

UNIVERSIDAD DE VALENCIA
FACULTAD DE MEDICINA
Departamento de Medicina
Programa de doctorado: 3139 medicina



**Análisis de los efectos antiinflamatorios del
bromuro de aclidinio sobre los neutrófilos de
pacientes con EPOC: una aproximación a los
mecanismos de corticorresistencia**

TESIS DOCTORAL

Presentada por:

MARIA ANGÉLICA CERVERA JUAN

Dirigida por:

DR. D. JAVIER MILARA PAYÁ
DR. D. GUSTAVO JUAN SAMPER
DR. D. JULIO CORTIJO GIMENO

ENERO DE 2023



Dr. JAVIER MILARA PAYÁ

Profesor asociado de Universidad

Departamento de Farmacología

Universidad de Valencia

Farmacéutico adjunto en el Consorcio Hospital General Universitario de Valencia

Certifica:

Que la Tesis Doctoral presentada por Doña María Angélica Cervera Juan, con el título:

“Análisis de los efectos antiinflamatorios del bromuro de acldinio sobre los neutrófilos de pacientes con EPOC: una aproximación a los mecanismos de corticorresistencia”

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 Valencia, 13 de diciembre de 2022

**MILARA PAYA
JAVIER - 29191882Y**

Firmado digitalmente por MILARA PAYA JAVIER -
29191882Y
Nombre de reconocimiento (DN): c=ES,
serialNumber=IDCES-29191882Y, givenName=JAVIER,
sn=MILARA PAYA, cn=MILARA PAYA JAVIER - 29191882Y
Fecha: 2022.12.13 08:57:53 +01'00'



Dr. GUSTAVO JUAN SAMPER

Profesor Titular jubilado de Universidad

Universidad de Valencia

Certifica:

Que la Tesis Doctoral presentada por Doña María Angélica Cervera Juan, con el título:

“Análisis de los efectos antiinflamatorios del bromuro de acilidinio sobre los neutrófilos de pacientes con EPOC: una aproximación a los mecanismos de corticorresistencia”

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 Valencia, 14 de diciembre de 2022

Firmado digitalmente por GUSTAVO JUAN SAMPER
Fecha: 2022.12.14 13:02:02 +01'00'



Dr. JULIO CORTIJO GIMENO

Catedrático Numerario de Universidad

Departamento de Farmacología

Universidad de Valencia

Certifica:

Que la Tesis Doctoral presentada por Doña María Angélica Cervera Juan, con el título:

“Análisis de los efectos antiinflamatorios del bromuro de aclidinio sobre los neutrófilos de pacientes con EPOC: una aproximación a los mecanismos de corticorresistencia”

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 Valencia, 13 de diciembre de 2022

**JULIO
FRANCISCO|
CORTIJO|
GIMENO**

Firmado
digitalmente por
JULIO FRANCISCO|
CORTIJO|GIMENO
Fecha: 2022.12.14
08:49:46 +01'00'

La presente Tesis Doctoral, realizada en la Fundación de Investigación del Hospital General Universitario de Valencia, ha sido posible gracias a las siguientes ayudas:

- Ministerio Español de Economía y Competitividad: PID2020-114871RB-I00
- Subvenciones de la acción estratégica en salud (modalidad proyectos de investigación en salud) del Instituto de Salud Carlos III, dentro del subprograma estatal de generación de conocimiento, en el marco del plan estatal de investigación científica y técnica: FIS PI20/01363.
- Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Respiratorias: CIBERES apoyado por el Instituto Nacional de Salud Carlos III y los Ministerios españoles de Economía y Competitividad y Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Código CB06/06/0027.
- Fondos de la Generalitat Valenciana: Prometeo II/2013/014 y Prometeo 2017/023.
- Beca de la Fundación de Neumología de la Comunidad Valenciana. Convocatoria 2014

“Cree a aquellos que buscan la verdad, duda de los que la han encontrado”

André Gide

AGRADECIMIENTOS

A mis directores de tesis Dr. Xavi Milara, Dr. Gustavo Juan y Dr. Julio Cortijo por su apoyo, accesibilidad, tiempo dedicado y motivación constante para llevar a cabo esta tesis, incluso en los momentos más difíciles. Gracias.

A la Dra. Estrella Fernández Fabrellas, amiga, jefa y referente indiscutible en toda mi trayectoria profesional tanto a nivel científico como humano. Gracias por creer en mi desde que aterricé en la neumología, por enseñarme a entender la medicina con una calidad científica excepcional, por demostrarme que para ser un buen médico no solo hay que tener los conocimientos académicos pertinentes, sino que es fundamental ser una buena persona, trabajar en equipo y creer en la "remota posibilidad" para sumar y seguir creciendo profesionalmente. Gracias infinitas.

A mi familia al completo y en especial a mis padres por su cariño, generosidad y por educarme como lo habéis hecho, a mis hermanas M^a José y Teresa y a mis dos luceros, mis sobrinos Borja e Iván, los pilares de mi vida. Gracias por estar siempre ahí.

A mis amigas del alma, los otros pilares de mi vida, sin vosotras hubiera sido imposible finalizar este proyecto. Gracias por vuestro apoyo incondicional en los momentos de desánimo, y en especial, gracias a M^a José por guiarme, aconsejarme y estimularme en el último trayecto de todo este proceso. Gracias a todas por formar parte de mi vida.

ÍNDICE

1 ABREVIATURAS	23
2 INTRODUCCIÓN	27
2.1 DEFINICIÓN DE LA ENFERMEDAD PULMONAR OBSTRUCTIVA CRÓNICA	29
2.2 IMPACTO GLOBAL DE LA EPOC	30
2.2.1 PREVALENCIA DE LA EPOC EN ESPAÑA	30
2.2.2 PREVALENCIA DEL TABAQUISMO EN ESPAÑA	32
2.2.3 MORBILIDAD DE LA EPOC	33
2.2.4 MORTALIDAD GLOBAL DE LA EPOC	35
2.2.5 CONSUMO DE RECURSOS DE LA EPOC	36
2.2.6 APROXIMACIÓN AL TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO DE LA EPOC EN FASE ESTABLE	37
2.3 ETIOPATOGENIA DE LA EPOC	39
2.3.1 INFLAMACIÓN PULMONAR EN LA EPOC	40
2.3.1.1 Papel de los neutrófilos en la EPOC	41
2.3.1.2 Papel de los macrófagos en la EPOC	43
2.3.1.3 Mediadores de inflamación en la EPOC	44
2.3.2 DESEQUILIBRIO PROTEASAS – ANTIPROTEASAS	45
2.3.3 ESTRÉS OXIDATIVO	47
2.4 FISIOPATOLOGÍA DE LA LIMITACIÓN AL FLUJO AÉREO EN LA EPOC	51
2.5 PARTICIPACIÓN DEL SISTEMA COLINÉRGICO EN LA EPOC	53
2.5.1 PAPEL DEL SISTEMA COLINÉRGICO NO NEURONAL EN LA EPOC	58
2.5.1.1 Participación del sistema colinérgico no neuronal en la respuesta inflamatoria en la vía aérea de la EPOC	60
2.6 DIAGNÓSTICO Y CLASIFICACIÓN DE GRAVEDAD DE LA EPOC	62
2.6.1 ESTRATIFICACIÓN DEL RIESGO	64
2.7 EXACERBACIONES EN LA EPOC	66
2.8 TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO DEL EPOC ESTABLE	68
2.8.1 BRONCODILADORES INHALADOS	69
2.8.1.1 Broncodilatadores inhalados de acción corta (BDCD)	70
2.8.1.2 Broncodilatadores inhalados de acción prolongada (BDLD)	71
2.8.2 OTROS BRONCODILADORES: TEOFILINAS	75
2.8.3 FÁRMACOS ANTIINFLAMATORIOS	76
2.8.3.1 Corticoides inhalados (CI)	76
2.8.3.2 Inhibidores de la fosfodiesterasa-4 (PDE4)	78
2.8.4 RECOMENDACIONES DE LAS GUÍAS DE MANEJO DE LA EPOC	78
2.9 EFECTOS ANTI-INFLAMATORIOS DE FÁRMACOS ANTIMUSCARÍNICOS	80
2.10 CORTICORRESISTENCIA EN LA EPOC	82
2.10.1 MECANISMOS ANTIINFLAMATORIOS DE LOS CORTICOESTEROIDES	83
2.10.1.1 Activación de la expresión de genes antiinflamatorios	84
2.10.1.2 Inhibición de la expresión de genes pro-inflamatorios	85
2.10.2 MECANISMOS MOLECULARES DE CORTICORRESISTENCIA EN LA EPOC	87
2.11 IMPLICACIONES TERAPÉUTICAS DE LA CORTICORRESISTENCIA EN LA EPOC	94
2.11.1 ANTIINFLAMATORIOS ALTERNATIVOS DE AMPLIO ESPECTRO	95
2.11.2 RESTAURACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA HDAC2	96

