencia de sildenafil, durante otros 15 minutos. A continuación, se añadió TGF- $\beta$  a una concentración de 5 ng/ml y se incubaron 48 horas, momento en el cual determinó la expresión génica de los marcadores de la TEM: COL1,  $\alpha$ -SMA y E-cadherina. Imagen creada con PowerPoint.

La expresión de COL1 como de  $\alpha$ -SMA aumentó de manera significativa respecto al control tras estimular a las CEBH con EHT al 5% (**Figura 59**) o TGF- $\beta$  5 ng/ml (**Figura 60**) durante 48 horas. Con ambos estímulos, el cinaciguat y el riociguat, tanto en presencia como ausencia de sildenafil, consiguieron prevenir ese aumento de manera dosis dependiente. No obstante, el tratamiento únicamente con sildenafil 1  $\mu$ M no consiguió una disminución significativa de estos marcadores **Figura 59 y 60**.

Asimismo, la expresión de E-cadherina disminuyó de manera significativa tras el estímulo de las CEBH con EHT y TGF- $\beta$ . En este caso, ninguna concentración de cinaciguat o riociguat con o sin sildenafil consiguieron prevenir esta disminución. Cabe destacar, que el roflumilast 1  $\mu$ M utilizado como control positivo en el experimento si consiguió aumentar la expresión de la E-cadherina.

Como en el caso de los FPH, debido a la similitud de resultados obtenidos tras estimular las CEBH con EHT o con TGF- $\beta$ , sumado a que se ha visto en otras ocasiones que el estímulo de estas células con EHT aumenta la concentración de TGF- $\beta$ <sup>58</sup>, el resto de los experimentos que se realizaron para el estudio de la TEM se realizaron únicamente con 5 ng/ml de TGF- $\beta$ .





**Figura 60. Cinaciguat y riociguat en presencia y ausencia de sildenafil atenúan la transición epitelio mesenquimal (TEM) provocada por TGF-β en células epiteliales de bronquio humano (CEBH).** La expresión génica de los marcadores de la TEM: COL1, α-SMA, y E-cadherina se cuantificó mediante retrotranscripción (RT) y PCR a tiempo real. A) Expresión génica de los marcadores de TEM en CEBH incubadas 15 minutos con sildenafil 1 μM, seguido de 15 minutos con cinaciguat (100 nM, 1 μM y 10 μM), en presencia o ausencia de sildenafil 1 μM y estimulados con 5 ng/ml de TGF-β durante 48 h. B) Expresión génica de los marcadores de TEM en CEBH incubadas 15 minutos con sildenafil 1 μM, seguido de 15 minutos con riociguat (100 nM, 1 μM y 10 μM), en presencia o ausencia de sildenafil 1 μM y estimulados con 5 ng/ml de TGF-β durante 48 h. Los resultados se expresan como la media ± SD. Las comparaciones fueron analizadas mediante test ANOVA unidireccional seguido de un test post hoc de Bonferroni. #P < 0.05 respecto al control. \*P < 0.05 respecto al estímulo TGF-β 5 ng/ml.

Posteriormente, se estudió si la expresión proteica de los marcadores de la TEM coincidía con lo observado en la expresión génica. Para ello se midió la expresión proteica de los marcadores COL1, α-SMA y E-cadherina tras tratar las CEBH siguiendo el mismo esquema mostrado en la **Figura 58**.

En la **Figura 61**, se observa como la expresión de COL1 y α-SMA se ve incrementada tras estimular las CEBH con TGF-β 5 ng/ml. De igual forma que se observó en la expresión génica, el tratamiento previo de las células con los fármacos cinaciguat y riociguat (en presencia o ausencia de sildenafil) consiguió atenuar ese incremento de la expresión provocado por el estímulo TGF-β de manera dosis dependiente. Por otro lado, la

## RESULTADOS

---

expresión proteica de E-cadherina disminuyó de manera significativa tras el estímulo de las CEBH con TGF- $\beta$ . De nuevo, ninguna concentración de cinaciguat o riociguat con o sin sildenafilo consiguieron prevenir esta disminución.

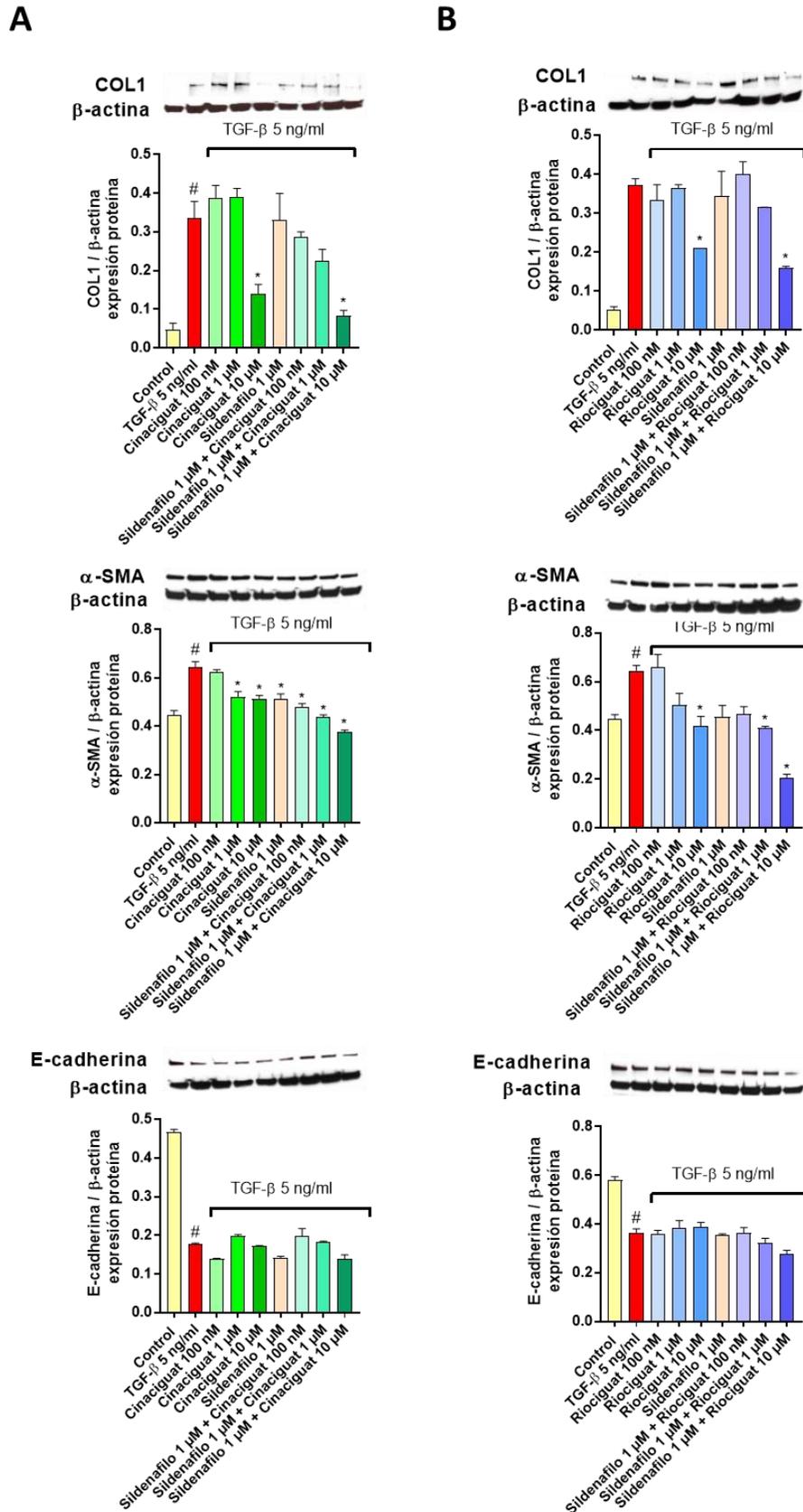


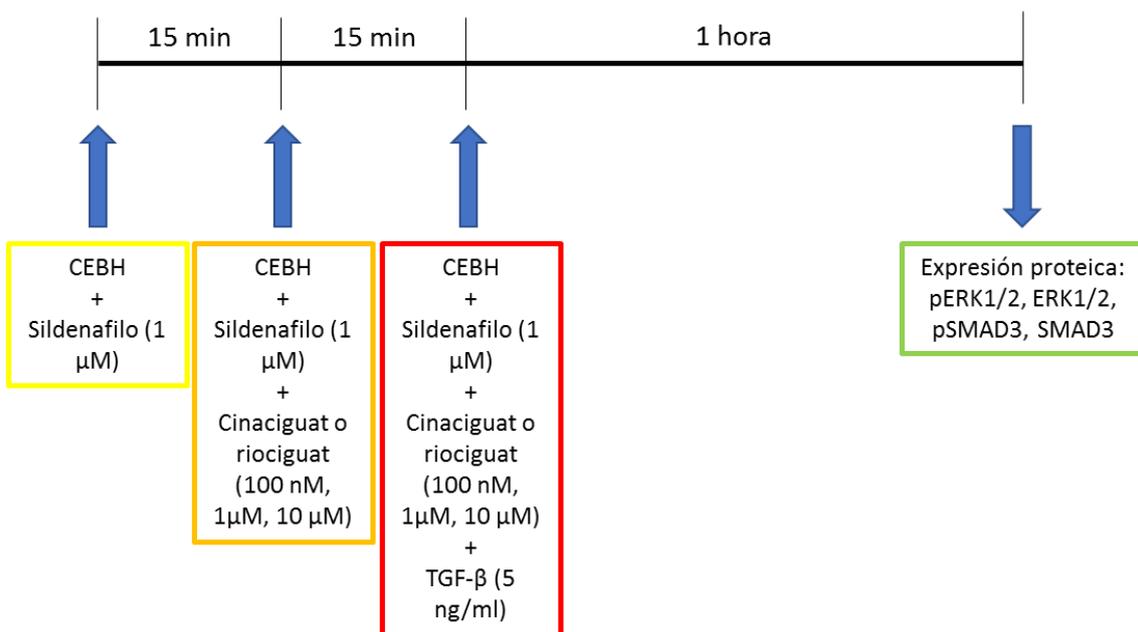
Figura 61. Cinaciguat y riociguat en presencia y ausencia de sildenafil atenúan la transición epitelio mesenquimal (TEM) provocada por TGF-β en células epiteliales de bronquio humano (CEBH). La expresión proteica de los marcadores de la TEM: COL1, α-SMA y E-cadherina se analizó mediante Western Blot y se cuantificó

## RESULTADOS

mediante densitometría con respecto al control interno  $\beta$ -actina. A) Expresión proteica de los marcadores de EMT en CEBH incubadas 15 minutos con sildenafil 1  $\mu$ M, seguido de 15 minutos con cinaciguat (100 nM, 1  $\mu$ M y 10  $\mu$ M), en presencia o ausencia de sildenafil 1  $\mu$ M y estimulados con 5 ng/ml de TGF- $\beta$  durante 48 h. B) Expresión proteica de los marcadores de EMT en CEBH incubadas 15 minutos con sildenafil 1  $\mu$ M, seguido de 15 minutos con riociguat (100 nM, 1  $\mu$ M y 10  $\mu$ M), en presencia o ausencia de sildenafil 1  $\mu$ M y estimulados con 5 ng/ml de TGF- $\beta$  durante 48 h. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SD. Las comparaciones fueron analizadas mediante test ANOVA unidireccional seguido de un test post hoc de Bonferroni. #P <0.05 respecto al control. \*P<0.05 respecto al estímulo TGF- $\beta$  5 ng/ml.

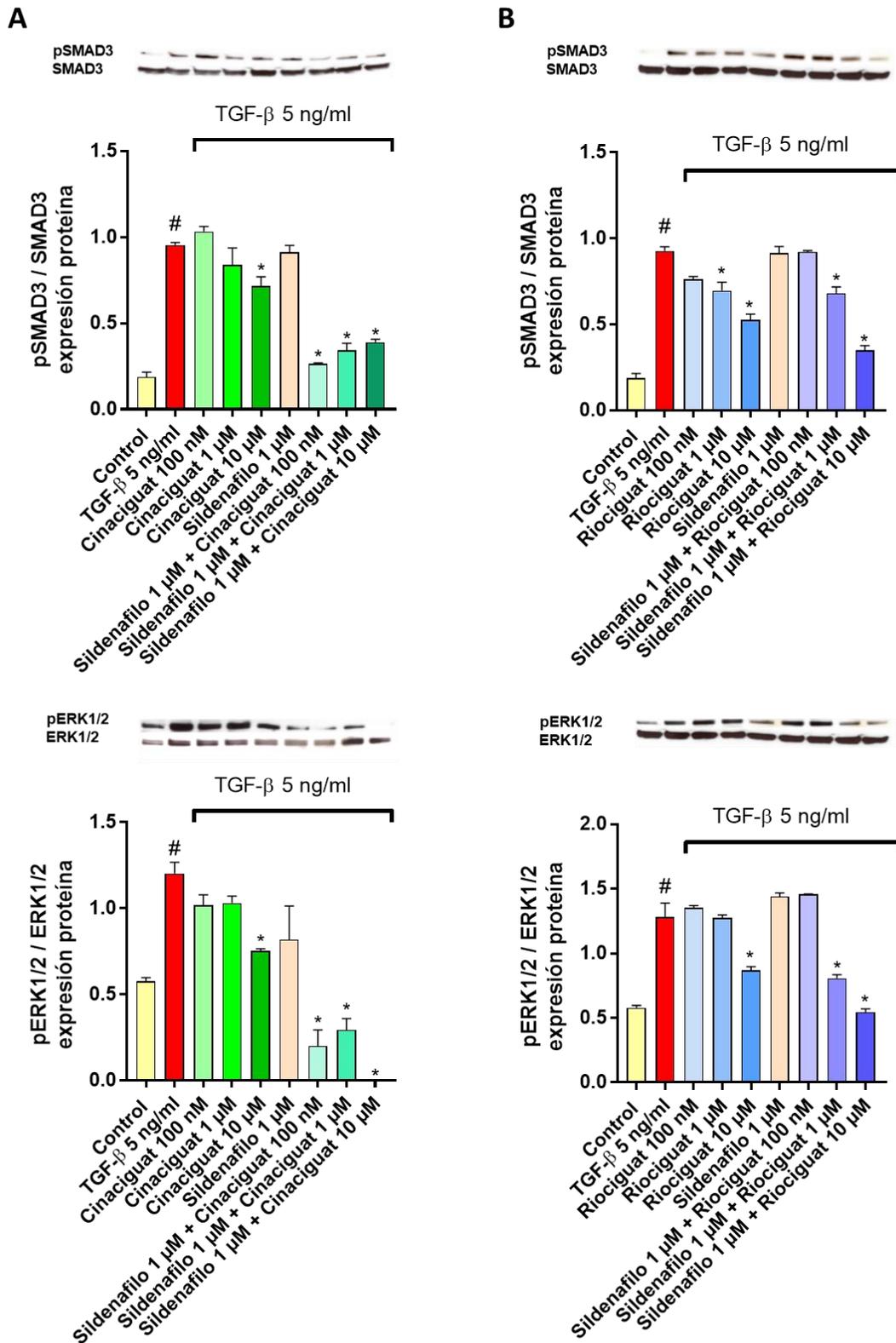
### 4.3.2.2 Fosforilación de ERK1/2 y SMAD3

Del mismo modo que en los FPH, para dilucidar como los fármacos moduladores de la enzima GCs actúan sobre la TEM inducida por TGF- $\beta$  se trataron las CEBH tal y como se muestra en la **Figura 62**. De este modo se evaluó el efecto de estos fármacos en la fosforilación de las proteínas ERK1/2 y SMAD3 implicadas en la señalización de TGF- $\beta$ .



**Figura 62. Protocolo para la medida de la fosforilación de ERK1/2 y SMAD3 en células epiteliales de bronquio humano (CEBH) tratadas con cinaciguat o riociguat, con o sin sildenafil, y estimuladas con TGF- $\beta$ .** Las CEBH se incubaron con sildenafil (1  $\mu$ M) durante 15 minutos, seguido de la incubación con cinaciguat o riociguat (100 nM, 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M), en presencia o ausencia de sildenafil, durante otros 15 minutos. A continuación, se añadió TGF- $\beta$  a una concentración de 5 ng/ml y se incubaron 1 hora, momento en el cual determinó la expresión proteica de pERK1/2, ERK1/2, pSMAD3 y SMAD3. Imagen creada con PowerPoint.

El cinaciguat y el riociguat, tanto en presencia como en ausencia de sildenafil, consiguieron atenuar la fosforilación de SMAD3 y de ERK1/2 de manera dosis dependiente. Además, todas las concentraciones de cinaciguat testadas en combinación con el sildenafil 1  $\mu$ M consiguieron evitar de manera completa la fosforilación de SMAD3 y ERK1/2, pues en estos casos se obtuvo niveles de proteína fosforilada similares o menores a los de las células control (**Figura 63**).



**Figura 63. Cinaciguat y riociguat en presencia y ausencia de sildenafil evitan la fosforilación de ERK1/2 y SMAD3 producida por TGF- $\beta$  en células epiteliales de bronquio humano (CEBH).** La expresión proteica de pERK1/2 y pSMAD3 se analizó mediante Western Blot y se cuantificó mediante densitometría con respecto a los niveles de proteína sin fosforilar. A) Expresión proteica de pERK1/2 y pSMAD3 en CEBH incubadas 15 minutos con sildenafil 1  $\mu$ M, seguido de 15 minutos con cinaciguat (100 nM, 1  $\mu$ M y 10  $\mu$ M), en presencia o ausencia de sildenafil 1  $\mu$ M y estimulados con 5 ng/ml de TGF- $\beta$  durante 1 h. B) Expresión proteica de pERK1/2 y pSMAD3 en CEBH incubadas

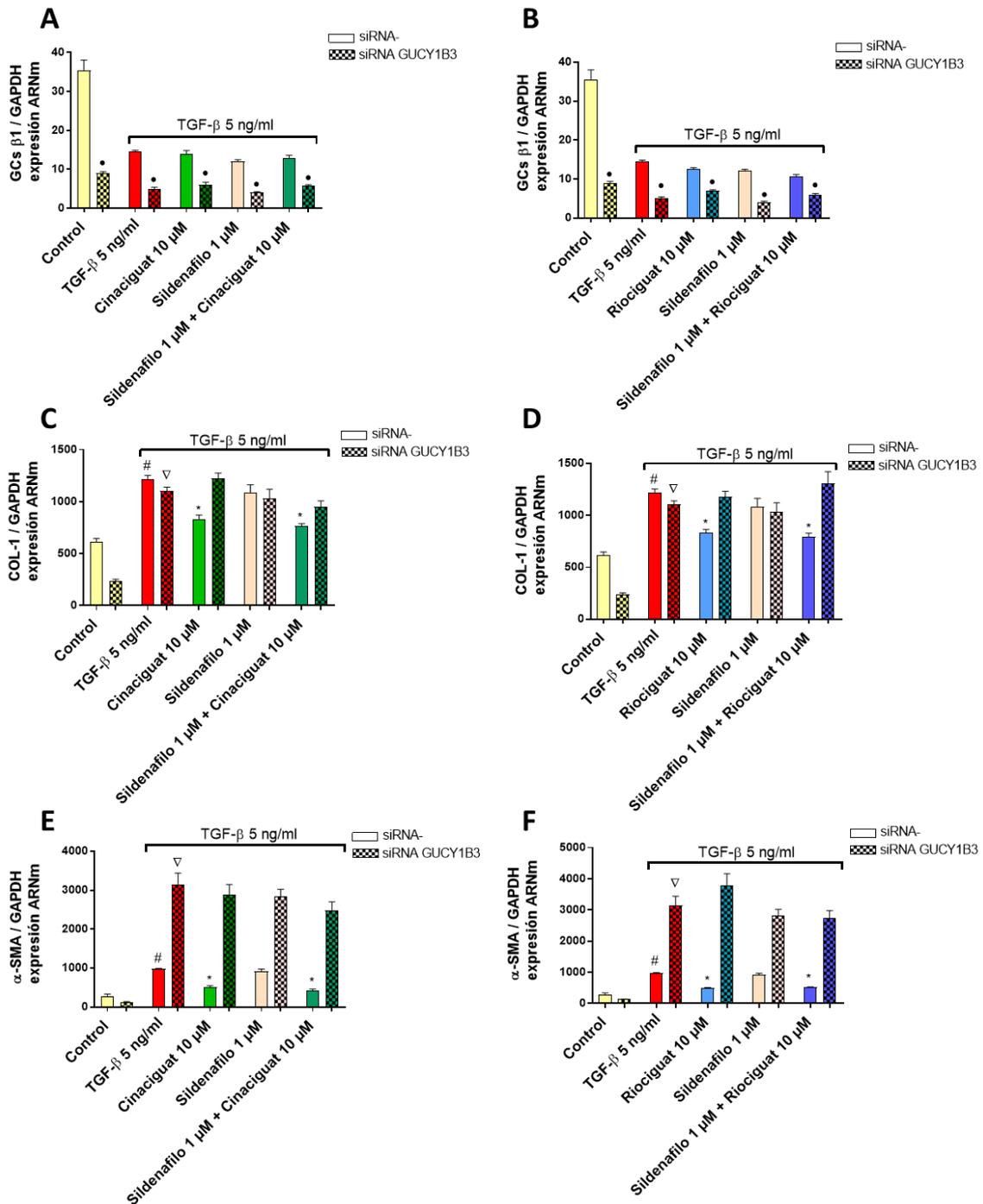
15 minutos con sildenafil 1  $\mu$ M, seguido de 15 minutos con riociguat (100 nM, 1  $\mu$ M y 10  $\mu$ M), en presencia o ausencia de sildenafil 1  $\mu$ M y estimulados con 5 ng/ml de TGF- $\beta$  durante 1 h. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SD. Las comparaciones fueron analizadas mediante test ANOVA unidireccional seguido de un test post hoc de Bonferroni. #P <0.05 respecto al control. \*P<0.05 respecto al estímulo TGF- $\beta$  5 ng/ml.

### **4.3.3 Efecto del silenciamiento de la subunidad $\beta$ de la enzima guanilato ciclasa soluble**

#### **4.3.3.1 En la transición fibroblasto mesenquimal**

Los FPH se transfectaron transitoriamente con siRNA(GUCY1B3) para reducir la expresión de la subunidad  $\beta$  de la GCs. Como se puede observar en la **Figura 64 A y B**, el silenciamiento se llevó a cabo correctamente ya que los niveles de expresión génica de la subunidad  $\beta$  de la GCs en todas las condiciones, se redujeron significativamente en comparación con los controles de siRNA(-). Por otro lado, se observó una disminución de la expresión de la subunidad  $\beta$  de la GCs en las células estimuladas con TGF- $\beta$  durante 48 horas, tal y como ocurrió en los resultados obtenidos con anterioridad (Apartado 4.1.2. Expresión de la enzima GCs en FPH y CEBH).

Así pues, se analizaron los genes marcadores de la TFM inducida por TGF- $\beta$  y se observó que, en las condiciones sin silenciamiento, el tratamiento con cinaciguat o riociguat 10  $\mu$ M, con y sin sildenafil 1  $\mu$ M, disminuía de manera significativa la expresión de COL1 y  $\alpha$ -SMA. Sin embargo, el silenciamiento de la subunidad  $\beta$  de la GCs atenúo el efecto de estos fármacos, lo que indica que el efecto de estos fármacos esta mediado por la modulación de esta enzima (**Figura 64 C, D, E y F**). Además, se observó que el silenciamiento de la subunidad  $\beta$  de la GCs en los FPH provocó un mayor incremento de  $\alpha$ -SMA al estimular las células con TGF- $\beta$ , que el observado en los FPH transfectados con el siRNA(-) (**Figura 64 E y F**).

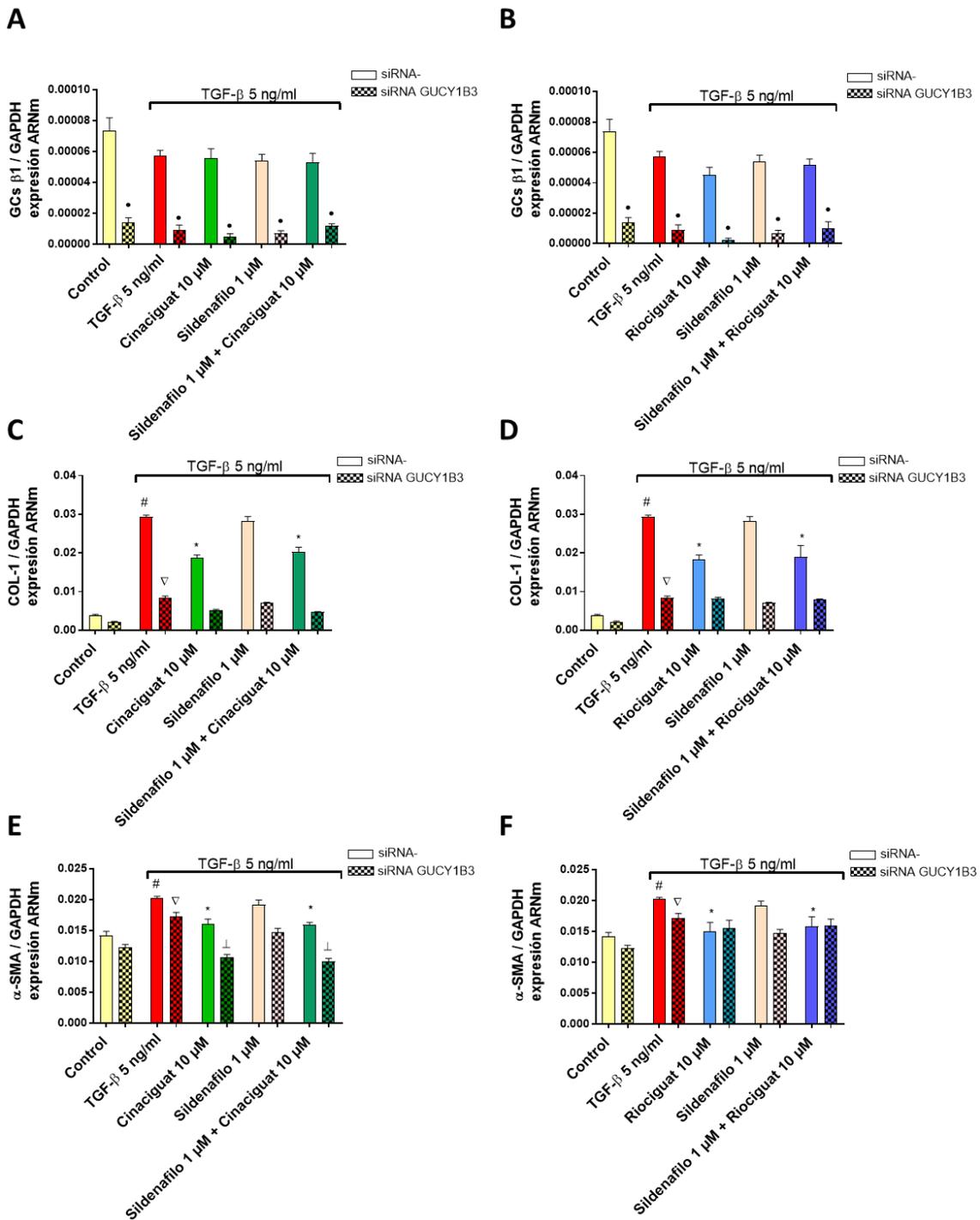


**Figura 64.** El efecto de los fármacos cinaciguat y riociguat en la transición fibroblasto mesenquimal (TFM) está mediado por la modulación de la enzima guanilato ciclasa soluble (GCs). Los fibroblastos pulmonares humanos (FPH) se transfectaron transitoriamente con siRNA control (-) o siRNA(GUCY1B3). Las células silenciadas se trataron con sildenafil 1  $\mu$ M 15 minutos, seguido de 15 minutos con cinaciguat (A, C y E) o riociguat (B, D, E) 10  $\mu$ M, en presencia o ausencia de sildenafil 1  $\mu$ M, y se estimuló la TFM con TGF- $\beta$  5 ng/ml durante 48 horas. Transcurrido ese tiempo se midió la expresión génica de la subunidad  $\beta$  de la GCs, COL1,  $\alpha$ -SMA mediante RT-PCR. Todos los resultados están expresados como media  $\pm$  SD. Las comparaciones fueron analizadas mediante test ANOVA seguido de una prueba post hoc de Bonferroni • $P < 0.05$  respecto al grupo siRNA(-). # $P < 0.05$  respecto a siRNA(-) Control.  $\nabla P < 0,05$  respecto a siRNA(GUCY1B3) Control. \* $P < 0.05$  respecto a siRNA(-) TGF $\beta$  5 ng/ml.

#### 4.3.3.2 En la transición epitelio mesenquimal

Como en el caso de los FPH, las CEBH se transfectaron de forma transitoria con siRNA(GUCY1B3) para reducir la expresión de la subunidad  $\beta$  de la GCs. En la **Figura 65 A y B**, se puede observar como el silenciamiento se llevó a cabo correctamente ya que los niveles de expresión génica de la subunidad  $\beta$  de la GCs en todas las condiciones, se redujeron significativamente en comparación con los controles de siRNA(-). Además, se observó una disminución de la expresión de la subunidad  $\beta$  de la GCs en las CEBH estimuladas con TGF- $\beta$  durante 48 horas, aunque menor que la observada en FPH. De nuevo, estos resultados coinciden con los obtenidos con anterioridad (Apartado 4.1.2. Expresión de la enzima GCs en FPH y CEBH).

Así pues, se analizaron los genes marcadores de la TEM inducida por TGF- $\beta$  y se observó que, en las condiciones sin silenciamiento, el tratamiento con cinaciguat o riociguat 10  $\mu$ M, con y sin sildenafil 1  $\mu$ M, disminuía de manera significativa la expresión de COL1 y  $\alpha$ -SMA. El silenciamiento de la subunidad  $\beta$  de la GCs evitó el efecto del riociguat (**Figura 65 D y F**). Sin embargo, aunque el silenciamiento de esta subunidad atenúo el efecto del cinaciguat 10  $\mu$ M, hubo un descenso de estos marcadores con el tratamiento de este fármaco en presencia y ausencia de sildenafil (**Figura 65 C y E**). Por otro lado, se observó que el silenciamiento de la subunidad  $\beta$  de la GCs en las CEBH provocó una disminución de COL1 en todos los grupos siRNA(-) (**Figura 65 C y D**).

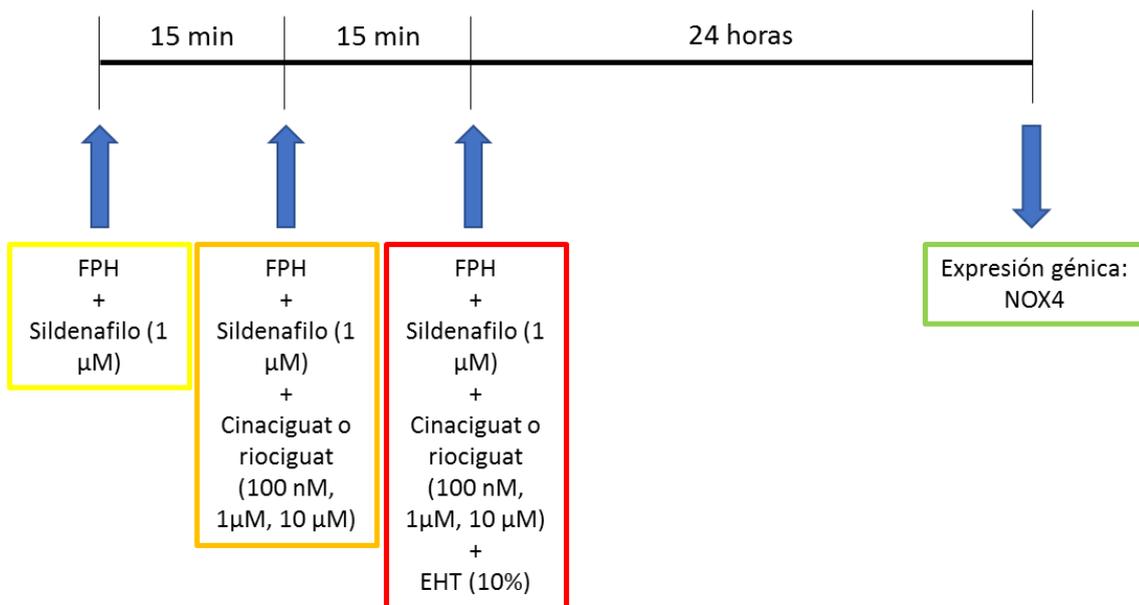


**Figura 65.** El efecto de los fármacos cinaciguat y riociguat en la transición epitelio mesenquimal (TEM) está mediado por la modulación de la enzima guanilato ciclasa soluble (GCs). Las células epiteliales de bronquio (CEBH) se transfectaron transitoriamente con siRNA control (-) o siRNA(GUCY1B3). Las células silenciadas se trataron con sildenafil 1  $\mu$ M 15 minutos, seguido de 15 minutos con cinaciguat (A, C y E) o riociguat (B, D, E) 10  $\mu$ M, en presencia o ausencia de sildenafil 1  $\mu$ M, y se estimuló la TEM con TGF- $\beta$  5 ng/ml durante 48 horas. Transcurrido ese tiempo se midió la expresión génica de la subunidad  $\beta$  de la GCs, COL1,  $\alpha$ -SMA mediante RT-PCR. Todos los resultados están expresados como media  $\pm$  SD. Las comparaciones fueron analizadas mediante test ANOVA seguido de una prueba post hoc de Bonferroni  $\bullet$ P<0.05 respecto al grupo siRNA(-).  $\#$ P<0.05 respecto a siRNA(-) Control.  $\nabla$ P<0,05 respecto a siRNA(GUCY1B3) Control. \*P<0.05 respecto a siRNA(-) TGF $\beta$  5 ng/ml.  $\perp$ P<0,05 respecto a siRNA(GUCY1B3) TGF $\beta$  5 ng/ml.