2.11.3	REGULACIÓN DE GENES INDUCIBLES POR LOS GLUCOCORTICOIDES	97
2.11.4	EFFECTO SINÉRGICO DE FÁRMACOS ANTIINFLAMATORIOS	98

3 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS **101**

3.1	HIPÓTESIS	104
3.2	OBJETIVOS	104

4 METODOLOGÍA **107**

4.1	MATERIAL	109
4.1.1	PACIENTES	109
4.1.2	AISLAMIENTO DE NEUTRÓFILOS	110
4.1.3	PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN DEL EXTRACTO DE HUMO DE CIGARRILLO	112
4.2	MÉTODOS	113
4.2.1	ANÁLISIS DE MEDIADORES INFLAMATORIOS SECRETADOS POR LOS NEUTRÓFILOS	113
4.2.2	ANÁLISIS DE LA ACTIVACIÓN DEL SISTEMA COLINÉRGICO NO NEURONAL EN LOS NEUTRÓFILOS	115
4.2.3	ESTUDIO DE LOS MECANISMOS DE CORTICORRESISTENCIA	115
4.2.3.1	Estudio de la expresión génica: Técnicas de Biología molecular	116
4.2.3.2	Estudio de la expresión proteica	123
4.2.3.3	Análisis de la actividad de fosfoinositol 3-quinasa-delta (PI3K δ)	125
4.2.4	ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS	125

5 RESULTADOS **127**

5.1	POBLACIÓN ESTUDIADA	129
5.2	ACTIVACIÓN BASAL DE LOS COMPONENTES DEL SISTEMA COLINÉRGICO NO NEURONAL EN NEUTRÓFILOS DE PACIENTES CON EPOC	129
5.3	EXPRESIÓN BASAL DE OTROS RECEPTORES Y MKP1	131
5.4	ANÁLISIS DE LA ACTIVACIÓN DEL SISTEMA COLINÉRGICO NO NEURONAL EN LOS NEUTRÓFILOS DE PACIENTES EPOC	132
5.5	INHIBICIÓN DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA EN LOS NEUTRÓFILOS POR BROMURO DE ACLIDINIO Y PROPIONATO DE FLUTICASONA POR SEPARADO	133
5.6	EFFECTO DE LA COMBINACIÓN DE BROMURO DE ACLIDINIO Y PROPIONATO DE FLUTICASONA SOBRE LA RESPUESTA DE LOS NEUTRÓFILOS	136
5.7	MECANISMOS IMPLICADOS EN LA MEJORA DEL EFFECTO ANTIINFLAMATORIO (EFFECTO ADITIVO) DE LA COMBINACIÓN DE PROPIONATO DE FLUTICASONA CON BROMURO DE ACLIDINIO EN LOS NEUTRÓFILOS DE PACIENTES EPOC	137

6 DISCUSIÓN **143**

6.1	ACTIVACIÓN DEL SISTEMA COLINÉRGICO NO NEURONAL EN NEUTRÓFILOS DE SANGRE PERIFÉRICA Y DEL ESPUTO DE LOS PACIENTES CON EPOC	147
-----	---	-----

6.2	EFFECTO ANTIINFLAMATORIO DEL BROMURO DE ACLIDINIO Y PROPIONATO DE FLUTICASONA POR SEPARADO EN LOS NEUTRÓFILOS DE PACIENTES EPOC	149
6.3	EFFECTO ADITIVO ANTIINFLAMATORIO DE LA COMBINACIÓN DE BROMURO DE ACLIDINIO Y PROPIONATO DE FLUTICASONA EN LOS NEUTRÓFILOS DE PACIENTES EPOC	151
6.4	MECANISMOS IMPLICADOS EN EL EFFECTO ADITIVO DE LA COMBINACIÓN DE PROPIONATO DE FLUTICASONA Y BROMURO DE ACLIDINIO EN LOS NEUTRÓFILOS DE PACIENTES EPOC	152
6.4.1	ACTIVACIÓN DEL GEN DEL ELEMENTO DE RESPUESTA A GLUCOCORTICOIDES (GRE)	152
6.4.2	INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA VÍA PI3KΔ	153
6.4.3	AUMENTO DE LA EXPRESIÓN DE GENES ANTIINFLAMATORIOS DEPENDIENTES DE CORTICOSTEROIDES COMO MKP1, CRISPLD2 Y GILZ	154

7 CONCLUSIONES **159**

8 BIBLIOGRAFÍA **163**

9 ANEXOS **183**

ANEXO 1. HOJA DE RECOGIDA DE DATOS	185
ANEXO 2. CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA EL PACIENTE	187
ANEXO 3. APROBACIÓN DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN	189
ANEXO 4. PUBLICACIÓN DERIVADA DE ESTA INVESTIGACIÓN	191

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág
Figura 1. Prevalencia de la EPOC en España	31
Figura 2. Prevalencia de EPOC diagnosticada y no diagnosticada (criterio LIN) en el mundo, por edad y sexo	32
Figura 3. Prevalencia del tabaquismo en España por género desde 1993-2017	32
Figura 4. Efectos sistémicos de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC)	34
Figura 5. Tasa de mortalidad global por 100.000 habitantes (en ambos sexos y todas las edades) por EPOC desde 1990 hasta 2016 y su predicción hasta 2040	36
Figura 6. Etiopatogenia de la EPOC	40
Figura 7. Principales células de inflamación y mecanismos implicados en la patogenia de la EPOC	41
Figura 8. Papel de los neutrófilos en la EPOC	42
Figura 9. Papel de los macrófagos en el EPOC	44
Figura 10. Activación de vías de señalización por el estrés oxidativo	48
Figura 11. El papel del estrés oxidativo en la EPOC	49
Figura 12. Efectos del estrés oxidativo	50
Figura 13. Estructura del receptor muscarínico acoplado a proteína G	55
Figura 14. Esquema de la inervación colinérgica en la vía aérea y localización de los receptores muscarínicos (M1, M2, M3)	56
Figura 15. Sistema colinérgico no neuronal en la vía aérea y efectos inflamatorio de la acetilcolina en las células estructurales e inflamatorias	59
Figura 16. Curvas de flujo-volumen (FV) de pacientes con diferentes grados de EPOC	63
Figura 17. Curva de Fletcher & Peto	64
Figura 18. Estratificación del riesgo de los pacientes EPOC según GesEPOC 2021	65
Figura 19. Estratificación del riesgo de los pacientes EPOC según GOLD 2023	56
Figura 20. Estructura química del bromuro de aclidinio	63
Figura 21. Los corticoesteroides regulan la expresión génica por diversas vías	83
Figura 22. Activación de la expresión de genes antiinflamatorios por corticoesteroides	85
Figura 23. Inhibición de la expresión de genes inflamatorios por corticoesteroides	86
Figura 24. Inhibición de la p38-MAPK por los GC	87
Figura 25. Mecanismos moleculares de corticorresistencia	89
Figura 26. Acetilación del receptor de glucocorticoides (GR)	91
Figura 27. Mecanismo de corticorresistencia en EPOC, asma grave y fumadores	92
Figura 28. Mecanismos de disminución de la expresión de HDAC2 en pacientes EPOC	93
Figura 29. El extracto de humo de tabaco (EHT) como estímulo en los experimentos <i>in vitro</i>	112
Figura 30. Retrotranscripción inversa	117
Figura 31. Sistema <i>TaqMan</i> [®] para RT-PCR	118
Figura 32. RT-PCR a tiempo real	118
Figura 33. Silenciamiento génico mediante ARN interferente	120
Figura 34. Constructos del kit Cignal GRE Reporter Assay	121
Figura 35. Esquema de la técnica de Western Blott	124
Figura 36. Expresión de receptores del sistema colinérgico no neuronal en neutrófilos de sangre periférica y esputo de voluntarios sanos, EPOC estable y exacerbada	130