#### 4.4 Efecto de los fármacos moduladores de la guanilato ciclasa soluble sobre la producción de especies reactivas de oxígeno

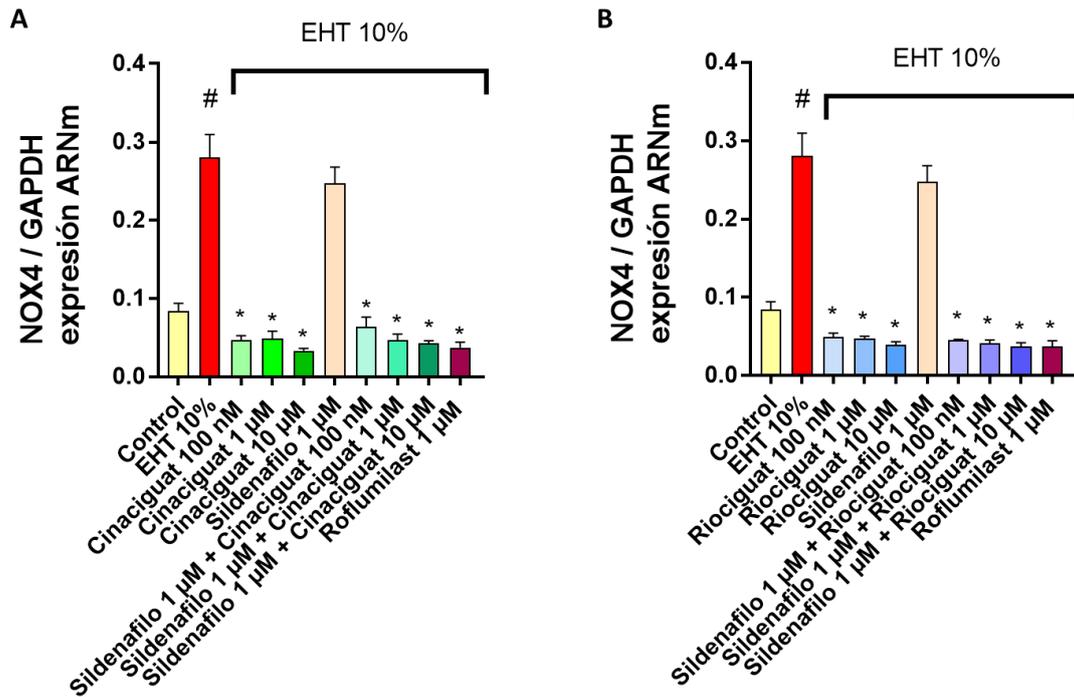
##### 4.4.1 En fibroblastos pulmonares humanos

En primer lugar, se estudió la expresión génica de NOX4 al tratar los FPH con cinaciguat y riociguat (con o sin sildenafil) y estimularlos con EHT. Para ello, los FPH se trataron siguiendo el procedimiento mostrado en la **Figura 66**.



**Figura 66. Protocolo para la medida de la expresión génica de la NADPH oxidasa 4 (NOX4) en fibroblastos pulmonares humanos (FPH) tratados con cinaciguat o riociguat, con o sin sildenafil, y estimulados con extracto de humo de tabaco (EHT).** Los FPH se incubaron con sildenafil (1 μM) durante 15 minutos, seguido de la incubación con cinaciguat o riociguat (100 nM, 1 μM, 10 μM), en presencia o ausencia de sildenafil, durante otros 15 minutos. A continuación, se añadió EHT al 10% y se incubaron 24 horas, momento en el cual determinó la expresión génica de NOX4. Imagen creada con PowerPoint.

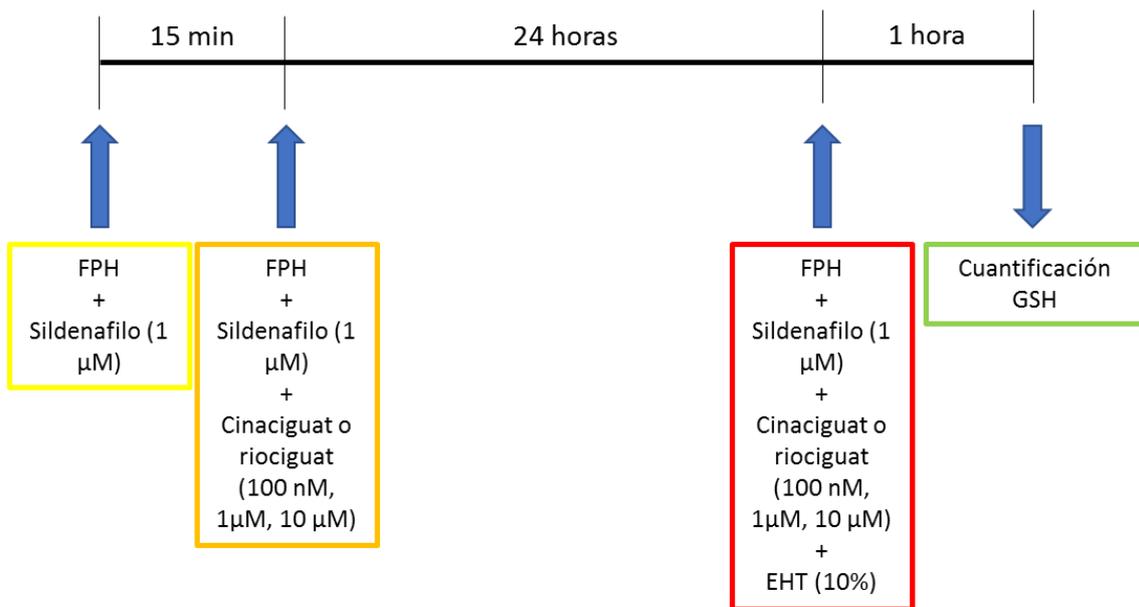
Como se observa en la **Figura 67**, el EHT aumentó la expresión de NOX4 en FPH de manera significativa. Además, todas las concentraciones de cinaciguat y riociguat testadas con o sin sildenafil 1 μM consiguieron evitar el aumento de la expresión génica de NOX4 provocado por el EHT. Por otro lado, el tratamiento únicamente con sildenafil 1 μM no consiguió atenuar el aumento de NOX4 producido por el EHT de manera significativa.



**Figura 67. Cinaciguat y riociguat en presencia y ausencia de sildenafil atenúan el incremento de la expresión génica de la NADPH oxidasa 4 (NOX4) provocado por el extracto de humo de tabaco (EHT) en fibroblastos pulmonares humanos (FPH).** La expresión génica NOX4 se cuantificó mediante RT-PCR. A) Expresión génica de NOX4 en FPH incubados 15 minutos con sildenafil 1 μM, seguido de 15 minutos con cinaciguat (100 nM, 1 μM y 10 μM), en presencia o ausencia de sildenafil 1 μM y estimulados con EHT 10% durante 24 h. B) Expresión génica de NOX4 en FPH incubados 15 minutos con sildenafil 1 μM, seguido de 15 minutos con riociguat (100 nM, 1 μM y 10 μM), en presencia o ausencia de sildenafil 1 μM y estimulados con EHT 10% durante 24 h. Los resultados se expresan como la media ± SD. Las comparaciones fueron analizadas mediante test ANOVA unidireccional seguido de un test post hoc de Bonferroni. #P <0.05 respecto al control. \*P<0.05 respecto al estímulo EHT 10%.

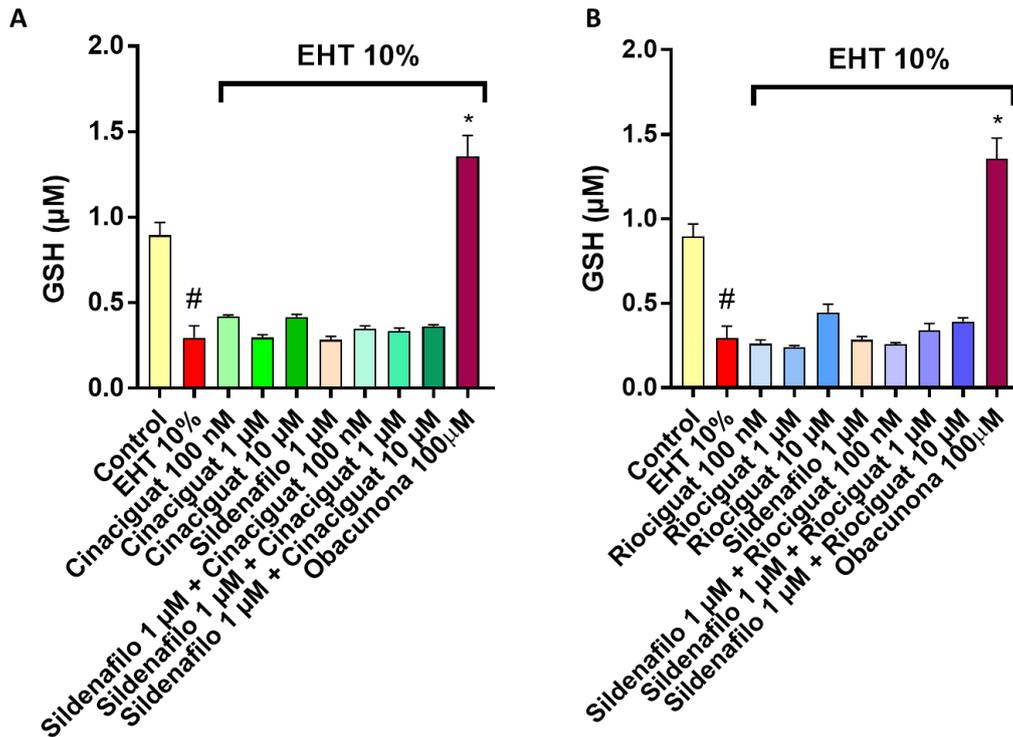
A continuación, se cuantificaron los niveles de GSH. Para ello los FPH se trataron tal y como se muestra en el esquema de la **Figura 68**.

## RESULTADOS



**Figura 68. Protocolo para la cuantificación de glutatión (GSH) en fibroblastos pulmonares humanos (FPH) tratados con cinaciguat o riociguat, con o sin sildenafil, y estimulados con extracto de humo de tabaco (EHT).** Los FPH se incubaron con sildenafil (1  $\mu\text{M}$ ) durante 15 minutos, seguido de la incubación con cinaciguat o riociguat (100 nM, 1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ ), en presencia o ausencia de sildenafil, durante 24 horas. Transcurrido ese periodo, se añadió EHT al 10% y se incubaron 1 hora, momento en el cual cuantificó el GSH. Imagen creada con PowerPoint.

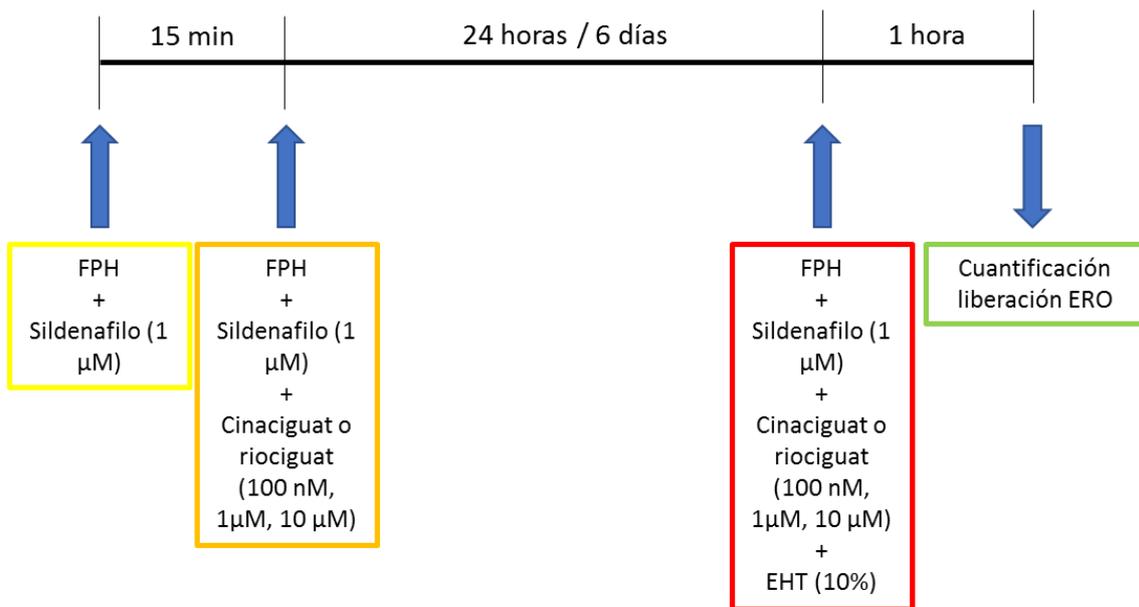
Como se observa en la **Figura 69**, ni el cinaciguat ni el riociguat consiguieron revertir la disminución de GSH provocada por el EHT. Sin embargo, la Obacunona (100  $\mu\text{M}$ ) utilizada en el experimento como control positivo por sus propiedades antioxidantes <sup>154</sup> si consiguió aumentar los niveles de GSH de manera significativa en los FPH estimulados con EHT.



**Figura 69. Cinaciguat y riociguat no revierten la disminución de glutatión (GSH) provocado por el extracto de humo de tabaco (EHT) en fibroblastos pulmonares humanos (FPH).** El GSH se cuantificó mediante el kit ‘GSH-Glo™ Glutathione Assay’. A) Concentración de GSH en FPH incubados 15 minutos con sildenafil 1 µM, seguido de 24 horas con cinaciguat (100 nM, 1 µM y 10 µM), en presencia o ausencia de sildenafil 1 µM y estimulados con EHT 10% durante 1 h. B) Concentración de GSH en FPH incubados 15 minutos con sildenafil 1 µM, seguido de 24 horas con riociguat (100 nM, 1 µM y 10 µM), en presencia o ausencia de sildenafil 1 µM y estimulados con EHT 10% durante 1 h. Los resultados se expresan como la media ± SD. Las comparaciones fueron analizadas mediante test ANOVA unidireccional seguido de un test post hoc de Bonferroni. #P<0.05 respecto al control. \*P<0.05 respecto al estímulo EHT 10%.

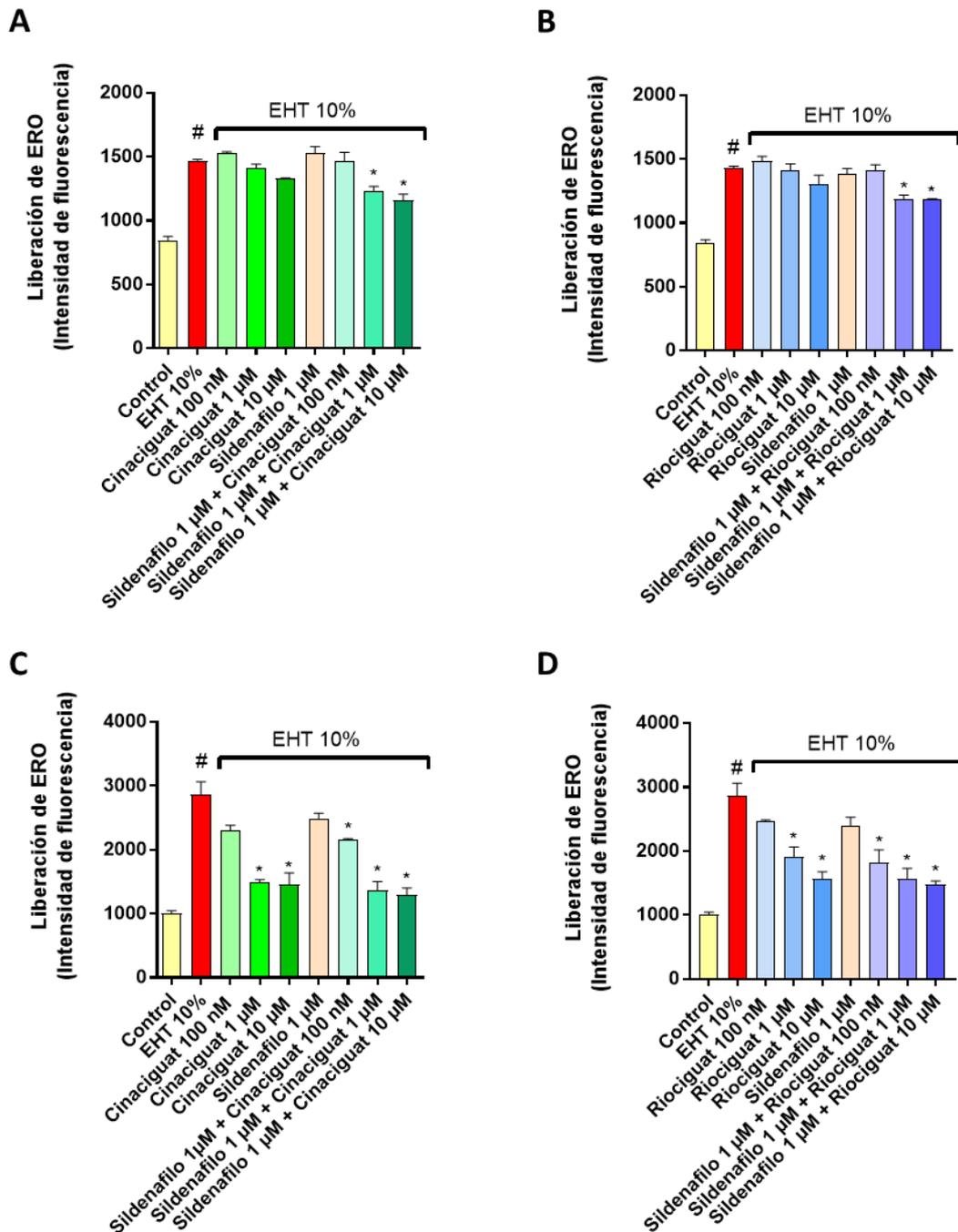
Finalmente, se estudió la generación de las ERO en FPH estimulados con EHT y el efecto de los fármacos moduladores de la GCs en la liberación de estas. Para realizar este experimento se trataron los FPH siguiendo el procedimiento indicado en el esquema de la **Figura 70**. Posteriormente, se midió la fluorescencia tras la generación de DCF (fluorescente) a partir de la oxidación del compuesto CM-H2DCFDA (no fluorescente) en presencia de ERO.

## RESULTADOS



**Figura 70. Protocolo para la medida de la liberación de especies reactivas de oxígeno (ERO) en fibroblastos pulmonares humanos (FPH) tratados con cinaciguat o riociguat, con o sin sildenafil, y estimulados con extracto de humo de tabaco (EHT).** Los FPH se incubaron con sildenafil (1 μM) durante 15 minutos, seguido de la incubación con cinaciguat o riociguat (100 nM, 1 μM, 10 μM), en presencia o ausencia de sildenafil, durante 24 horas o 6 días. Transcurrido ese periodo, se añadió EHT al 10% y se incubaron 1 hora, momento en el cual se midió la liberación de ERO. Imagen creada con PowerPoint.

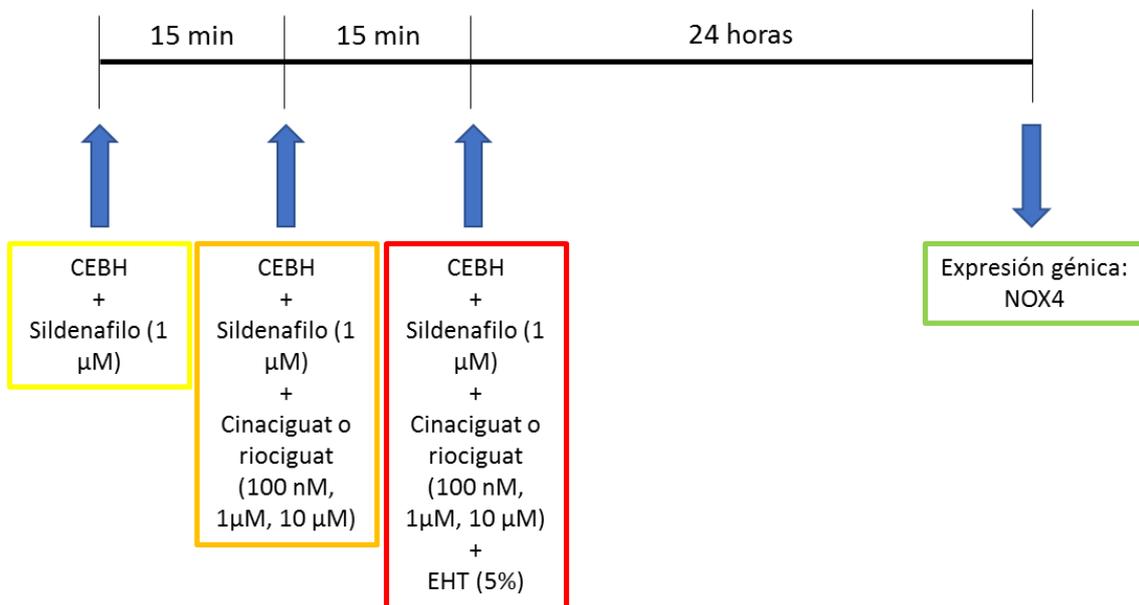
Tras el tratamiento durante 24 horas con el cinaciguat y el riociguat, con o sin sildenafil, se observó que únicamente las dos concentraciones más altas de los fármacos testadas (1 μM y 10 μM) en presencia de sildenafil 1 μM conseguían reducir de manera significativa las ERO producidas por el EHT 10% (**Figura 71 A y B**). Sin embargo, al aumentar el tratamiento de los FPH con cinaciguat y riociguat (con o sin sildenafil) a 6 días, se observó una mayor disminución de las ERO que al tratarlos 24 horas. En la **Figura 71 C** se observa que, tras el tratamiento durante 6 días, el cinaciguat a cualquier dosis testada junto con el sildenafil disminuye de manera significativa y dosis dependiente las ERO liberadas al estimular los FPH con EHT. Además, el cinaciguat 1 μM y 10 μM sin sildenafil también consigue reducir las ERO de manera significativa. Por otro lado, el riociguat 1 μM y 10 μM con y sin sildenafil, también consigue disminuir la liberación de las ERO en los FPH provocada por el EHT (**Figura 71 D**).



**Figura 71. Cinaciguat y riociguat atenúan la liberación de especies reactivas de oxígeno (ERO) provocada por el extracto de humo de tabaco (EHT) en fibroblastos pulmonares humanos (FPH).** Para medir la liberación de ERO, se cuantificó por citometría la fluorescencia del compuesto DCF generado a partir del CM-H<sub>2</sub>DCFDA. A) Liberación de ERO en FPH incubados 15 minutos con sildenafil 1 μM, seguido de 24 horas con cinaciguat (100 nM, 1 μM y 10 μM), en presencia o ausencia de sildenafil 1 μM y estimulados con EHT 10% durante 1 h. B) Liberación de ERO en FPH incubados 15 minutos con sildenafil 1 μM, seguido de 24 horas con riociguat (100 nM, 1 μM y 10 μM), en presencia o ausencia de sildenafil 1 μM y estimulados con EHT 10% durante 1 h. C) Liberación de ERO en FPH incubados 15 minutos con sildenafil 1 μM, seguido de 6 días con cinaciguat (100 nM, 1 μM y 10 μM), en presencia o ausencia de sildenafil 1 μM y estimulados con EHT 10% durante 1 h. D) Liberación de ERO en FPH incubados 15 minutos con sildenafil 1 μM, seguido de 6 días con riociguat (100 nM, 1 μM y 10 μM), en presencia o ausencia de sildenafil 1 μM y estimulados con EHT 10% durante 1 h. Los resultados se expresan como la media ± SD. Las comparaciones fueron analizadas mediante test ANOVA unidireccional seguido de un test post hoc de Bonferroni. #P <0.05 respecto al control. \*P <0.05 respecto al estímulo EHT 10%.

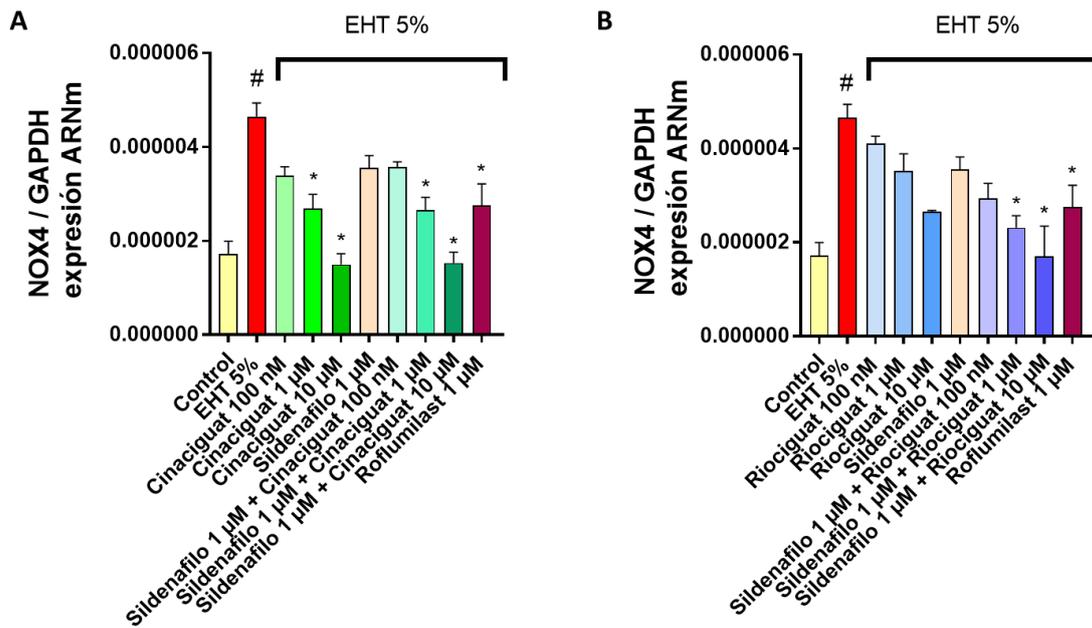
#### 4.4.2 En células epiteliales de bronquio

Del mismo modo que en los FPH, se estudió la expresión génica de NOX4 en CEBH al tratarlas con cinaciguat y riociguat (con o sin sildenafil) y estimularlas con EHT. Concretamente, las células se trataron siguiendo el protocolo de la **Figura 72**.



**Figura 72. Protocolo para la medida de la expresión génica de la NADPH oxidasa 4 (NOX4) en células epiteliales de bronquio humano (CEBH) tratadas con cinaciguat o riociguat, con o sin sildenafil, y estimuladas con extracto de humo de tabaco (EHT).** Las CEBH se incubaron con sildenafil (1 μM) durante 15 minutos, seguido de la incubación con cinaciguat o riociguat (100 nM, 1 μM, 10 μM), en presencia o ausencia de sildenafil, durante otros 15 minutos. A continuación, se añadió EHT al 5% y se incubaron 24 horas, momento en el cual determinó la expresión génica de NOX4. Imagen creada con PowerPoint.

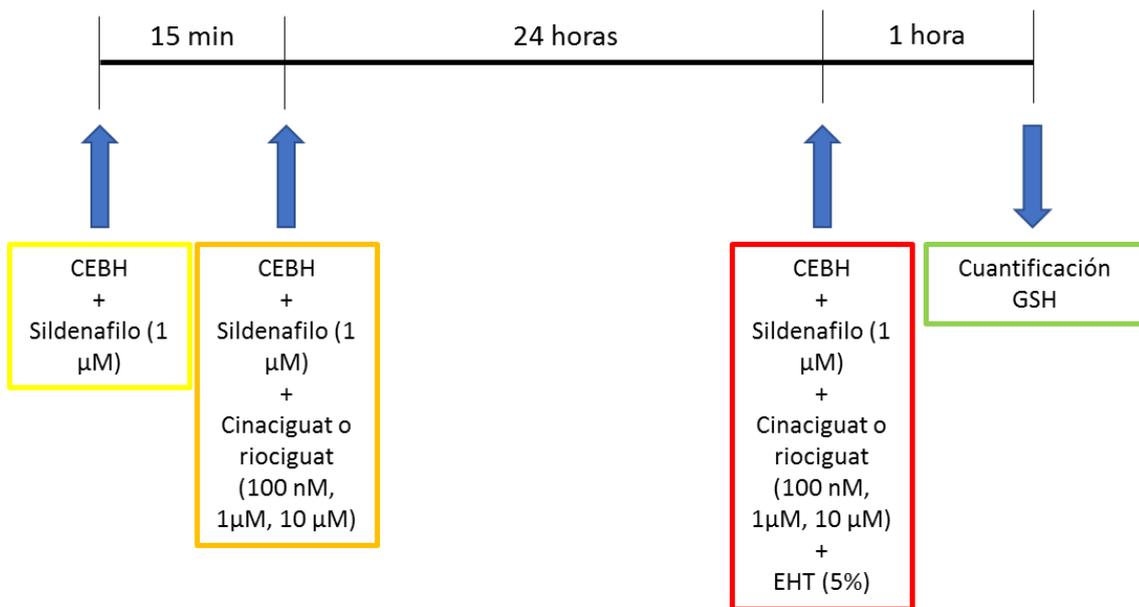
Tal y como se observó en los FPH, el EHT aumentó la expresión de NOX4 en las CEBH de manera significativa (**Figura 73**). El cinaciguat disminuyó la expresión de NOX4 de manera dosis dependiente, siendo significativa la disminución producida por el cinaciguat 1 μM y 10 μM, con o sin sildenafil 1 μM (**Figura 73 A**). Por otro lado, el riociguat también consiguió disminuir la expresión de NOX4 de manera dosis dependiente, pero en este caso solo fue significativa la disminución producida por el riociguat 1 μM y 10 μM con sildenafil 1 μM (**Figura 73 B**). El tratamiento únicamente con sildenafil 1 μM no consiguió atenuar el aumento de NOX4 provocado por el EHT en las CEBH.



**Figura 73. Cinaciguat y riociguat en presencia y ausencia de sildenafil atenúan el incremento de la expresión génica de la NADPH oxidasa 4 (NOX4) provocado por el extracto de humo de tabaco (EHT) en células epiteliales de bronquio humano (CEBH).** La expresión génica NOX4 se cuantificó mediante RT-PCR. A) Expresión génica de NOX4 en CEBH incubadas 15 minutos con sildenafil 1 µM, seguido de 15 minutos con cinaciguat (100 nM, 1 µM y 10 µM), en presencia o ausencia de sildenafil 1 µM y estimulados con EHT 5% durante 24 h. B) Expresión génica de NOX4 en CEBH incubadas 15 minutos con sildenafil 1 µM, seguido de 15 minutos con riociguat (100 nM, 1 µM y 10 µM), en presencia o ausencia de sildenafil 1 µM y estimulados con EHT 5% durante 24 h. Los resultados se expresan como la media ± SD. Las comparaciones fueron analizadas mediante test ANOVA unidireccional seguido de un test post hoc de Bonferroni. #P <0.05 respecto al control. \*P<0.05 respecto al estímulo EHT 5%.

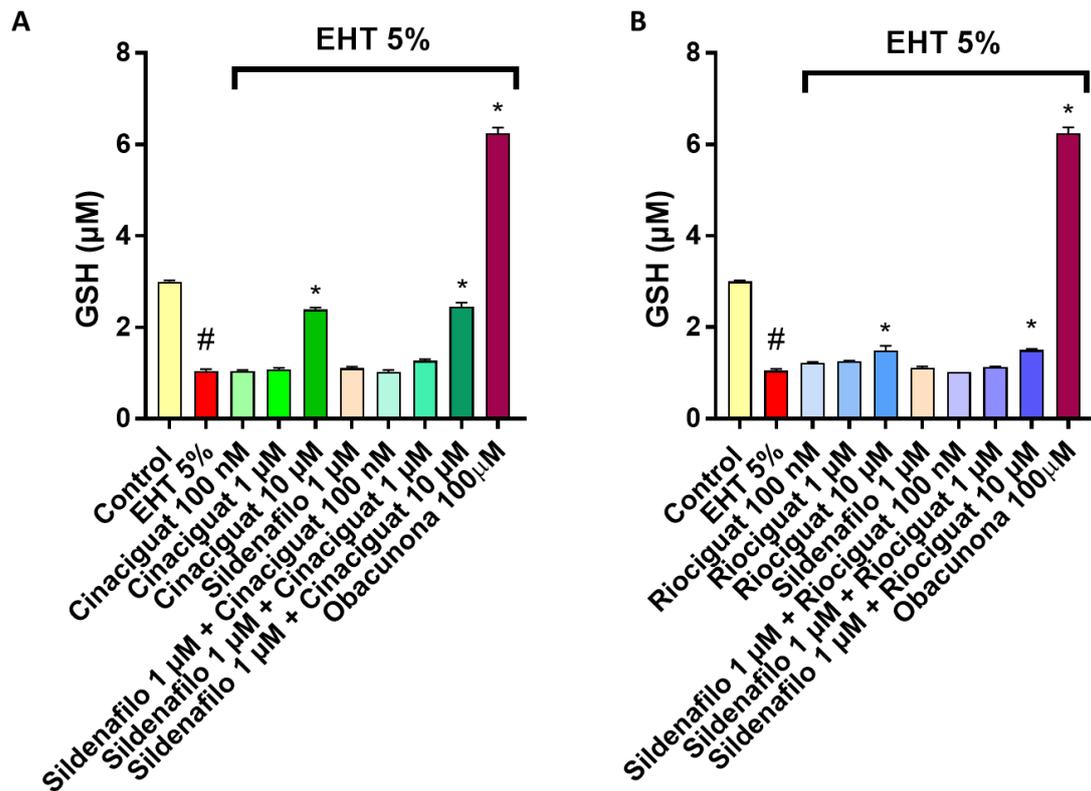
Posteriormente, se estudió si los fármacos modulares de la GCs eran capaces de aumentar los niveles de GSH en CEBH estimuladas con EHT. Para ello, las CEBH se trataron siguiendo el protocolo mostrado en la **Figura 74**.