	Pág
Figura 37. Expresión de componentes del sistema colinérgico no neuronal en neutrófilos de sangre periférica y esputo de voluntarios sanos, EPOC estable y exacerbada	131
Figura 38. Expresión basal de β_2 -ADR, GR α y MKP-1 en neutrófilos de sangre periférica y esputo de voluntarios sanos, EPOC estable y exacerbada	132
Figura 39. Activación de neutrófilos de pacientes EPOC por mediadores colinérgicos	133
Figura 40. Efecto antiinflamatorio del bromuro de aclidinio y propionato de fluticasona en neutrófilos de sangre periférica de individuos sanos y pacientes EPOC	134
Figura 41. Efecto antiinflamatorio del bromuro de aclidinio y propionato de fluticasona en neutrófilos de esputo de pacientes EPOC	135
Figura 42. Efectos de la combinación de aclidinio y fluticasona en la liberación de citoquinas sobre los neutrófilos de voluntarios sanos y pacientes EPOC	136
Figura 43. Efectos de la bromuro de aclidinio (Acl) y propionato fluticasona (Flu) en monoterapia y combinados en la expresión de MIF, HDAC2, GR α en los neutrófilos de sangre periférica de EPOC e individuos sanos	137
Figura 44. Efectos del bromuro de aclidinio (Acl) y propionato fluticasona (Flu) en monoterapia y combinados en la expresión de MKP-1 CRISPLD2, GILZ en los neutrófilos de sangre periférica de EPOC e individuos sanos	138
Figura 45. Efectos del bromuro de aclidinio (Acl), propionato de fluticasona, atropina (ATR), LY294002 y sus combinaciones con fluticasona en la señal del GRE	139
Figura 46. Efecto del propionato de fluticasona en la señal del GRE en función del receptor muscarínico silenciado	140
Figura 47. Actividad de PI3K δ en neutrófilos de sangre periférica de pacientes EPOC tras estimularlos con LPS e incubarlos con aclidinio, atropina, LY294002, metoctramina y pFHHSid	141
Figura 48. Efecto aditivo antiinflamatorio de la combinación del bromuro de aclidinio (Acl) y propionato de fluticasona (Flut)	142
Figura 49. Resumen de la patogenia de la inflamación neutrofílica corticorresistente en la EPOC	156
Figura 50. Resumen gráfico de los resultados obtenidos	157

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág
Tabla 1. Tipos de receptores muscarínicos en la vía aérea	57
Tabla 2. Clasificación de la gravedad de la obstrucción de la EPOC	63
Tabla 3. Clasificación de los BD inhalados para la EPOC	70
Tabla 4. Farmacología comparativa de aclidinio y tiotropio	74
Tabla 5. Presentación, dispositivos y dosis recomendada de combinaciones LABA/CI	77
Tabla 6. Mecanismos moleculares de corticorresistencia en el EPOC	88
Tabla 7. Resumen de los estudios <i>in vitro</i>	113
Tabla 8. Fármacos y sus concentraciones para la experimentación	114
Tabla 9. Proteínas expresadas por activación del sistema colinérgico no neuronal	115
Tabla 10. Genes analizados para analizar mecanismos de corticorresistencia	115
Tabla 11. Fármacos y sus concentraciones utilizados para la experimentación	122

Tabla 12. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados para Western Blotting	124
Tabla 13. Características clínicas de la población de estudio	129
Tabla 14. Porcentaje máximo de inhibición de la liberación de IL-8, MMP-9, CCL-5, GM-CSF e IL-1 β de neutrófilos de sujetos sanos y pacientes con EPOC	135

1 ABREVIATURAS

ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterasa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
AMPc	Monofosfato de adenosina cíclico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
AP-1	Activador de la proteína-1
BD	Broncodilatadores
BDCD	Broncodilatadores de acción corta
BDLD	Broncodilatadores de acción prolongada o larga duración
BEAS2B	Línea inmortalizada de células epiteliales bronquiales humanas
β_2 -ADR	Adrenorreceptor beta 2
CBP	Proteína de unión del CREB
CCL-5	Quimiocina ligando 5
ChAT	Acetilcolintransferasa
CHT1	Transportador de colina de alta afinidad
CI	Corticoides inhalados
CO ₂	Dióxido de carbono
CREB	Proteína de unión del AMPc al elemento de respuesta
CRISPLD2	Gen de la Proteína secretora rica en cisteína que contiene el dominio LCCL 2
Ct	Ciclo umbral
DAG	Diacilglicerol
DE	Desviación estándar
DMEM	Medio de Cultivo Eagle Modificado de Dulbecco
DTT	Ditiotreitol
EHT	Extracto de humo de tabaco
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
EPOC	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
ERK1/2	Quinasa regulada por señal extracelular
FEV ₁	Volumen Espiratorio forzado en el primer segundo
FVC	Capacidad vital forzada
FRC	Capacidad Residual Funcional
GAPDH	Gliceraldehído fosfato deshidrogenasa
GBD	Global Burden of Disease Study
GDP	Guanosín difosfato
GTP	Guanosín trifosfato
GILZ	Cremallera de leucina inducida por glucocorticoides
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos
GR α	Receptor de glucocorticoides α
GR β	Receptor de glucocorticoides β
GRE	Elemento de Respuesta a Glucocorticoides
GRO- α	Oncogene- α relacionado con el crecimiento
GR-Ser226	Receptor de glucocorticoides fosforilado en el residuo Serina 226
HAT	Histona acetiltransferasa
HDAC	Histona desacetilasa
IL-1 β	Interleuquina-1 β
IL-8	Interleuquina-8
IHME	Institute for Health Metrics and Evaluation
I κ B- α	Inhibidor NF- κ B
IP-10	Proteína inducible por interferón- γ

I-TAC	Quimiotáctico- α de las células T inducible por interferón
JNK	Quinasa c-Jun N-terminal
LABA	Agonistas beta2 de acción prolongada
LAMA	Antagonistas muscarínicos de acción prolongada
LIN	Límite inferior de la normalidad
LPS	Lipopolisacárido
LTB ₄	Leucotrieno B ₄
MAPK	Protein-quinasas activadas por mitógenos
MCP-1	Quimiocina selectiva de monocitos 1
MIF	Factor Inhibidor de la Migración de Macrófagos
Mig	Monocina inducida por el interferón- γ
MKP-1	Protein-quinasa activada por mitógenos fosfatasa 1
MMPs	Metaloproteasas de matriz
MMP-9	Metaloproteinasa de matriz 9
mMRC	Escala modificada <i>Medical Research Council</i>
NE	Elastasa neutrofílica
NF- κ B	Factor de transcripción nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
NO	Óxido nítrico
Nrf2	Factor nuclear derivado del eritroide 2
OCT	Proteína catiónica orgánica transmembrana que transporta Ach
ONOO ⁻	Peroxinitrito
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBS	Tampón salino fosfato
PDE4	Fosfodiesterasa 4
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PIs	Fosfoinositoles
PIP ₂	Fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato
PI3K δ	Fosfatidilinositol 3 quinasa delta
p-ERK	Proteína ERK fosforilada
PLC	Fosfolipasa C
PMN	Células polimorfonucleares
p-p38	Proteína P38 fosforilada
RGS2	Gen que codifica a la proteína reguladora de la proteína G2
ROS	Especies de oxígeno reactivo
RPMI	Medio para cultivo celular <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real
SABA	Agonistas beta2 de acción corta
SAMA	Antagonistas muscarínicos de acción corta
SILP	Inhibidor de la leucoproteasa secretora
siRNA	Ácido ribonucleico interferente
TLR	Receptor tipo Toll
TLC	Capacidad pulmonar total
TGF- β	Factor de crecimiento transformante β
TIMP	Inhibidor tisular de MMP
TNF- α	Factor de necrosis tumoral α
VAcHT	Transportador vesicular de acetilcolina
YLD	Years lived with disease (años de vida con enfermedad)

2 INTRODUCCIÓN

2.1 Definición de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica

La enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) es una enfermedad respiratoria frecuente, prevenible y tratable caracterizada por una limitación persistente al flujo aéreo que es habitualmente progresiva y no completamente reversible, y está asociada a una respuesta inflamatoria de las vías aéreas y del pulmón a partículas nocivas y gases (1) (GOLD 2021).

El humo del tabaco es el principal factor de riesgo para desarrollar EPOC y contribuye a la inflamación neutrofílica y a los cambios estructurales en la vía aérea que suceden durante la progresión de la misma (2) (Sutherland E. 2004) entre los que destaca el atrapamiento aéreo, la limitación progresiva al flujo aéreo, la destrucción del parénquima pulmonar (enfisema) y la alteración en los mecanismos de reparación y defensa habituales que dará lugar a fibrosis de la vía aérea pequeña (1) (GOLD 2021).

En la práctica clínica el diagnóstico de la EPOC se basa en el antecedente de una exposición crónica a humo de tabaco (más de 10 paquetes-año) u otros tóxicos inhalados, en la presencia de síntomas respiratorios compatibles (disnea y tos crónica con o sin expectoración asociada) y la demostración, en situación clínica estable, de una obstrucción crónica al flujo aéreo mediante una espirometría tras la prueba broncodilatadora (obstrucción definida como el cociente entre el volumen espiratorio máximo en el primer segundo (FEV_1) y la capacidad vital forzada (FVC) inferior a 0,7; $FEV_1/FVC < 0.7$) (1,3) (GOLD 2021, Miravittles M 2021). Debemos tener en cuenta que este valor puede infraestimar la obstrucción en sujetos jóvenes o sobre diagnosticar a los de edad avanzada, ya que este cociente desciende fisiológicamente con el envejecimiento. Para evitar este problema se han propuesto varias soluciones, entre ellas emplear el límite inferior de la normalidad (LIN) para el cociente FEV_1/FVC para establecer el diagnóstico de EPOC en edades extremas, ya que el LIN incorpora una corrección en función de la edad.

Por tanto, para establecer un diagnóstico de EPOC es necesario cumplir estos tres criterios:

- exposición previa a factores de riesgo,
- síntomas respiratorios compatibles (disnea, tos +/- expectoración)

- y demostración de una obstrucción crónica al flujo aéreo en la espirometría post-broncodilatación (3,4) (Miravittles 2021, Miravittles 2017).

La EPOC se caracteriza también por la presencia de agudizaciones durante el curso de la enfermedad y por la frecuente asociación de comorbilidades que contribuyen al deterioro funcional, a la gravedad y al pronóstico de estos pacientes.

En la actualidad, la EPOC no puede curarse, pero sí prevenirse con la deshabituación tabáquica y tratarse eficazmente controlando sus síntomas, disminuyendo su velocidad de progresión y disminuyendo el número de exacerbaciones con la intención de mejorar el pronóstico y la calidad de vida de los pacientes que la padecen.

2.2 Impacto global de la EPOC

2.2.1 Prevalencia de la EPOC en España

Como ya se ha comentado, la EPOC es una enfermedad prevenible y tratable (1) (GOLD. 2021) y el tabaquismo es su principal causante en España.

En la última actualización del estudio epidemiológico nacional EPI-SCAN II (5) (Soriano JB, 2021) (realizado entre abril 2017 y febrero 2019) que determina la prevalencia de la EPOC en España, se concluye que la EPOC sigue siendo muy prevalente en nuestro país: estiman que tienen EPOC el 11,8% de españoles de 40 años o más (14,6% hombres y 9,4% mujeres) y esta prevalencia se incrementa con la edad en ambos sexos, hasta un máximo de 33,6% en hombres y del 23,3% en mujeres una vez alcanzados los 80 años (Figura 1).

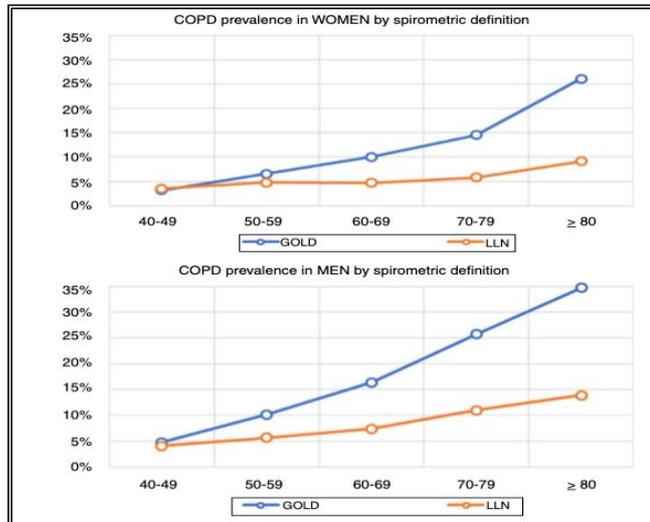


Figura 1. Prevalencia de la EPOC en España. Distribuida por edad y género según el cociente $FEV_1/FVC < 0.7$ o < al límite inferior de la normalidad (LIN, en inglés LLN: lower limit of normal) en mujeres y hombres. Figura tomada de la referencia 5

Cabe señalar también, de los resultados obtenidos en este estudio, que el diagnóstico en mujeres ha aumentado en los últimos 10 años. Comparando con los datos publicados en el primer EPI-SCAN en 2009 (6) (Miravitlles M. 2009) la prevalencia de la EPOC en mujeres, según grupos de edad, ha seguido una evolución creciente sobre todo en aquellas mayores de 50 años (4.5% vs 6.6% en las mujeres de 50-59 años, 7.6% vs 10% en las de 60-69 años y 10.8% vs 14.5% en las comprendidas entre 70-79 años) (5) (Soriano JB, 2021). Debido a las tendencias recientes de tabaquismo en mujeres y niños, además de los nuevos vapeadores y dispositivos de calentar el tabaco, es muy probable que se generen nuevos datos epidemiológicos en los próximos años que habrá que analizar de nuevo.

Otro dato alarmante obtenido en este reciente estudio epidemiológico en España (5) (Soriano JB, 2021) es la elevada tasa de infradiagnóstico de esta enfermedad, que asciende al 74.7%, siendo mayor en mujeres que en hombres (80.6% vs 70.4%, $p < 0.001$). Por tanto la EPOC es, debido al infradiagnóstico, un claro ejemplo de que el problema podría ser mayor del objetivado debido a un efecto "iceberg" como se muestra en la figura 2 (7) (Lamprecht B. 2015).

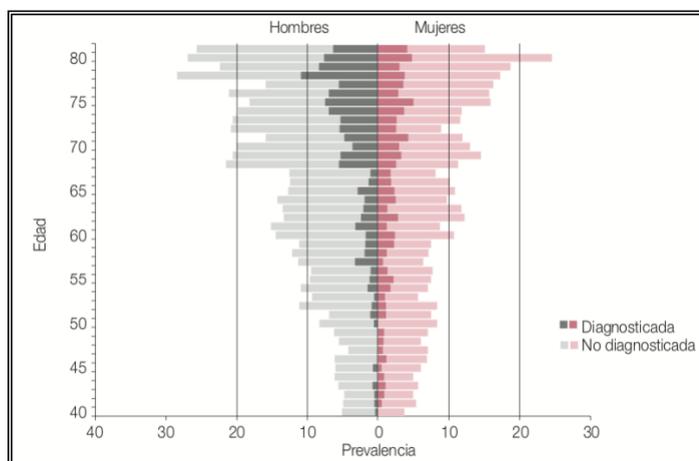


Figura 2. Prevalencia de EPOC diagnosticada y no diagnosticada (criterio LIN) en el mundo, por edad y sexo. Figura tomada de referencia 7

2.2.2 Prevalencia del tabaquismo en España

El tabaquismo es el principal factor de riesgo de la EPOC, por tanto su prevalencia repercute de manera directa en los datos epidemiológicos de la enfermedad. La Encuesta Nacional de Salud de 2018 cifra la prevalencia de tabaquismo en nuestro país en el 22.1% de la población de 15 años o mayor. Con respecto a años previos siguen fumando más los hombres que las mujeres, aunque las diferencias son menores entre los jóvenes. El porcentaje de fumadores en hombres es de 25.6% y del 18.8% en mujeres. Como se muestra en la figura 3, el consumo de tabaco en los hombres sí que muestra una tendencia a la baja en los últimos 10 años, sin embargo en las mujeres el consumo no mejora y es la primera vez que este indicador no desciende desde 2014 (8) (Encuesta Nacional de Salud. España 2017).