## RESULTADOS



**Figura 74. Protocolo para la cuantificación de glutatión (GSH) en células epiteliales de bronquio humano (CEBH) tratadas con cinaciguat o riociguat, con o sin sildenafil, y estimuladas con extracto de humo de tabaco (EHT).** Las CEBH se incubaron con sildenafil (1 μM) durante 15 minutos, seguido de la incubación con cinaciguat o riociguat (100 nM, 1 μM, 10 μM), en presencia o ausencia de sildenafil, durante 24 horas. Transcurrido ese periodo, se añadió EHT al 5% y se incubaron 1 hora, momento en el cual cuantificó el GSH. Imagen creada con PowerPoint.

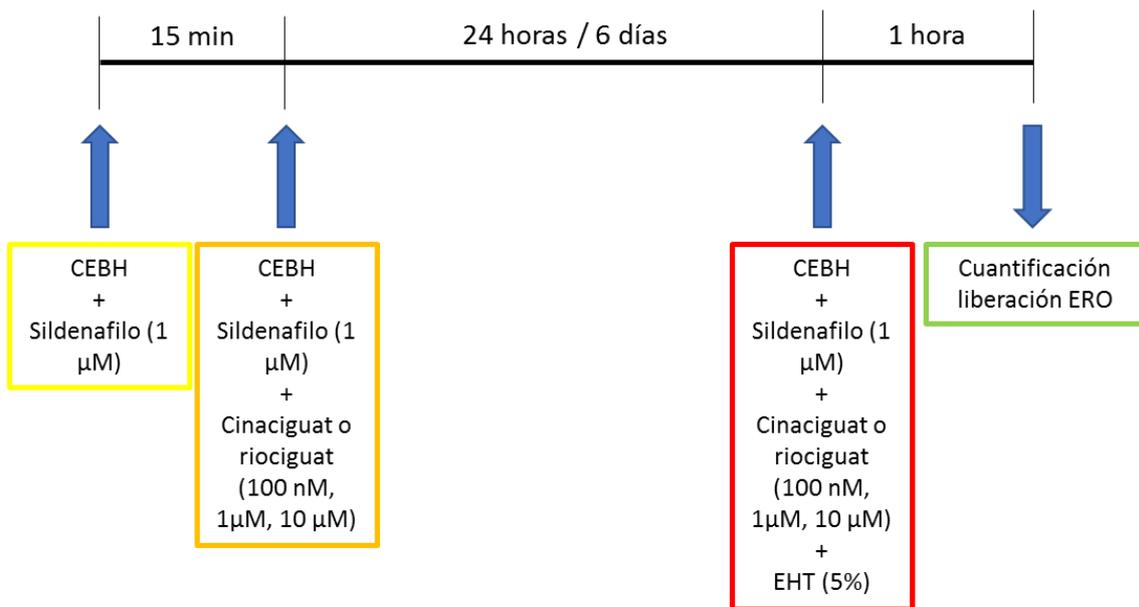
En este caso, al contrario de lo observado en FPH, las concentraciones más altas de cinaciguat y el riociguat (10 μM), con o sin sildenafil, consiguieron atenuar la disminución de GSH provocada por el EHT. Además, cabe destacar que el aumento de GSH producido por el cinaciguat fue mayor al producido por el riociguat (**Figura 75**). En este experimento, se utilizó de nuevo la Obacunona (100 μM) como control positivo por sus propiedades antioxidantes <sup>154</sup>.



**Figura 75. Cinaciguat y riociguat atenúan la disminución de glutatión (GSH) provocado por el extracto de humo de tabaco (EHT) en células epiteliales de bronquio humano (CEBH).** El GSH se cuantificó mediante el kit 'GSH-Glo™ Glutathione Assay'. A) Concentración de GSH en CEBH incubadas 15 minutos con sildenafil 1 µM, seguido de 24 horas con cinaciguat (100 nM, 1 µM y 10 µM), en presencia o ausencia de sildenafil 1 µM y estimulados con EHT 5% durante 1 h. B) Concentración de GSH en CEBH incubadas 15 minutos con sildenafil 1 µM, seguido de 24 horas con riociguat (100 nM, 1 µM y 10 µM), en presencia o ausencia de sildenafil 1 µM y estimulados con EHT 5% durante 1 h. Los resultados se expresan como la media ± SD. Las comparaciones fueron analizadas mediante test ANOVA unidireccional seguido de un test post hoc de Bonferroni. #P <0.05 respecto al control. \*P<0.05 respecto al estímulo EHT 5%.

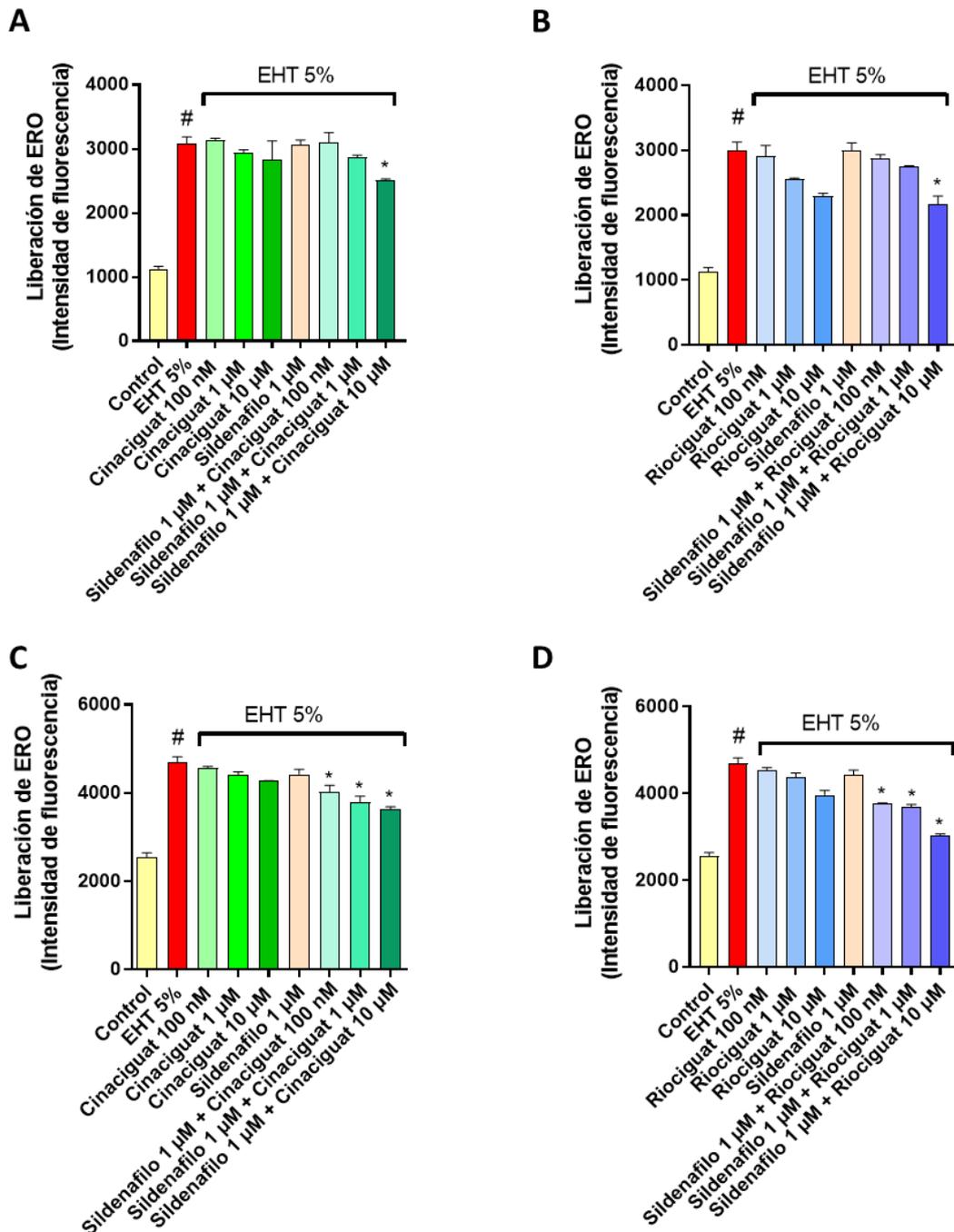
Finalmente, se estudió la generación de las ERO en las CEBH estimulados con EHT, así como el efecto de los fármacos moduladores de la GCs en la liberación de estas. Para ello, se trataron las CEBH siguiendo el protocolo mostrado en el esquema de la **Figura 76**. A continuación, se midió la fluorescencia tras la generación de DCF (fluorescente) a partir de la oxidación del compuesto CM-H2DCFDA.

## RESULTADOS



**Figura 76. Protocolo para la medida de la liberación de especies reactivas de oxígeno (ERO) en células epiteliales de bronquio humano (CEBH) tratadas con cinaciguat o riociguat, con o sin sildenafil, y estimuladas con extracto de humo de tabaco (EHT).** Las CEBH se incubaron con sildenafil (1 μM) durante 15 minutos, seguido de la incubación con cinaciguat o riociguat (100 nM, 1 μM, 10 μM), en presencia o ausencia de sildenafil, durante 24 horas o 6 días. Transcurrido ese periodo, se añadió EHT al 5% y se incubaron 1 hora, momento en el cual se midió la liberación de ERO. Imagen creada con PowerPoint.

Al tratar las CEBH previamente con cinaciguat o riociguat, con o sin sildenafil, durante 24 horas antes del estímulo con el EHT, se observó que únicamente la concentración más alta de ambos fármacos testada (10 μM) en presencia de sildenafil 1 μM conseguían reducir de manera significativa las ERO producidas por el EHT 5% (**Figura 77 A y B**). Sin embargo, al aumentar el tratamiento de las CEBH con cinaciguat y riociguat (con o sin sildenafil) a 6 días, se observó una mayor disminución de las ERO que al tratar las células durante 24 horas. En la **Figura 77 C y D** se observa que, tras el tratamiento durante 6 días, tanto el cinaciguat como el riociguat a cualquier dosis testada junto con el sildenafil disminuye de manera significativa y dosis dependiente la liberación de las ERO producida tras estimular las CEBH con el EHT.



**Figura 77. Cinaciguat y riociguat atenúan la liberación de especies reactivas de oxígeno (ERO) provocada por el extracto de humo de tabaco (EHT) en células epiteliales de bronquio humano (CEBH).** Para medir la liberación de ERO, se cuantificó por citometría la fluorescencia de DCF generado a partir del CM-H<sub>2</sub>DCFDA. A) Liberación de ERO en CEBH incubadas 15 minutos con sildenafil 1 μM, seguido de 24 horas con cinaciguat (100 nM, 1 μM y 10 μM), en presencia o ausencia de sildenafil 1 μM y estimulados con EHT 5% durante 1 h. B) Liberación de ERO en CEBH incubadas 15 minutos con sildenafil 1 μM, seguido de 24 horas con riociguat (100 nM, 1 μM y 10 μM), en presencia o ausencia de sildenafil 1 μM y estimulados con EHT 5% durante 1 h. C) Liberación de ERO en CEBH incubadas 15 minutos con sildenafil 1 μM, seguido de 6 días con cinaciguat (100 nM, 1 μM y 10 μM), en presencia o ausencia de sildenafil 1 μM y estimulados con EHT 5% durante 1 h. D) Liberación de ERO en CEBH incubadas 15 minutos con sildenafil 1 μM, seguido de 6 días con riociguat (100 nM, 1 μM y 10 μM), en presencia o ausencia de sildenafil 1 μM y estimulados con EHT 5% durante 1 h. Los resultados se expresan como la media ± SD. Las comparaciones fueron analizadas mediante test ANOVA unidireccional seguido de un test post hoc de Bonferroni. #P < 0.05 respecto al control. \*P < 0.05 respecto al estímulo EHT 5%.



## **5 DISCUSIÓN**



Actualmente, los tratamientos del EPOC y el asma no previenen la progresión de estas enfermedades, ni revierten los procesos característicos de estas enfermedades como son la inflamación y la fibrosis de las vías aéreas. Esto pone de manifiesto la necesidad de buscar alternativas farmacológicas para el tratamiento de estos pacientes. Por esta razón, en la presente tesis doctoral se ha analizado la modulación del eje NO – GCs – GMPc para el tratamiento de estas enfermedades. Concretamente, se ha estudiado *in vitro* el efecto antiinflamatorio, antioxidante y antifibrótico de los fármacos moduladores de la GCs cinaciguat y riociguat, en presencia o no del sildenafil, inhibidor de la PDE5 en las vías aéreas.

Para ello, el primer objetivo fue elucidar la expresión de la enzima GCs en pacientes EPOC y en pacientes asmáticos. En estudios previos se observó que los pacientes con EPOC muestran una menor expresión de las subunidades  $\alpha_1$  y  $\beta_1$  de la GCs en comparación con sujetos sanos <sup>22,95</sup>. Los resultados del presente trabajo también muestran una menor expresión génica y proteica de la enzima GCs en el tejido pulmonar de pacientes con EPOC, pero, además, se ha demostrado que la disminución de la expresión de esta enzima está relacionada con la gravedad de la EPOC. Por otro lado, el grupo de Papapetropoulos et al. observó en un modelo animal de asma, una disminución de ambas subunidades de la enzima GCs respecto a los animales sanos <sup>96</sup>. Esto va en línea con los resultados obtenidos en la presente tesis doctoral, ya que se ha observado que en el tejido pulmonar de pacientes asmáticos hay una menor expresión génica y proteica de las subunidades  $\alpha_1$  y  $\beta_1$  de la GCs.

Además, también se ha estudiado la posible causa de la disminución de la GCs en las vías aéreas de los pacientes con EPOC y asmáticos. En estudios previos se demostró una disminución de la expresión de la subunidad  $\alpha_1$  de la GCs provocada por TGF- $\beta$  en células de músculo liso de arteria pulmonar <sup>97</sup>. Siguiendo con esta línea, se exploró el efecto que podían tener tanto el humo del tabaco, una de las principales causas de la EPOC, como el TGF- $\beta$ , importante mediador de los procesos fibróticos de ambas enfermedades, en la expresión de la enzima GCs en FPH y CEBH. Ambos estímulos provocaron una disminución en estas células de las subunidades  $\alpha_1$  y  $\beta_1$  de la GCs, siendo más acusado el efecto sobre los FPH. Este hallazgo es importante porque una menor expresión de la enzima en estos tipos celulares pulmonares, se traduce en una reducción de los niveles de GMPc, lo que favorece el aumento del tono de las vías aéreas y la fibrosis <sup>99</sup>.

Por otra parte, el humo del tabaco, además de provocar una menor expresión génica de las subunidades  $\alpha_1$  y  $\beta_1$  de la GCs, participa en el aumento del estrés oxidativo característico de los pacientes con EPOC <sup>75</sup>. Por esta razón, se estudió el efecto del humo del tabaco en el estado redox de la enzima GCs, pues la oxidación del grupo hemo de la enzima ( $Fe^{+2} \rightarrow Fe^{+3}$ ) la hace inactiva al NO, e incluso puede provocar una pérdida de

este, que genera la ubiquitinación de la GCs <sup>133</sup>. Los resultados de la presente tesis muestran que el EHT provoca una oxidación del grupo hemo de la enzima y que, además, esa oxidación es dependiente de la concentración de EHT utilizada. Estos resultados novedosos son clave para el abordaje de la modulación farmacológica del eje NO – GCs – GMPc, pues en función del estado redox de la enzima GCs son más efectivos los fármacos estimuladores o los fármacos activadores de la GCs <sup>113,131,132</sup>. En esta línea en la presente tesis doctoral se ha observado que la oxidación de la enzima provocada por el EHT atenuó el efecto del riociguat en la estimulación de esta, pero no afectó a la activación de la GCs producida por el cinaciguat. Por otra parte, se buscó elucidar la generación de GMPc por parte de la GCs reducida y oxidada, tras la modulación de esta por parte del cinaciguat y el riociguat, en presencia del sildenafil. Con la enzima GCs reducida, al evitar la degradación del GMPc con el sildenafil simultáneamente a la modulación de la GCs se consiguió aumentar notablemente los valores de GMPc, respecto a los obtenidos en ausencia del inhibidor de la PDE5. Además, a diferencia de lo observado en ausencia de sildenafil, con la presencia de este, al estimular la oxidación con EHT de las células tratadas tanto con cinaciguat como con riociguat, se obtuvo un ascenso de la concentración de GMPc respecto a los niveles obtenidos sin el estímulo del EHT. Igualmente, en las células únicamente testadas con el sildenafil se vio un ligero aumento de la concentración de GMPc al ser estimuladas con EHT. Esto podría producirse porque el EHT tiene gran cantidad de NO, que activaría la enzima GCs <sup>155,156</sup>, aunque a la vez otros componentes de los cigarrillos la oxidan. Por esta razón, podría ocurrir que en presencia de sildenafil, no se degrade el GMPc generado por la fracción de la enzima no oxidada, tras estimular su actividad con el riociguat y/o el NO presente en el EHT.