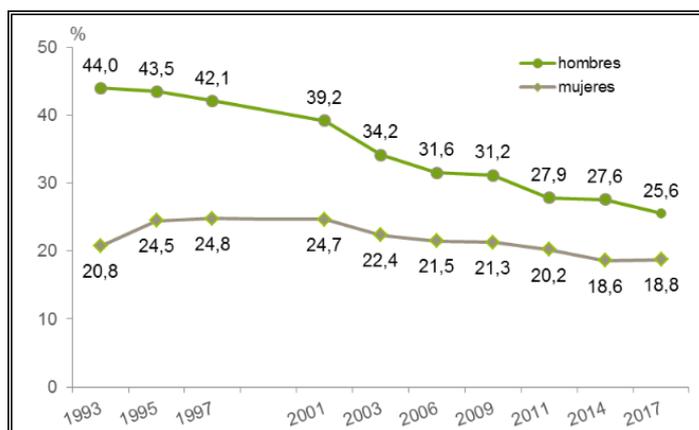


Figura 3. Prevalencia del tabaquismo en España por género desde 1993-2017. Encuesta Nacional de Salud. España 2017. Figura tomada de la referencia (8)

En España el tabaco causa la pérdida de un millón de años de vida cada año, y hay 28.766 muertes anuales por EPOC (9) (Soriano JB. 2016).

Estos datos nos deben hacer reflexionar sobre la importancia de intervenir sobre el tabaquismo cuanto antes para prevenir el desarrollo de enfermedad, hacer un diagnóstico precoz y mejorar el infradiagnóstico de la misma, contribuyendo a iniciar un tratamiento precoz en el que, sin duda, el abandono de tabaco debe ser un pilar fundamental.

2.2.3 Morbilidad de la EPOC

Las graves consecuencias de la EPOC en la salud del paciente afectan negativamente a su calidad de vida, ya que conlleva una importante morbilidad asociada de la que se derivan un aumento de visitas médicas en atención primaria, a urgencias y hospitalizaciones (1) (GOLD. 2021).

Los datos de morbilidad actuales apuntan a que la EPOC ocupará el séptimo lugar en el año 2030 en cuanto a enfermedades con una mayor morbilidad y carga asistencial asociada (10) (Mathers CD. 2006). Esta morbilidad asociada a la EPOC aumenta con la edad, siendo considerada la enfermedad más cara de las enfermedades crónicas que afectan a pacientes de edad avanzada (11) (Global Burden of Disease Study (GBD) 2015).

El carácter crónico y progresivo de la EPOC se ve alterado por episodios de empeoramiento clínico, que afectan negativamente a la progresión de la enfermedad, conocidos como exacerbaciones. Las exacerbaciones, frecuentemente desencadenadas por infecciones víricas o bacterianas, representan una amplificación de la respuesta inflamatoria. Durante estos episodios de agudización se produce una mayor hiperinsuflación y una reducción del flujo aéreo que contribuyen a una mayor disnea (12) (Parker CM. 2005). Además de esta variación en la disnea basal, también hay un aumento de tos y/o producción de esputo, suficientes para requerir un cambio en el tratamiento e incluso la hospitalización. Las exacerbaciones constituyen una de las principales causas de morbilidad relacionadas con la EPOC ya que aceleran la progresión de la enfermedad, empeoran el pronóstico y conllevan un gran coste económico (13) (Decramer M. 2012). De hecho, las hospitalizaciones debidas a episodios

agudos de exacerbación son responsables de la mayor parte del gasto relacionado con la EPOC (11) (Global Burden of Disease Study (GBD) 2015).

La afectación de la EPOC no es solo pulmonar, ya que se ha observado un estado proinflamatorio-inflamatorio sistémico característico que desencadena la aparición de diversas comorbilidades: enfermedad cardiovascular, disfunción y pérdida muscular, anemia, osteoporosis, problemas gastrointestinales y depresión o ansiedad (14) (Barnes PJ. 2009) (Figura 4). Actualmente se considera que el tabaco puede contribuir a la aparición y al empeoramiento pronóstico de estas comorbilidades asociadas. Estas comorbilidades, como ya se ha comentado, alteran el pronóstico de la enfermedad, aumentan el riesgo de ingreso hospitalario y de muerte y suponen más del 50% de los recursos consumidos por esta enfermedad (15) (Sinn D. 2006).

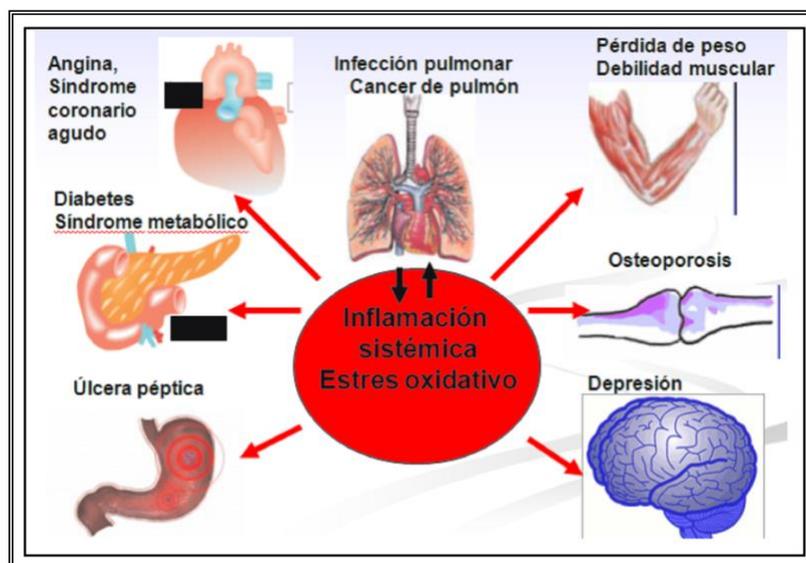


Figura 4. Efectos sistémicos de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC).

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

La enfermedad cardiovascular y el cáncer de pulmón son las principales comorbilidades de la EPOC (15) (Sinn D. 2006). De hecho, aunque la principal causa de mortalidad de pacientes con EPOC grave suele ser el fallo respiratorio (15) (Sinn D. 2006), las causas más comunes de mortalidad en los pacientes con EPOC leve y moderada son: enfermedad cardiovascular (25%),

cáncer de pulmón (20-33%) y otras causas (30%) (16) (Fabbri LM. 2008). Por tanto, la EPOC está muy asociada a la enfermedad cardiovascular, en concreto a la insuficiencia cardíaca crónica y existen evidencias que apuntan al valor del FEV₁ como un marcador importante de morbi-mortalidad, particularmente cardiovascular (16) (Fabbri LM. 2008).

2.2.4 Mortalidad global de la EPOC

Esta enfermedad es una de las más prevalentes a nivel mundial y ocupa el cuarto lugar entre las causas de muerte en los países desarrollados, sin embargo, en la actualidad, todavía no existe ningún tratamiento disponible que consiga su curación o detener su progresión.

Por ello, la EPOC es la única de las enfermedades crónicas frecuentes cuya mortalidad no ha disminuido en los últimos 30 años, como ha hecho, por ejemplo, la de las enfermedades cardiovasculares. Se prevé que las muertes totales a nivel mundial por EPOC aumenten más del 30 % en los próximos 10 años, a menos que se tomen medidas urgentes para reducir los factores de riesgo subyacentes, especialmente el consumo de tabaco (11) (Global Burden of Disease Study (GBD) 2015).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) pronostica que en el 2030 la EPOC será la tercera causa de muerte en todo el mundo, supondrá un 7,8 % de todas las muertes y el 27 % de las muertes relacionadas con el tabaco, solo superada por el cáncer (33 %) y por las enfermedades cardiovasculares (29 %).

Además de estas cifras de mortalidad tan desalentadoras, se prevé que la prevalencia de la EPOC siga aumentando hasta bien entrado el siglo XXI debido a que hoy en día hay más personas fumadoras que en cualquier otro momento de la historia y a que los cambios demográficos actuales asociados al envejecimiento de la población favorecen el incremento de la prevalencia de la EPOC. En el momento actual más de 3 millones de personas mueren por EPOC al año, lo que supone el 6% de la mortalidad global por todas las causas y más del 90% de estas muertes por EPOC se producen en países de nivel socioeconómico medio-bajo (17,18) (Institute for Health Metrics and Evaluation (IHME) 2019, World Health Organization (WHO) 2020) (Figura 5).

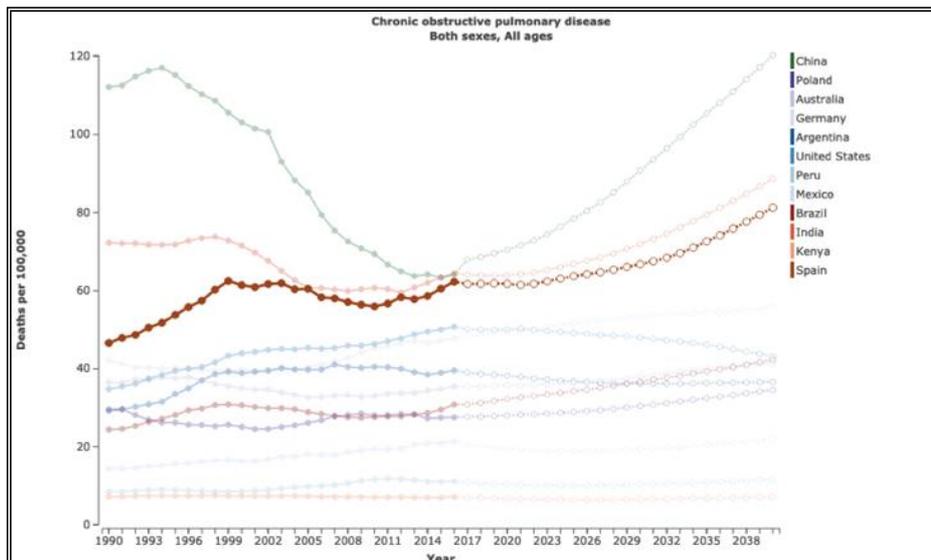


Figura 5. Tasa de mortalidad global por 100.000 habitantes (en ambos sexos y todas las edades) por EPOC desde 1990 hasta 2016 y su predicción hasta 2040. Figura tomada de la referencia 17

2.2.5 Consumo de recursos de la EPOC

La EPOC constituye un problema de salud pública de enorme y creciente importancia por ser una enfermedad tan prevalente y de carácter crónico, con elevada morbimortalidad de la que se deriva un elevado coste sanitario y social.

En general, las enfermedades respiratorias crónicas representan el 6.3% de los YLD (*years lived with disease*, o años de vida con enfermedad) mundiales, y su mayor contribuyente es la EPOC (29.4% millones de YLD), seguida por el asma con 13.8 millones de YLD (11) (Global Burden of Disease Study (GBD) 2015).

En la Unión Europea se estima que los costes directos de las enfermedades respiratorias suponen el 6% total de los costes sanitarios, de los que la EPOC supone más del 50% (19) (Carvounis CP. 2012).

Para el análisis del gasto derivado de la EPOC, los costes se desglosan en tres apartados:

- En primer lugar los costes directos (recursos consumidos), asociados al uso de recursos sanitarios, siendo el capítulo más importante los costes derivados de la exacerbaciones

graves que requieren hospitalización (84% del total de costes directos) (20) (Izquierdo JL. 2003).

- En segundo lugar, los costes indirectos (recursos perdidos) relacionados con la pérdida de productividad, bajas e incapacidades laborales, etc.
- Y por último los costes intangibles debidos a la pérdida de calidad de vida de los pacientes.

A pesar de los avances médicos en su diagnóstico y tratamiento alcanzados durante la última década, la investigación sobre la carga global de esta enfermedad y sus costes asociados es deficitaria y se circunscribe mayoritariamente a estudios puntuales o locales y muchos de ellos desfasados. En particular en nuestro país, este ámbito ha estado poco desarrollado en comparación con otras enfermedades crónicas también asociadas al envejecimiento y el consumo de tabaco (20,21) (Izquierdo JL. 2003, Estrategia en EPOC del Sistema Nacional de Salud. 2009).

Aún a pesar de ello, sabemos que el impacto que la EPOC genera sobre el Sistema Nacional de Salud en España es considerable. Según datos obtenidos para la elaboración de la Estrategia en EPOC del Sistema Nacional de Salud (2009) (21), globalmente la EPOC consume el 2% del presupuesto de la sanidad pública española y supone un gasto que alcanza los 3000 millones de euros al año (0.2% del Producto Interior Bruto), incluyendo los costes directos, indirectos e intangibles que se distribuyen en gastos hospitalarios (40-45%), fármacos (35-40%), visitas médicas y pruebas diagnósticas (15-25%) (21) (Estrategia en EPOC del Sistema Nacional de Salud. 2009).

2.2.6 Aproximación al tratamiento farmacológico de la EPOC en fase estable

Sin profundizar en el tratamiento que más adelante se abordará en el apartado correspondiente, sí que parece oportuno recordar brevemente en este apartado introductorio, que pretende contextualizar la importancia de seguir investigando en esta enfermedad, cuáles son sus objetivos, los fármacos utilizados y sus indicaciones, para poner en relieve sus principales carencias.

Los objetivos generales del tratamiento de la EPOC se resumen en:

- Reducir los síntomas de la enfermedad,
- Disminuir la frecuencia y gravedad de la exacerbaciones,
- Mejorar la calidad de vida y
- Mejorar la supervivencia (3) (Miravittles M. 2021).

Recordando la definición de EPOC: se trata de una enfermedad caracterizada por una limitación del flujo aéreo persistente, que suele ser progresiva, y que se asocia con una respuesta inflamatoria crónica de las vías aéreas y del pulmón a partículas nocivas y gases (1) (GOLD. 2021).

Los broncodilatadores de acción prologada (BDLD) son el pilar del tratamiento de la EPOC, pero no modifican significativamente el proceso patológico subyacente. Lo que sí consiguen es aliviar los síntomas y prevenir las exacerbaciones, pero pocos avances se han logrado para prevenir el deterioro funcional progresivo de esta enfermedad o disminuir la mortalidad.

La guía española de manejo de la EPOC en su última actualización (3) (Miravittles M. 2021) recomienda el empleo de BDLD como primera línea de tratamiento, solos o en combinación de familias farmacológicas (LABA, *beta agonistas de acción prolongada*, y LAMA, antagonistas muscarínicos de acción prolongada), y reserva el empleo de combinaciones de LABA con corticoides inhalados (CI) para aquellos pacientes de alto riesgo con fenotipo exacerbador (dos o más exacerbaciones al año tratadas de forma ambulatoria o al menos una exacerbación al año que haya precisado ingreso hospitalario) que asocien eosinofilia periférica (> 300 eosinófilos/mm³) en fase clínica estable, o bien cuando coexistan datos de fenotipo mixto EPOC - asma, independientemente del nivel de gravedad.

La estrategia global para el manejo de la EPOC (1) (GOLD. 2021) coincide en posicionar a los CI asociados a BDLD como tratamiento de pacientes con EPOC moderado-grave que sufren agudizaciones frecuentes.

Esta limitación en el uso de esteroides en la EPOC viene motivada por numerosos estudios que han demostrado que la inflamación neutrofílica característica de esta enfermedad es

corticorresistente (22–24) (Barnes PJ. 2004, 23; Roche N. 2011; Boardman C. 2014) como más adelante se desarrollará.

En la actualidad, como ya se ha comentado, la EPOC no tiene un tratamiento eficaz en términos de curación, pero sí puede prevenirse evitando la exposición al humo de tabaco fundamentalmente y tratarse eficazmente con los fármacos referidos para controlar sus síntomas, disminuir su velocidad de progresión y el número de exacerbaciones con la intención de mejorar el pronóstico, la calidad de vida y disminuir la mortalidad de las personas que la sufren. En los últimos años este abordaje multidimensional empieza a dar beneficios en términos de supervivencia pero todavía nos queda mucho camino por recorrer.