Asimismo, se analizó como se modulaba la enzima GCs naturalmente presente en neutrófilos, FPH y células epiteliales bronquiales. En el caso de los neutrófilos, se observó que el cinaciguat y el riociguat generaban más GMPc tras el tratamiento durante 24 horas, que únicamente al tratar los neutrófilos 1 hora con estos fármacos. En el caso de los FPH y las células epiteliales, se midieron los niveles de GMPc alcanzados tras tratar estas células durante 1 hora, 24 horas, 48 horas y 6 días con los moduladores de la GCs, con y sin sildenafil. En los FPH, se alcanzaron los niveles más altos de GMPc a las 48 horas. Sin embargo, en las células epiteliales el mayor nivel de GMPc se alcanzó a las 24 horas del tratamiento con los fármacos moduladores de la GCs. Estos resultados obtenidos en los tres tipos celulares indican que existe una formación de GMPc de manera lineal durante el inicio de la modulación de la GCs, que se agota con el tiempo.

Además cabe destacar que en los tres casos se observó una mayor capacidad de modulación de la GCs y, por tanto, de generación de GMPc por parte del cinaciguat que del riociguat, lo que coincide con lo esperado, ya que los activadores de la GCs son más potentes a la hora de modular la actividad de la enzima <sup>157</sup>. Por otro lado, la presencia

del inhibidor de la PDE5 aumentó el nivel de GMPc en todas las condiciones al evitar la degradación de GMPc formado por la modulación de la GCs.

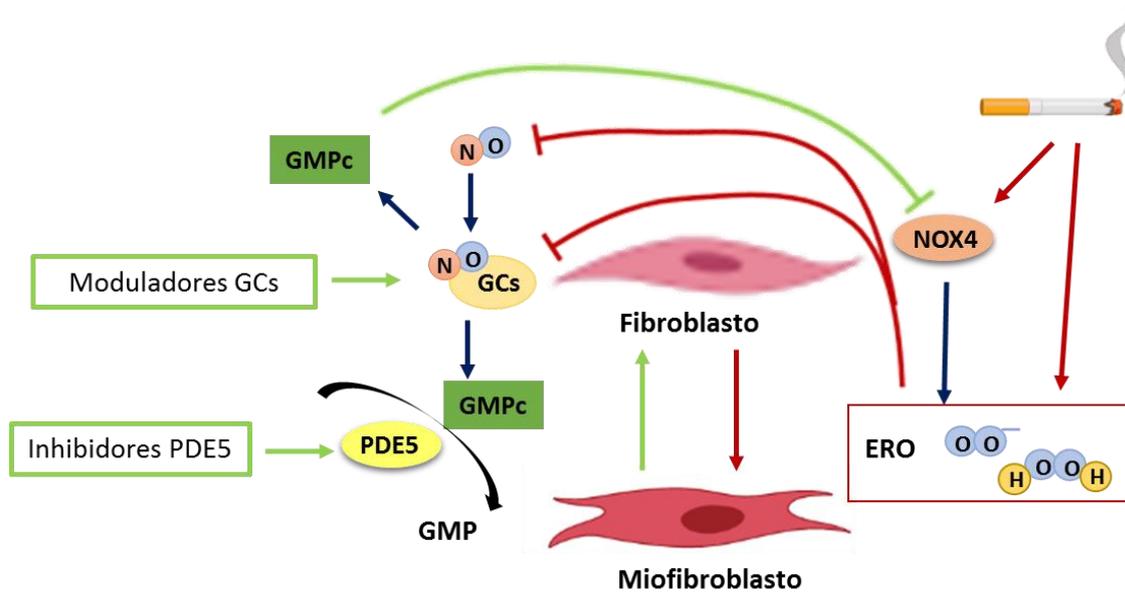
Una vez analizada la modulación de la GCs por parte del cinaciguat y el riociguat, con o sin sildenafil, se estudió el efecto antiinflamatorio de estos fármacos. Ninguna concentración de los fármacos cinaciguat y riociguat testada, ni en presencia ni en ausencia de sildenafil, consiguió revertir el incremento de la concentración de los mediadores inflamatorios IL-8, MMP-9, elastasa y TNF- $\alpha$  producido por 1  $\mu$ g/ml de LPS. En cambio, el cinaciguat a la concentración más alta testada (10  $\mu$ M), únicamente en presencia de sildenafil 1  $\mu$ M, si consiguió atenuar el incremento de IL-8 y TNF- $\alpha$  producido por el EHT, aunque no evitó el incremento de MMP-9.

La presencia de EHT aumentó significativamente los valores de GMPc producidos por la GCs tras su activación con el cinaciguat y la inhibición de la PDE5, por lo que esta podría ser la razón por la cual el cinaciguat en presencia de sildenafil consiga atenuar el incremento de estos marcadores inflamatorios producido por el EHT, pero no el incremento producido por el LPS. Por otro lado, el riociguat no ha demostrado en el presente trabajo el mismo potencial que el cinaciguat para la generación de GMPc, lo que explicaría la ausencia de efecto en la liberación de estos marcadores inflamatorios. Previamente a este trabajo, el estimulador BAY 41-2272, sí que demostró ser capaz de disminuir la producción de IL-8 inducida por el forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) <sup>122</sup>. Estas diferencias entre la capacidad de los estimuladores en la inhibición de la liberación de IL-8 por parte de los neutrófilos podría explicarse por diferentes razones: en primer lugar, porque aunque los dos fármacos estimulan la GCs, son fármacos diferentes con diferentes propiedades farmacocinéticas <sup>117</sup>; en segundo lugar, la concentración más alta de riociguat testada en la presente tesis doctoral es de 10  $\mu$ M y el efecto del BAY 41-2272 se ha visto a una concentración de 30  $\mu$ M; por otro lado, tal y como dicen los autores del estudio, el efecto del BAY 41-2272 podría ser debido a otra ruta, además de al incremento del GMPc <sup>122</sup> y finalmente, el estímulo utilizado en ambos estudios para generar un aumento en la liberación de IL-8 no es el mismo. Por todos estos motivos, los resultados obtenidos en ambos trabajos no son comparables.

Siguiendo con el potencial antiinflamatorio de los fármacos moduladores de la enzima GCs, en anteriores estudios se ha visto que el fármaco BAY 41-2272 es capaz de atenuar la adhesión de los leucocitos a las células endoteliales en animales estimuladas con IL-1 $\beta$  mediante la generación de GMPc <sup>124</sup>. En la presente tesis doctoral, se utilizó el tabaco como estímulo de la inflamación, para provocar la adhesión de las células inflamatorias a la monocapa de endotelio formada por las células HMVEC-L. El cinaciguat y el riociguat, con o sin sildenafil, consiguieron atenuar la adhesión de los monocitos al endotelio. Probablemente, el mecanismo de estos fármacos sea similar al descrito por Ahluwalia et al., que determinaron que la activación de la GCs por el BAY 41-2272 generaba una

disminución de la expresión de la P-selectina, molécula de adhesión presente en células endoteliales y plaquetas <sup>124</sup>. Sin embargo, futuros estudios en esta línea serían necesarios para elucidar el mecanismo de acción del cinaciguat y el riociguat en la adhesión de los leucocitos provocada por el tabaco.

Por otro lado, se quiso estudiar el potencial antioxidante del cinaciguat y el riociguat en FPH y CEBH. Los resultados demuestran que en FPH, tanto el cinaciguat como el riociguat (con o sin sildenafil) son capaces de reducir la generación de ERO durante un tratamiento continuado de las células (6 días), aunque su potencial es menor en el tratamiento menos extenso (24 horas). Una de las posibles vías de actuación de los fármacos es la disminución de la expresión de NOX4 aumentada por estímulos oxidantes como el tabaco. Sin embargo, en este tipo celular, estos fármacos no son capaces de incrementar la disminución del GSH provocada por el EHT. En cambio, en las CEBH, únicamente el tratamiento de estas con cinaciguat o riociguat en presencia de sildenafil consigue atenuar el incremento de las ERO. De igual forma que en las FPH, el tratamiento continuado de las células con estos fármacos (6 días) es más eficaz que un tratamiento más corto (24 horas). En este caso los fármacos también fueron capaces de atenuar la expresión de NOX4 producida por el tabaco. Además, en este tipo celular las concentraciones más altas de cinaciguat y riociguat testadas, con y sin sildenafil, también fueron capaces de atenuar el descenso de GSH provocado por el humo del tabaco. La reducción de las ERO es clave para evitar o atenuar los procesos fibróticos. En este sentido, se ha demostrado que la enzima NOX4 está muy interconectada con la GCs. Como se observa en la **Figura 78**, NOX4 además de participar en procesos como la TFM, está involucrada en la disminución de la ruta NO – GCs – GMPc. Aunque la ERO más habitual que genera NOX4 es H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, también puede producir de manera residual O<sub>2</sub><sup>-</sup> que al reaccionar con el NO generando ONOO<sup>-</sup> y provocando una disminución de los niveles de NO. Además el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> puede producir una disminución de la activación de la GCs por diversas razones como la fosforilación de la subunidad β de la GCs <sup>158</sup> o la oxidación del grupo hemo de la enzima, entre otras. Como se ha comentado con anterioridad, una disminución de GMPc se traduce en una menor activación de la PKG y un aumento en la señalización de TGF-β, lo que contribuye a la fibrosis <sup>99</sup>. Con los resultados obtenidos en el presente trabajo, se puede deducir que un aumento del GMPc por los fármacos moduladores de la GCs podría provocar una disminución de los procesos fibróticos no solo por la atenuación de la señalización de TGF-β, sino también gracias a su capacidad de reducir las ERO mediante la disminución de la sobreexpresión de la NOX4 (**Figura 78**).



**Figura 78. Interacción de las enzimas guanilato ciclasa soluble (GCs) y la NADPH Oxidasa 4 (NOX4) y su participación en la transición fibroblasto-miofibroblasto (TFM).** El humo del tabaco es fuente exógena de especies reactivas de oxígeno. A su vez, el tabaco provoca un incremento de NOX4, que genera un mayor número de ERO. Las ERO favorecen la TFM y por tanto el aumento de tono vascular y la fibrosis. Por otro lado, con el incremento de las ERO, NOX4 está involucrada en la disminución de la ruta NO – GCs – GMPc. Esto ocurre porque las ERO pueden reaccionar con el NO generando ONOO- y provocando una disminución de los niveles de NO. Además, las ERO pueden generar una disminución de la activación de la GCs. Esto favorece la TFM ya que una disminución del GMPc se traduce en una mayor señalización de TGF- $\beta$ . Los fármacos moduladores de la GCs mediante el incremento de los niveles de GMPc podrían provocar una disminución de fibrosis, tanto por la atenuación de la señalización de TGF- $\beta$ , como por su capacidad de reducir las ERO mediante la disminución de la sobreexpresión de la NOX4. Imagen creada con Biorender.

Sin embargo, cabe decir, que, aunque los fármacos sean capaces de reducir la expresión de la NOX4 producida por el EHT, y disminuyan los niveles de ERO, tanto en los FPH como las CEBH, no son capaces de restaurar los niveles de ERO a los observados en células sin estimular con EHT. Esto puede ser debido a que el tabaco, además de activar la expresión de la NOX4, es también fuente exógena de ERO<sup>159</sup>, e incluso podría actuar por otras vías de señalización no estudiadas en este trabajo y en las que no participa el GMPc. De hecho, en pacientes con EPOC hay un gran aumento del estrés oxidativo en los pulmones producida por la gran cantidad de oxidantes presentes en el humo del cigarrillo<sup>159</sup>.

Por otra parte, como se ha comentado con anterioridad, el GMPc está involucrado en la señalización de TGF- $\beta$ , importante en procesos fibróticos. Estudios anteriores muestran que el estimulador BAY 41-2272 tiene un efecto antifibrótico en FPH tratados con TGF- $\beta$ <sup>101,129</sup>. Sin embargo, no hay estudios del papel del riociguat o el cinaciguat en la proliferación de los fibroblastos y la TFM de fibroblastos pulmonares. Además, aunque se ha demostrado que el riociguat es capaz de reducir la TEM en un modelo de animal de enfermedad renal crónica en la que el TGF- $\beta$  es un mediador importante<sup>130</sup>, tampoco hay evidencias de su papel en enfermedades fibróticas pulmonares. Por este motivo, se

estudió el papel de estos fármacos en la fibrosis pulmonar presente en enfermedades como el EPOC y el asma.

Los resultados del presente trabajo muestran que tanto el cinaciguat como el riociguat a dosis altas y en presencia de sildenafil, son capaces de reducir la hiperproliferación de los fibroblastos producida por TGF- $\beta$ . Además, en este trabajo se ha demostrado que los fármacos moduladores de la GCs atenúan la TFM en FPH. En este sentido, tanto el EHT como TGF- $\beta$ , incrementaron la expresión génica de los marcadores COL1,  $\alpha$ -SMA, fibronectina y CTGF; y el cinaciguat y el riociguat, con o sin sildenafil, atenuaron ese aumento de la expresión génica. Además, en el caso de los FPH estimulados con EHT se midió la expresión de TGF- $\beta$  para comprobar que el EHT favorecía la TFM a través del aumento de expresión de este factor de crecimiento. Como se había observado previamente en nuestro laboratorio en otros tipos celulares <sup>58</sup>, el EHT provocó un aumento de TGF- $\beta$  en los FPH. Igualmente, el cinaciguat y el riociguat, en presencia o ausencia de sildenafil, consiguieron atenuar ese incremento. Además, para elucidar el mecanismo de los fármacos moduladores de la GCs en la señalización de TGF- $\beta$ , se analizó la fosforilación de ERK1/2 y de SMAD3. Los resultados que se obtuvieron indican que los fármacos ejercen su acción en la TFM actuando tanto a través de la ruta canónica (SMAD3) como de la ruta no canónica (ERK1/2) de TGF- $\beta$ , aunque tengan un mayor potencial en la ruta de fosforilación de ERK1/2. Estos resultados van en línea con otros obtenidos anteriormente en otros estudios, pues en fibroblastos de piel humana se observó que el GMPc interfiere con la señalización de TGF- $\beta$  principalmente al inhibir la ruta no canónica (101), pero también se ha observado en células endoteliales que el GMPc puede interferir en la ruta canónica, dependiente de SMAD <sup>102</sup>.

A continuación, se observó que el cinaciguat y el riociguat, con y sin sildenafil, también son capaces de atenuar la TEM. En estos ensayos con CEBH se observó que los fármacos son capaces de atenuar la expresión génica y proteica del COL1, lo que indica que evitarían la deposición de matriz extracelular, además de atenuar la expresión del marcador mesenquimal  $\alpha$ -SMA. Sin embargo, estos fármacos a las concentraciones testadas *in vitro* no son capaces de evitar la disminución de la proteína de adhesión E-cadherina, característica de las células epiteliales. Esto contrasta con lo observado en un modelo animal de lesión renal en el que el riociguat es capaz de atenuar no solo la sobreexpresión de COL1 y  $\alpha$ -SMA, sino que también revierte la expresión de E-cadherina <sup>130</sup>. Sin embargo, estos animales reciben un tratamiento continuado del fármaco durante 14 días, por lo que no se debería descartar que un tratamiento continuado de los fármacos moduladores de la GCs consiguiera aumentar en células epiteliales pulmonares los niveles de E-cadherina disminuidos por TGF- $\beta$ . Tal y como ocurre en FPH, los datos obtenidos en el presente estudio indican que los fármacos ejercen su acción en la TEM actuando tanto a través de la ruta canónica (SMAD3) como de la ruta no canónica (ERK1/2) de TGF- $\beta$ .

Finalmente, se estudió el efecto de los fármacos cinaciguat y riociguat, con o sin sildenafil, en los procesos de TFM y TEM al silenciar la subunidad  $\beta_1$  de la GCs. Se escogió el silenciamiento de la subunidad  $\beta_1$  de la GCs porque en esta subunidad es donde se unen los fármacos estimuladores y activadores de la GCs <sup>115,136</sup>. Los resultados muestran una inhibición del efecto del riociguat tanto en la TFM como en la TEM al silenciar esta subunidad. El silenciamiento de la subunidad  $\beta_1$  de la GCs en FPH también evita significativamente el efecto del cinaciguat en la TFM. Sin embargo, cabe destacar que, en las CEBH, el silenciamiento de esta subunidad no consigue atenuar el efecto del cinaciguat, con y sin sildenafil, en la expresión del marcador mesenquimal  $\alpha$ -SMA. Esto podría explicarse porque el silenciamiento de la enzima GCs no ocurre de manera completa, pues tras silenciar la subunidad  $\beta_1$  sigue quedando una expresión residual de esta subunidad. Como se ha demostrado en este trabajo, el cinaciguat tiene un potencial mucho mayor que el riociguat para la generación de GMPc, por lo que podría activar la enzima residual no silenciada, generando el suficiente GMPc para atenuar la TEM. Sin embargo, no hay que descartar que este fármaco actúe por otras vías para la atenuación de la fibrosis, además de por la vía de activación de la GCs. Por este motivo, futuros estudios en esta línea serían necesarios para elucidar completamente el mecanismo de acción de este fármaco.