Esta preocupante situación obliga a profundizar en el conocimiento de la patogenia de esta enfermedad para el desarrollo de nuevas líneas de investigación que permitan mejorar el tratamiento y el pronóstico de esta enfermedad.

2.3 Etiopatogenia de la EPOC

Los pulmones humanos contienen una rica red de fibras constituidas por elastina y otras proteínas de la matriz que confieren integridad estructural y elasticidad a las paredes alveolares. La respuesta inflamatoria frente a la inhalación de partículas o gases y principalmente a los componentes del humo del tabaco pueden provocar un aumento de la actividad de proteasas o disminución de la actividad antiproteasa, así como un desequilibrio oxidante/antioxidante en los mecanismos del estrés oxidativo y finalmente una reparación pulmonar defectuosa. El final de todo este proceso es un remodelado que provoca alteraciones estructurales de la vía aérea y alteraciones destructivas del parénquima pulmonar, que originarán la obstrucción crónica al flujo aéreo y el enfisema pulmonar que caracterizan a la EPOC (25–27) (Hogg JC. 1968; Blundell R. 2004; Cosío BG. 2007) (Figura 6).

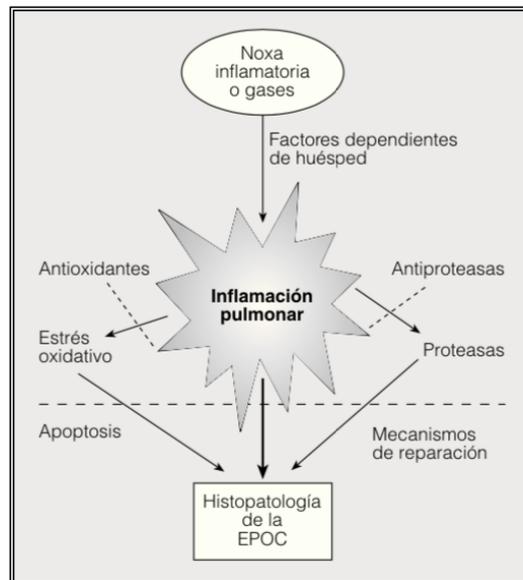


Figura 6. Etiopatogenia de la EPOC. Figura tomada de referencia 27.

2.3.1 Inflamación pulmonar en la EPOC

Es conocida la reacción inflamatoria que acontece en la vía aérea como consecuencia de la inhalación de tóxicos contenidos en el humo de tabaco y otros gases nocivos. Las vías aéreas y el tejido pulmonar del paciente con EPOC muestran un patrón de inflamación bastante típico con aumento de neutrófilos, macrófagos, linfocitos T y linfocitos B.

El patrón celular no es muy diferente en los fumadores sin EPOC, pero cuando aparece la obstrucción bronquial la concentración celular es significativamente más elevada. Existe, además, una diferencia en los tipos celulares en relación con el nivel de gravedad de la enfermedad, predominando los neutrófilos y células B en las formas más graves (28,29) (Barnes PJ. 2003, Hogg JC. 2004).

Las primeras células que responden a la agresión del tabaco son los macrófagos alveolares y posteriormente los neutrófilos, reclutados por componentes del tabaco como la nicotina, que tiene una importante capacidad quimiotáctica de ambas células. Se ha descrito una clara correlación entre el grado de obstrucción de la EPOC y el aumento en el contenido celular de neutrófilos, macrófagos, linfocitos T y B (29) (Hogg JC. 2004).

Estas células inflamatorias desarrollan su capacidad de liberar proteasas, oxidantes y diversos mediadores de inflamación o citoquinas responsables de perpetuar la cascada inflamatoria e inducir la lesión tisular (Figuras 7, 8 y 9) (28) (Barnes PJ. 2003).

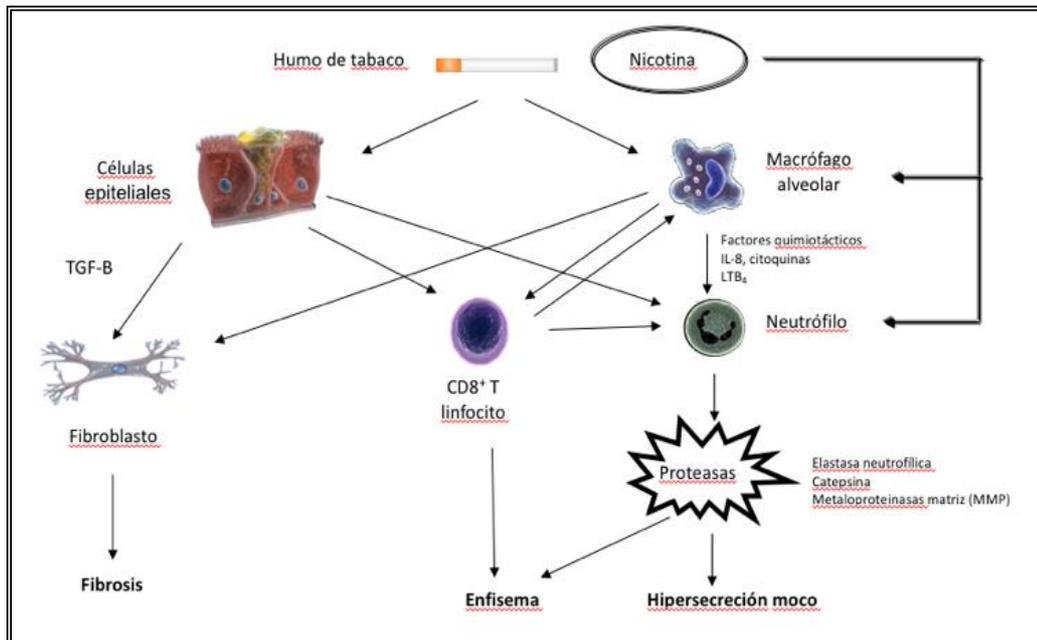


Figura 7. Principales células de inflamación y mecanismos implicados en la patogenia de la EPOC. Esta figura ilustra que la EPOC es una compleja enfermedad en cuya patogenia están implicadas múltiples vías inflamatorias que inician y potencian la progresión de la enfermedad.

2.3.1.1 Papel de los neutrófilos en la EPOC

Los neutrófilos son células de la primera línea defensiva del sistema inmunitario y sus funciones más importantes incluyen la fagocitosis de microorganismos patógenos y la regulación del proceso inflamatorio agudo. También constituyen una fuente de especies reactivas de oxígeno, de citoquinas pro-inflamatorias (como la IL-8), de mediadores lipídicos (como el leucotrieno B₄ (LTB₄)), de péptidos antibacterianos (como las defensinas) y de enzimas proteasas (como la elastasa del neutrófilo y la catepsina-G).

Los neutrófilos son células efectoras clave en el desarrollo de la EPOC y juegan un papel esencial en la patogenia de la enfermedad.

Son reclutados hacia los pulmones por factores quimiotácticos como la nicotina y por factores secretados por los macrófagos alveolares como el LTB₄, IL-8 y el oncogene-α relacionado con el crecimiento (GRO-α), y al ser activados liberan a su vez (Figura 8):

- aniones supeóxido (O₂⁻) y mieloperoxidasa (MPO) que potencian la respuesta inflamatoria y el estrés oxidativo,

- leucotrieno B₄ (LTB₄) e IL-8 que atraerán a más neutrófilos y amplificarán la respuesta inflamatoria, y
- serinproteasas como la elastasa del neutrófilo, catepsina G y proteinasa-3, así como metaloproteinasas de la matriz (MMP-8 y MMP-9) que contribuyen a la destrucción alveolar y a la hipersecreción mucosa (28) (Barnes PJ. 2003).

Citoquinas como el factor estimulante de las colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) y el factor estimulantes de las colonias de granulocitos pueden aumentar la supervivencia del neutrófilo en el tracto respiratorio.