Estos resultados, tomados en conjunto, sugieren que la modulación farmacológica de la GCs tiene un efecto inhibitorio en procesos inflamatorios como la adhesión de los leucocitos, así como en los procesos de oxidación y fibrosis característicos de estas enfermedades. Por tanto, los moduladores de la GCs, solos o en compañía de inhibidores de la PDE5 son prometedores para el tratamiento de enfermedades fibróticas. Dentro de los fármacos moduladores de la GCs, el riociguat, es un fármaco que ya ha sido aprobado para otras enfermedades como la hipertensión arterial pulmonar y la hipertensión pulmonar tromboembólica crónica, por lo que ya está demostrada su seguridad. Futuros estudios en línea con el presente trabajo deberían ir encaminados a comprobar su eficacia en pacientes con EPOC o asma. Por otro lado, es necesaria la futura investigación en la búsqueda de activadores de la GCs como el cinaciguat, que sean seguros a la vez que eficaces, pues como se ha demostrado en el presente son capaces de activar la GCs incluso en condiciones de estrés oxidativo y podrían ser clave para el tratamiento de la EPOC y el asma.



## **6 CONCLUSIONES**



1. El TGF- $\beta$  y el humo del tabaco provocan una disminución de la expresión de las subunidades  $\alpha_1$  y  $\beta_1$  de la GCs en FPH y CEBH.
2. El humo del tabaco provoca la oxidación del grupo hemo de la GCs.
3. El cinaciguat y el riociguat no muestran buenos resultados en la modulación de la liberación de mediadores inflamatorios por parte de los neutrófilos. Sin embargo, si muestran propiedades antiinflamatorias en la adhesión de los leucocitos.
4. El cinaciguat y el riociguat, con y sin sildenafil, disminuyen la expresión de la NOX4 producida por el tabaco en FPH y CEBH. Esto provoca una disminución de la liberación de ERO.
5. Los fármacos moduladores de la GCs, con y sin sildenafil, atenúan la proliferación de los fibroblastos, la TFM y la TEM, disminuyendo la señalización de TGF- $\beta$ , tanto por la ruta canónica (SMAD3) como por la ruta no canónica (ERK1/2).



## **7 REFERENCIAS**



1. Moncada, S., Higgs, A. & Furchgott, R. International Union of Pharmacology Nomenclature in Nitric Oxide Research. *Pharmacol. Rev.* **49**, 137–142 (1997).
2. Szabo, C. Gaseotransmitters: new frontiers for translational science. *Sci. Transl. Med.* **2**, 59ps54 (2010).
3. Zou, Z. *et al.* NOS1 expression promotes proliferation and invasion and enhances chemoresistance in ovarian cancer. *Oncol. Lett.* **19**, 2989–2995 (2020).
4. van den Berg, M. P., Meurs, H. & Gosens, R. Targeting arginase and nitric oxide metabolism in chronic airway diseases and their co-morbidities. *Curr. Opin. Pharmacol.* **40**, 126–133 (2018).
5. Mattila, J. T. & Thomas, A. C. Nitric oxide synthase: non-canonical expression patterns. *Front. Immunol.* **5**, (2014).
6. Pautz, A. *et al.* Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Nitric Oxide* **23**, 75–93 (2010).
7. Guo, Z., Zheng, L., Liao, X. & Geller, D. Up-regulation of human inducible nitric oxide synthase by p300 transcriptional complex. *PLOS ONE* **11**, e0146640 (2016).
8. Donnelly, L. E. & Barnes, P. J. Expression and regulation of inducible nitric oxide synthase from human primary airway epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* **26**, 144–151 (2002).
9. Roy, S., Sharma, S., Sharma, M., Aggarwal, R. & Bose, M. Induction of nitric oxide release from the human alveolar epithelial cell line A549: an in vitro correlate of innate immune response to Mycobacterium tuberculosis. *Immunology* **112**, 471–480 (2004).
10. Lee, M., Rey, K., Besler, K., Wang, C. & Choy, J. Immunobiology of nitric oxide and regulation of inducible nitric oxide synthase. in *Macrophages: Origin, Functions and Biointervention* (ed. Kloc, M.) 181–207 (Springer International Publishing, 2017). doi:10.1007/978-3-319-54090-0\_8.
11. Rochette, L. *et al.* Nitric oxide synthase inhibition and oxidative stress in cardiovascular diseases: Possible therapeutic targets? *Pharmacol. Ther.* **140**, 239–257 (2013).
12. Rath, M., Müller, I., Kropf, P., Closs, E. I. & Munder, M. Metabolism via arginase or nitric oxide synthase: Two competing arginine pathways in macrophages. *Front. Immunol.* **5**, (2014).

13. Mustafa, A. K., Gadalla, M. M. & Snyder, S. H. Signaling by gasotransmitters. *Sci. Signal.* **2**, re2 (2009).
14. Furuta, S. Basal S-Nitrosylation is the guardian of tissue homeostasis. *Trends Cancer* **3**, 744–748 (2017).
15. Montfort, W. R., Wales, J. A. & Weichsel, A. Structure and activation of soluble guanylyl cyclase, the nitric oxide sensor. *Antioxid. Redox Signal.* **26**, 107–121 (2017).
16. Childers, K. C. & Garcin, E. D. Structure/function of the soluble guanylyl cyclase catalytic domain. *Nitric Oxide* **77**, 53–64 (2018).
17. Derbyshire, E. R. & Marletta, M. A. Structure and regulation of soluble guanylate cyclase. *Annu. Rev. Biochem.* **81**, 533–559 (2012).
18. Dupont, L. L., Glynos, C., Bracke, K. R., Brouckaert, P. & Brusselle, G. G. Role of the nitric oxide–soluble guanylyl cyclase pathway in obstructive airway diseases. *Pulm. Pharmacol. Ther.* **29**, 1–6 (2014).
19. F. Rivero-Vilches, S. de Frutos, M. Rodríguez-Puyol, D. Rodríguez-Puyol, & M. Saura. Guanilato ciclasas: procesos fisiológicos mediados por GMPc. *Nefrología* **21(3)**, 233–239 (2001).
20. Haskó, G. *et al.* NO-independent stimulators and activators of soluble guanylate cyclase: discovery and therapeutic potential. *Nat. Rev. Drug Discov.* **5**, 755–768 (2006).
21. Mergia, E., Russwurm, M., Zoidl, G. & Koesling, D. Major occurrence of the new alpha2beta1 isoform of NO-sensitive guanylyl cyclase in brain. *Cell. Signal.* **15**, 189–195 (2003).
22. Glynos, C. *et al.* The role of soluble guanylyl cyclase in chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **188**, 789–799 (2013).
23. Iyer, L. M., Anantharaman, V. & Aravind, L. Ancient conserved domains shared by animal soluble guanylyl cyclases and bacterial signaling proteins. *BMC Genom.* **4**, 5–5 (2003).
24. Kang, Y., Liu, R., Wu, J. X. & Chen, L. Structural insights into the mechanism of human soluble guanylate cyclase. *Nature* **574**, 206–210 (2019).
25. Stasch, J.-P. *et al.* Targeting the heme-oxidized nitric oxide receptor for selective vasodilatation of diseased blood vessels. *J. Clin. Invest.* **116**, 2552–2561 (2006).

26. Sehnal, D. *et al.* Mol\* Viewer: modern web app for 3D visualization and analysis of large biomolecular structures. *Nucleic Acids Research* **49**, W431–W437 (2021).
27. Francis, S. H., Busch, J. L., Corbin, J. D. & Sibley, D. cGMP-dependent protein kinases and cGMP phosphodiesterases in nitric oxide and cGMP action. *Pharmacol. Rev.* **62**, 525–563 (2010).
28. Stout, S. L., Wyatt, T. A., Adams, J. J. & Sisson, J. H. Nitric oxide-dependent cilia regulatory enzyme localization in bovine bronchial epithelial cells. *J. Histochem. Cytochem.* **55**, 433–442 (2007).
29. Spitler, R. *et al.* Nitrosyl-cobinamide (NO-Cbi), a new nitric oxide donor, improves wound healing through cGMP/cGMP-dependent protein kinase. *Cell. Signal.* **25**, 2374–2382 (2013).
30. Liu, Y., Jiang, B.-J., Zhao, R.-Z. & Ji, H.-L. Epithelial sodium channels in pulmonary epithelial progenitor and stem cells. *Int. J. Biol. Sci.* **12**, 1150–1154 (2016).
31. Nie, H.-G. *et al.* Regulation of epithelial sodium channels by cGMP/PKGII. *J. Physiol.* **587**, 2663–2676 (2009).
32. Francis, S. H., Turko, I. V. & Corbin, J. D. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: relating structure and function. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **65**, 1–52 (2001).
33. Abusnina, A. & Lugnier, C. Therapeutic potentials of natural compounds acting on cyclic nucleotide phosphodiesterase families. *Cell. Signal.* **39**, 55–65 (2017).
34. Shafiee-Nick, R. *et al.* A comprehensive review on the potential therapeutic benefits of phosphodiesterase inhibitors on cardiovascular diseases. *Biomed. Pharmacother.* **94**, 541–556 (2017).
35. Kayık, G., Tüzün, N. Ş. & Durdagi, S. Investigation of PDE5/PDE6 and PDE5/PDE11 selective potent tadalafil-like PDE5 inhibitors using combination of molecular modeling approaches, molecular fingerprint-based virtual screening protocols and structure-based pharmacophore development. *J Enzyme Inhib Med Chem* **32**, 311–330 (2017).
36. Carøe Nordgaard, J., Kruse, L. S., Gammeltoft, S. & Kruuse, C. R. Role of Ser102 and Ser104 as Regulators of cGMP Hydrolysis by PDE5A. *PLoS ONE* **9**, e107627 (2014).
37. Lin, C.-S., Chow, S., Lau, A., Tu, R. & Lue, T. F. Human PDE5A gene encodes three PDE5 isoforms from two alternate promoters. *Int J Impot Res* **14**, 15–24 (2002).
38. Zhang, K. Y. J. *et al.* A Glutamine Switch Mechanism for Nucleotide Selectivity by Phosphodiesterases. *Molecular Cell* **15**, 279–286 (2004).

39. Noel, S., Dhooghe, B. & Leal, T. PDE5 inhibitors as potential tools in the treatment of cystic fibrosis. *Front. Pharmacol.* **3**, (2012).
40. Barnes, P. J. Cellular and molecular mechanisms of asthma and COPD. *Clin. Sci. (Lond)* **131**, 1541–1558 (2017).
41. Lambrecht, B. N. & Hammad, H. The immunology of asthma. *Nat. Immunol.* **16**, 45–56 (2015).
42. Carr, T. F. & Bleecker, E. Asthma heterogeneity and severity. *World Allergy Organ. J.* **9**, 41–2. eCollection 2016 (2016).
43. Pakkasela, J. *et al.* Age-specific incidence of allergic and non-allergic asthma. *BMC Pulm. Med.* **20**, 9 (2020).
44. Erle, D. J. & Sheppard, D. The cell biology of asthma. *J Cell Biol* **205**, 621–631 (2014).
45. Doherty, T. & Broide, D. Cytokines and growth factors in airway remodeling in asthma. *Curr Opin Immunol* **19**, 676–680 (2007).
46. Minshall, E. M. *et al.* Eosinophil-associated TGF-beta1 mRNA expression and airways fibrosis in bronchial asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* **17**, 326–333 (1997).
47. Kariyawasam, H. H. & Robinson, D. S. The eosinophil: the cell and its weapons, the cytokines, its locations. *Semin Respir Crit Care Med* **27**, 117–127 (2006).
48. Al-Muhsen, S., Johnson, J. R. & Hamid, Q. Remodeling in asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **128**, 451–462 (2011).
49. Seow, C. Y., Schellenberg, R. R. & Paré, P. D. Structural and functional changes in the airway smooth muscle of asthmatic subjects. *Am J Respir Crit Care Med* **158**, S179-186 (1998).
50. Holgate, S. T. The airway epithelium is central to the pathogenesis of asthma. *Allergol. Int.* **57**, 1–10 (2008).
51. Evans, C. M., Kim, K., Tuvim, M. J. & Dickey, B. F. Mucus hypersecretion in asthma: causes and effects. *Curr. Opin. Pulm. Med.* **15**, 4–11 (2009).
52. Kim, K. C. Role of epithelial mucins during airway infection. *Pulm Pharmacol Ther* **25**, 415–419 (2012).
53. Grigoraş, A., Grigoraş, C. C., Giuşcă, S. E., Căruntu, I. D. & Amălinei, C. Remodeling of basement membrane in patients with asthma. *Rom. J. Morphol. Embryol.* **57**, 115–119 (2016).

54. Michalik, M. *et al.* Fibroblast-to-myofibroblast transition in bronchial asthma. *Cell. Mol. Life Sci.* **75**, 3943–3961 (2018).
55. Westergren-Thorsson, G. *et al.* Pathological airway remodelling in inflammation. *Clin. Respir. J.* **4 Suppl 1**, 1–8 (2010).
56. Hackett, T.-L. *et al.* Induction of epithelial–mesenchymal transition in primary airway epithelial cells from patients with asthma by transforming growth factor- $\beta$ 1. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **180**, 122–133 (2009).
57. Johnson, J. R., Roos, A., Berg, T., Nord, M. & Fuxe, J. Chronic respiratory aeroallergen exposure in mice induces epithelial-mesenchymal transition in the large airways. *PLoS One* **6**, e16175 (2011).
58. Milara, J., Peiro, T., Serrano, A. & Cortijo, J. Epithelial to mesenchymal transition is increased in patients with COPD and induced by cigarette smoke. *Thorax* **68**, 410–420 (2013).
59. McDonald, D. M. Angiogenesis and remodeling of airway vasculature in chronic inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* **164**, S39-45 (2001).
60. Hogg, J. C. The Pathophysiology of Asthma. *CHEST* **82**, 8s–12s (1982).
61. Sato, Y. *et al.* Comparison of inducible nitric oxide synthase mRNA expression in different airway portions and association with nitric oxide parameters from patients with asthma. *Clin. Exp. Allergy* **49**, 582–590 (2019).
62. Roos, A. B. *et al.* Elevated exhaled nitric oxide in allergen-provoked asthma is associated with airway epithelial iNOS. *PLoS One* **9**, (2014).
63. Nishimoto, K. *et al.* Relationship between fraction of exhaled nitric oxide and airway morphology assessed by three-dimensional CT analysis in asthma. *Sci. Rep.* **7**, (2017).
64. Gómez Sáenz, J. T. *et al.* Mortalidad por asma en España, 1990-2015. *Medicina de Familia. SEMERGEN* **45**, 449–457 (2019).
65. Martínez-Moragón, E. *et al.* Coste económico del paciente asmático en España (estudio AsmaCost). *Arch. Bronconeumol.* **45**, 481–486 (2009).
66. Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica. *GEMA5.0. Guía española para el manejo del asma.* (Luzán 5, 2020).
67. Pellegrino, R. *et al.* Interpretative strategies for lung function tests. *Eur Respir J* **26**, 948–968 (2005).

68. Boezen, H. M., Schouten, J. P., Postma, D. S. & Rijcken, B. Distribution of peak expiratory flow variability by age, gender and smoking habits in a random population sample aged 20-70 yrs. *Eur Respir J* **7**, 1814–1820 (1994).
69. Kuo, C. R. *et al.* Scottish consensus statement on the role of FeNO in adult asthma. *Respir Med* **155**, 54–57 (2019).
70. Taylor, D. R. *et al.* A new perspective on concepts of asthma severity and control. *European Respiratory Journal* **32**, 545–554 (2008).
71. Barnes, P. J. Biochemical Basis of Asthma Therapy. *Journal of Biological Chemistry* **286**, 32899–32905 (2011).
72. Agache, I. *et al.* EAACI Biologicals Guidelines—Recommendations for severe asthma. *Allergy* **76**, 14–44 (2021).
73. Brusselle, G. G. & Koppelman, G. H. Biologic Therapies for Severe Asthma. *New England Journal of Medicine* (2022) doi:10.1056/NEJMra2032506.
74. Miravittles, M. *et al.* Guía española de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (GesEPOC) 2017. Tratamiento farmacológico en fase estable. *Arch. Bronconeumol.* **53**, 324–335 (2017).
75. Milara, J. & Cortijo, J. Tobacco, inflammation, and respiratory tract cancer. *Curr. Pharm. Des.* **18**, 3901–3938 (2012).
76. Organización Mundial de la Salud. Enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chronic-obstructive-pulmonary-disease-\(copd\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chronic-obstructive-pulmonary-disease-(copd)).
77. McDonough, J. E. *et al.* Small-airway obstruction and emphysema in chronic obstructive pulmonary disease. *N. Engl. J. Med.* **365**, 1567–1575 (2011).
78. Puhan, M. A., Gimeno-Santos, E., Cates, C. J. & Troosters, T. Pulmonary rehabilitation following exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Cochrane Database Syst. Rev.* **12**, CD005305 (2016).
79. Guo, J., Chen, Y., Zhang, W., Tong, S. & Dong, J. Moderate and severe exacerbations have a significant impact on health-related quality of life, utility, and lung function in patients with chronic obstructive pulmonary disease: A meta-analysis. *Int. J. Surg.* **78**, 28–35 (2020).
80. Hirota, N. & Martin, J. G. Mechanisms of airway remodeling. *Chest* **144**, 1026–1032 (2013).

81. Brusselle, G. G., Joos, G. F. & Bracke, K. R. New insights into the immunology of chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet* **378**, 1015–1026 (2011).
82. Ansarin, K. *et al.* Exhaled nitric oxide in chronic obstructive pulmonary disease: relationship to pulmonary function. *Eur. Respir. J.* **17**, 934–938 (2001).
83. Ghosh, S. *et al.* Nitrotyrosine proteome survey in asthma identifies oxidative mechanism of catalase inactivation. *J. Immunol.* **176**, 5587–5597 (2006).
84. Jiang, W. T., Liu, X. S., Xu, Y. J., Ni, W. & Chen, S. X. Expression of nitric oxide synthase isoenzyme in lung tissue of smokers with and without chronic obstructive pulmonary disease. *Chin. Med. J. (Engl)* **128**, 1584–1589 (2015).
85. Ricciardolo, F. L. M., Sorbello, V., Benedetto, S. & Paleari, D. Effect of ambroxol and beclomethasone on lipopolysaccharide-induced nitrosative stress in bronchial epithelial cells. *Respiration* **89**, 572–582 (2015).
86. Bartesaghi, S. & Radi, R. Fundamentals on the biochemistry of peroxynitrite and protein tyrosine nitration. *Redox Biol.* **14**, 618–625 (2018).
87. Fysikopoulos, A. *et al.* Amelioration of elastase-induced lung emphysema and reversal of pulmonary hypertension by pharmacological iNOS inhibition in mice. *Br. J. Pharmacol.* **178**, 152–171 (2020).
88. Soriano, J. B. *et al.* Prevalence and Determinants of COPD in Spain: EPISCAN II. *Archivos de Bronconeumología* **57**, 61–69 (2021).
89. Alfageme, I. *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* **55**, 38–47 (2019).
90. Pérez, M., Puig-Peiró, R., Aceituno, S. & Lizán, L. Impacto económico de las exacerbaciones agudas en EPOC. *Rev. Patol. Respir.* **19**, 88–95 (2016).
91. Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of COPD, Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) 2022. <http://www.goldcopd.org>.
92. Stephens, M. B. & Yew, K. S. Diagnosis of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *AFP* **78**, 87–92 (2008).
93. Miravittles, M. *et al.* [Translated article] Spanish COPD guidelines (GesEPOC) 2021: Updated pharmacological treatment of stable COPD. *Archivos de Bronconeumología* **58**, T69–T81 (2022).

94. Matera, M. G., Cazzola, M. & Page, C. Prospects for COPD treatment. *Current Opinion in Pharmacology* **56**, 74–84 (2021).
95. Weissmann, N. *et al.* Stimulation of soluble guanylate cyclase prevents cigarette smoke-induced pulmonary hypertension and emphysema. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **189**, 1359–1373 (2014).
96. Papapetropoulos, A., Simoes, D. C., Xanthou, G., Roussos, C. & Gratziou, C. Soluble guanylyl cyclase expression is reduced in allergic asthma. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **290**, 179 (2006).
97. Du, L. & Roberts, J. D. Transforming growth factor- $\beta$  downregulates sGC subunit expression in pulmonary artery smooth muscle cells via MEK and ERK signaling. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **316**, L20–L34 (2019).
98. Zhong, Y., Bry, K. & Roberts, J. D. IL-1 $\beta$  dysregulates cGMP signaling in the newborn lung. *Am. J. Physiol.-Lung Cell. Mol. Physiol.* **319**, L21–L34 (2020).
99. Verrecchia, F. & Mauviel, A. Transforming growth factor-beta and fibrosis. *World J. Gastroenterol.* **13**, 3056–3062 (2007).
100. Liqing Hu *et al.* Soluble guanylate cyclase: A new therapeutic target for fibrotic diseases. *Curr. Med. Chem.* **24**, 3203–3215 (2017).
101. Beyer, C. *et al.* Stimulation of the soluble guanylate cyclase (sGC) inhibits fibrosis by blocking non-canonical TGFbeta signalling. *Ann. Rheum. Dis.* **74**, 1408–1416 (2015).
102. Saura, M. *et al.* Nitric Oxide Regulates Transforming Growth Factor- $\beta$  Signaling in Endothelial Cells. *Circulation Research* **97**, 1115–1123 (2005).
103. Singh, D. *et al.* Selective inducible nitric oxide synthase inhibition has no effect on allergen challenge in asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **176**, 988–993 (2007).
104. Ibba, S. V. *et al.* Potential of inducible nitric oxide synthase as a therapeutic target for allergen-induced airway hyperresponsiveness: A critical connection to nitric oxide levels and PARP activity. *Mediators Inflamm.* **2016**, 1984703 (2016).
105. Boyer, L. *et al.* Role of nitric oxide synthases in elastase-induced emphysema. *Lab. Invest.* **91**, 353–362 (2011).
106. Sandner, P. From molecules to patients: exploring the therapeutic role of soluble guanylate cyclase stimulators. *Biol. Chem.* **399**, 679–690 (2018).

107. Mokry, J. Effects of tadalafil (PDE5 inhibitor) and roflumilast (PDE4 inhibitor) on airway reactivity and markers of inflammation in ovalbumin-induced airway hyperresponsiveness in guinea pigs. *J. Physiol. Pharmacol.* **68**, 721–730 (2017).
108. Ren, Z. *et al.* Therapeutic sildenafil inhibits pulmonary damage induced by cigarette smoke exposure and bacterial inhalation in rats. *Pharm. Biol.* **58**, 116–123 (2020).
109. Wang, T. *et al.* Effect of sildenafil on acrolein-induced airway inflammation and mucus production in rats. *Eur. Respir. J.* **33**, 1122–1132 (2009).
110. Milara, J. *et al.* Cigarette smoke-induced pulmonary endothelial dysfunction is partially suppressed by sildenafil. *Eur. J. Pharm. Sci.* **39**, 363–372 (2010).
111. Seimetz, M. *et al.* Cigarette smoke-Induced emphysema and pulmonary hypertension can be prevented by phosphodiesterase 4 and 5 inhibition in mice. *PloS one* **10**, e0129327 (2015).
112. Evgenov, O. V. *et al.* Nitric oxide-independent stimulation of soluble guanylate cyclase attenuates pulmonary fibrosis. *BMC Pharmacol.* **11**, 09 (2011).
113. Sandner, P. *et al.* Correction to: Soluble guanylate cyclase stimulators and activators. *Handb. Exp. Pharmacol.* (2019) doi:10.1007/164\_2019\_249.
114. Sandner, P., Becker-Pelster, E. M. & Stasch, J. P. Discovery and development of sGC stimulators for the treatment of pulmonary hypertension and rare diseases. *Nitric Oxide* **77**, 88–95 (2018).
115. Wales, J. A. *et al.* Discovery of stimulator binding to a conserved pocket in the heme domain of soluble guanylyl cyclase. *J. Biol. Chem.* **293**, 1850–1864 (2018).
116. Frey, R. *et al.* Clinical pharmacokinetic and pharmacodynamic profile of riociguat. *Clin. Pharmacokinet.* **57**, 647–661 (2018).
117. Dasgupta, A., Bowman, L., D’Arsigny, C. & Archer, S. Soluble guanylate cyclase: A new therapeutic target for pulmonary arterial hypertension and chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Clin. Pharmacol. Ther.* **97**, 88–102 (2015).
118. Lian, T.-Y., Jiang, X. & Jing, Z.-C. Riociguat: a soluble guanylate cyclase stimulator for the treatment of pulmonary hypertension. *Drug Des. Devel. Ther.* **11**, 1195–1207 (2017).
119. Paul, T. *et al.* Therapeutic effects of soluble guanylate cyclase stimulation on pulmonary hemodynamics and emphysema development in guinea pigs

- chronically exposed to cigarette smoke. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **317**, L222–L234 (2019).
120. Pichl, A. *et al.* Riociguat for treatment of pulmonary hypertension in COPD: a translational study. *Eur. Respir. J.* **53**, 10.1183/13993003.02445-2018. Print 2019 Jun (2019).
121. Reiss, C. *et al.* The sGC stimulator riociguat inhibits platelet function in washed platelets but not in whole blood. *Br. J. Pharmacol.* **172**, 5199–5210 (2015).
122. Rosa, P. V. F. *et al.* BAY 41-2272 inhibits human neutrophil functions. *Int. Immunopharmacol.* **75**, 105767 (2019).
123. Thomazzi, S. M., Moreira, J., Nucci, G. D. & Antunes, E. Inhibitory effects on human eosinophil chemotaxis in vitro by BAY 41-2272, an activator of nitric oxide-independent site of soluble guanylate cyclase. *Biochem. Pharmacol.* **69**, 875–882 (2005).
124. Ahluwalia, A. *et al.* Antiinflammatory activity of soluble guanylate cyclase: cGMP-dependent down-regulation of P-Selectin expression and leukocyte recruitment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 1386–1391 (2004).
125. Paul, T. *et al.* Soluble guanylate cyclase stimulation reduces oxidative stress in experimental Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *PLoS One* **13**, e0190628 (2018).
126. Toque, H. A., Mónica, F. Z. T., Morganti, R. P., De Nucci, G. & Antunes, E. Mechanisms of relaxant activity of the nitric oxide-independent soluble guanylyl cyclase stimulator BAY 41-2272 in rat tracheal smooth muscle. *Eur. J. Pharmacol.* **645**, 158–164 (2010).
127. Koziol-White, C. J. *et al.* Soluble guanylate cyclase agonists induce bronchodilation in human small airways. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **62**, 43–48 (2020).
128. Arnab Ghosh *et al.* Soluble guanylate cyclase as an alternative target for bronchodilator therapy in asthma. *PNAS Plus* **113**, E2355–E2362 (2016).
129. Lambers, C. *et al.* Combined activation of guanylate cyclase and cyclic AMP in lung fibroblasts as a novel therapeutic concept for lung fibrosis. *BioMed Res. Int.* **2019**, 1345402–10 (2019).
130. Sravani, S., Saifi, M. A. & Godugu, C. Riociguat ameliorates kidney injury and fibrosis in an animal model. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **530**, 706–712 (2020).

131. Stasch, J. P. *et al.* NO- and haem-independent activation of soluble guanylyl cyclase: molecular basis and cardiovascular implications of a new pharmacological principle. *Br. J. Pharmacol.* **136**, 773–783 (2002).
132. Thoonen, R. *et al.* Cardiovascular and pharmacological implications of haem-deficient NO-unresponsive soluble guanylate cyclase knock-in mice. *Nat. Commun.* **6**, 8482 (2015).
133. Hoffmann, L. S. *et al.* Distinct molecular requirements for activation or stabilization of soluble guanylyl cyclase upon haem oxidation-induced degradation. *Br. J. Pharmacol.* **157**, 781–795 (2009).
134. Meurer, S. *et al.* Nitric oxide-independent vasodilator rescues heme-oxidized soluble guanylate cyclase from proteasomal degradation. *Circ. Res.* **105**, 33–41 (2009).
135. Martin, F. *et al.* Structure of cinaciguat (BAY 58-2667) bound to Nostoc H-NOX domain reveals insights into heme-mimetic activation of the soluble guanylyl cyclase. *J. Biol. Chem.* **285**, 22651–22657 (2010).
136. Schmidt, P. M., Schramm, M., Schröder, H., Wunder, F. & Stasch, J.-P. Identification of residues crucially involved in the binding of the heme moiety of soluble guanylate cyclase. *J Biol Chem* **279**, 3025–3032 (2004).
137. Zenzmaier, C. *et al.* Activators and stimulators of soluble guanylate cyclase counteract myofibroblast differentiation of prostatic and dermal stromal cells. *Exp. Cell Res.* **338**, 162–169 (2015).
138. Dunkern, T. R., Feurstein, D., Rossi, G. A., Sabatini, F. & Hatzelmann, A. Inhibition of TGF-beta induced lung fibroblast to myofibroblast conversion by phosphodiesterase inhibiting drugs and activators of soluble guanylyl cyclase. *Eur. J. Pharmacol.* **572**, 12–22 (2007).
139. Roger, S. *et al.* Anti-aggregating effect of BAY 58-2667, an activator of soluble guanylyl cyclase. *Vascul. Pharmacol.* **53**, 281–287 (2010).
140. Baldissera, L. *et al.* The soluble guanylyl cyclase activator BAY 60-2770 inhibits murine allergic airways inflammation and human eosinophil chemotaxis. *Pulm. Pharmacol. Ther.* **41**, 86–95 (2016).
141. Glynos, C. *et al.* Guanylyl cyclase activation reverses resistive breathing-induced lung injury and inflammation. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **52**, 762–771 (2015).

## REFERENCIAS

---

142. Morell García, A. Implicación de las mucinas 1 y 4 en el asma y la poliposis nasal resistentes a corticoides. (Universidad de Valencia, 2017).
143. Hoffmann, L. S. *et al.* Fluorescence dequenching makes haem-free soluble guanylate cyclase detectable in living cells. *PLOS ONE* **6**, e23596 (2011).
144. Arya, M. *et al.* Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Rev Mol Diagn* **5**, 209–219 (2005).
145. What is Real-Time PCR (qPCR)? *Bio-Rad Laboratories* <https://www.bio-rad.com/es-es/applications-technologies/what-real-time-pcr-qpcr?ID=LUSO4W8UU>.
146. Ballester, B., Milara, J. & Cortijo, J. Pirfenidone anti-fibrotic effects are partially mediated by the inhibition of MUC1 bioactivation. *Oncotarget* **11**, 1306–1320 (2020).
147. Milara, J. *et al.* MUC1 intracellular bioactivation mediates lung fibrosis. *Thorax* **75**, 132–142 (2020).
148. Milara, J. *et al.* MUC4 is overexpressed in idiopathic pulmonary fibrosis and collaborates with transforming growth factor  $\beta$  inducing fibrotic responses. *Mucosal Immunol* **14**, 377–388 (2021).
149. Milara, J. *et al.* The pan-JAK inhibitor LAS194046 reduces neutrophil activation from severe asthma and COPD patients in vitro. *Sci Rep* **12**, 5132 (2022).
150. Milara, J. *et al.* Roflumilast N-oxide reverses corticosteroid resistance in neutrophils from patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **134**, 314-322.e9 (2014).
151. Estornut, C., Ribera, P., Bayarri, A., Montero, P. & Cortijo, J. Omaveloxolone, CDDO-Me and Obacunone as promising therapeutic options in COPD. *European Respiratory Journal* **56**, (2020).
152. Koethe, S. M., Kuhnmuench, J. R. & Becker, C. G. Neutrophil Priming by Cigarette Smoke Condensate and a Tobacco Anti-Idiotypic Antibody. *The American Journal of Pathology* **157**, 1735–1743 (2000).
153. Cortijo, J. *et al.* Roflumilast, a phosphodiesterase 4 inhibitor, alleviates bleomycin-induced lung injury. *Br J Pharmacol* **156**, 534–544 (2009).
154. Estornut, C., Roger, I., Ballester, B., Ribera, P. & Cortijo, J. Activation of nuclear factor erythroid 2-related (Nrf2) system as a novel therapeutic approach in COPD. *European Respiratory Journal* **54**, (2019).

- 
155. Cueto, R. & Pryor, W. A. Cigarette smoke chemistry: conversion of nitric oxide to nitrogen dioxide and reactions of nitrogen oxides with other smoke components as studied by Fourier transform infrared spectroscopy. *Vibrational Spectroscopy* **7**, 97–111 (1994).
  156. Arnold, W. P., Aldred, R. & Murad, F. Cigarette Smoke Activates Guanylate Cyclase and Increases Guanosine 3',5'-Monophosphate in Tissues. *Science* **198**, 934–936 (1977).
  157. Sandner, P. *et al.* Soluble GC stimulators and activators: Past, present and future. *British Journal of Pharmacology* **1**, (2021).
  158. Sampson, N., Berger, P. & Zenzmaier, C. Redox Signaling as a Therapeutic Target to Inhibit Myofibroblast Activation in Degenerative Fibrotic Disease. *BioMed Research International* **2014**, e131737 (2014).
  159. Calle Vela, E. & Melgarejo Pomar, I. OXIDANTES EN EL HUMO DEL CIGARRILLO Y ENFERMEDAD CARDIOPULMONAR. *Cuadernos Hospital de Clínicas* **50**, 88–92 (2005).



**ANEXOS**



**ANEXO 1.**  
**Aprobación del comité ético para el estudio con**  
**pacientes**



En Valencia, a 02 de Mayo de 2017

D. Josep Redón i Más, Presidente del **Comité Científico Interno** de la Fundación de Investigación del Hospital Clínico Universitario de Valencia – Instituto de Investigación Sanitaria INCLIVA

### CERTIFICA

Que el proyecto con título “Modulación del eje óxido nítrico-guanilato ciclasa soluble- GMPC como nueva diana farmacológica para el tratamiento del asma y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC).” que se llevará cabo en los Servicios de Cirugía Torácica y Neumología con la colaboración del Dr. Genaro Galan y la Dra. M<sup>a</sup> Cruz Gonzalez, siendo el investigador principal en nuestro centro el Dr. Esteban Morcillo Sánchez, ha sido evaluado por este Comité en su reunión del día 20 de Abril de 2017, encontrándolo conforme con los requisitos de capacitación del solicitante, la adecuación del proyecto a los medios existentes, la adecuación de la memoria y el interés de los resultados del proyecto para el área de salud.

Y para que conste, a efectos oportunos de las ayudas de la Conselleria de Educación PROMETEO del Dr. Julio Cortijo Gimeno



Fdo.: Dr. Josep Redón i Más  
Presidente del Comité