El número de neutrófilos encontrados en biopsias bronquiales, lavado broncoalveolar y esputo inducido de pacientes con EPOC se ha relacionado con la gravedad de la enfermedad (30) (Di Stefano. 1998), así como con la rapidez de la pérdida de función pulmonar.

El humo del tabaco puede ser responsable del aumento de la cantidad de neutrófilos circulantes y de la modificación de su capacidad de deformación para secuestrarlos en los capilares del pulmón (31) (MacNee W. 1989). Una vez secuestrados, los neutrófilos se adhieren a las células endoteliales y migran al tracto respiratorio bajo el control de factores quimiotácticos como el leucotrieno B₄ o la interleuquina 8 (IL-8).

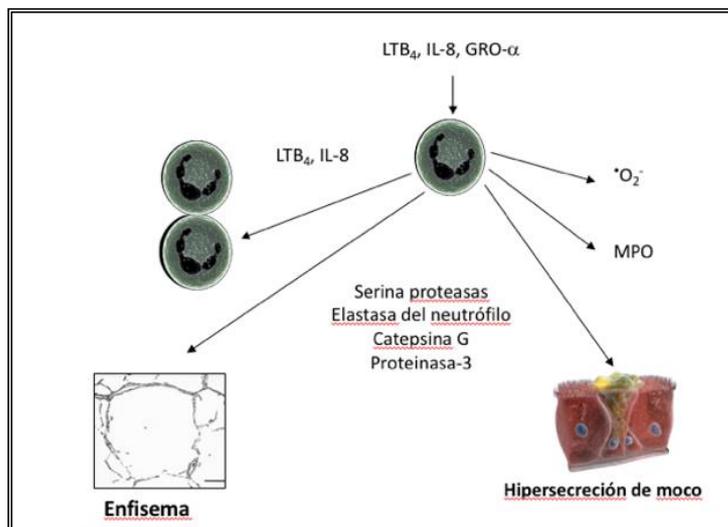


Figura 8. Papel de los neutrófilos en la EPOC. Figura adaptada de la referencia 28

2.3.1.2 Papel de los macrófagos en la EPOC

Los macrófagos alveolares orquestan el proceso inflamatorio, tras ser activados por el humo de tabaco, atrayendo otras células inflamatorias (neutrófilos, monocitos y linfocitos CD8) a través de diversos mediadores:

- A los neutrófilos a través de IL-8, GRO- α , LTB₄
- A los monocitos por la quimiocina selectiva de monocitos 1 (MCP-1), GRO- α , y
- A los linfocitos CD8⁺ a través de la proteína inducible por interferón- γ (IP-10), la monocina inducida por el interferón- γ (Mig) y el quimiotáctico- α de las células T inducible por interferón (I-TAC).

A su vez, los macrófagos también participan en el desarrollo de enfisema mediante la liberación de enzimas elastolíticas (MMP-9 y 12, catepsinas K, L y S) y en el proceso de fibrosis a través de la liberación del factor de crecimiento transformante β (TGF- β).

Los macrófagos también generan especies de oxígeno reactivo (ROS) y óxido nítrico (NO) que en conjunto forman peroxinitrito y pueden contribuir a la corticorresistencia de estos pacientes (Figura 9) como más tarde se abordará.

El número de macrófagos es hasta 10 veces mayor en las vías aéreas, en el parénquima y en el lavado broncoalveolar de pacientes con EPOC, además también se relaciona con la gravedad de la enfermedad (30) (Di Stefano. 1998). Este aumento del número de macrófagos en fumadores y pacientes con EPOC parece ser debido al mayor reclutamiento de monocitos desde la circulación sistémica gracias al aumento de la quimiocina selectiva de monocitos 1 (MCP-1).

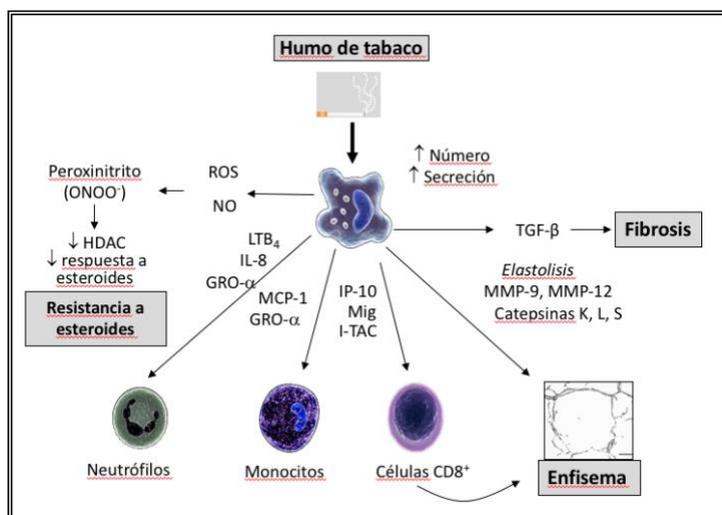


Figura 9. Papel de los macrófagos en el EPOC. Figura adaptada de la referencia 28

2.3.1.3 Mediadores de inflamación en la EPOC

Como respuesta progresiva al humo del cigarrillo las células inflamatorias liberan proteasas, oxidantes y mediadores inflamatorios que desencadenan una reacción de estrés oxidativo que modifica la matriz extracelular haciéndose más sensible a las proteasas, generando infiltración neutrofílica e inactivando y disminuyendo los inhibidores de proteasas, como la $\alpha 1$ antitripsina, y alterando así la reparación alveolar (Figuras 7, 8 y 9).

Estas respuestas inflamatoria e inmunitaria se expresan a través de dos factores de transcripción clave que son el factor de transcripción $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$) y la proteína activadora 1 (AP-1) y a través de la liberación de citoquinas entre las que destacan la interleuquina 8 (IL-8), el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), la interleuquina 1 β (IL-1 β) y el factor de crecimiento transformante β (TGF- β).

Estos mediadores explican, entre otros, la proliferación de fibroblastos, la liberación de neutrófilos o la remodelación que se produce en esta enfermedad (32) (Wright JG. 2003).

En la EPOC se ha demostrado que los mediadores de inflamación de especial importancia son TNF- α , IL-1 β y TGF- β :

- TNF- α o factor de necrosis tumoral α : es una citoquina proinflamatoria producida por muchos tipos celulares (macrófagos, células T y células epiteliales) que contribuye a la leucocitosis mediante la liberación de neutrófilos de la médula ósea e induce la producción de otras citoquinas como la IL-8 desde las células epiteliales respiratorias. Este factor

también induce la proliferación de fibroblastos, que provocan la transcripción de IL-8 a través del NF- κ B y aumenta la liberación de IL-8 del epitelio de las vías aéreas y de neutrófilos, además de activar a los macrófagos para producir metaloproteasas (MMPs).

- IL-1 β : la interleuquina 1 β sintetizada por las células epiteliales y los macrófagos, junto con el TNF- α , participa en la respuesta inflamatoria reclutando más neutrófilos y estimulando la liberación de metaloproteasas y la respuesta de los linfocitos T.
- TGF- β : es el factor de crecimiento más importante y tiene un papel multifuncional: participa en la proliferación de fibroblastos y de las proteínas de matriz a la vez que bloquea la degradación de la matriz reduciendo la síntesis de proteasas e incrementando la síntesis de inhibidores de las proteasas y favorece la reparación epitelial. Está presente en todos los procesos que conducen a la fibrosis. El TGF- β es fundamental en el proceso de transición que se desarrolla desde la respuesta inflamatoria inmune hasta la remodelación tisular (33) (Blobe GC. 2000).

2.3.2 Desequilibrio proteasas – antiproteasas

Desde hace tiempo se ha propuesto en la patogenia de la EPOC un desequilibrio entre proteasas y antiproteasas endógenas que conlleva una destrucción del tejido conectivo pulmonar, en particular de la elastina del parénquima pulmonar, favoreciendo el desarrollo de enfisema.

Las proteasas son proteínas elastolíticas generadas por varios tipos celulares (neutrófilos y macrófagos alveolares) activados por el humo del tabaco (34) (Suki B. 2003) y que además de degradar proteínas estructurales del pulmón, juegan un importante papel regulador en el proceso inflamatorio de la EPOC como ya hemos visto. (Figuras 7, 8, 9)

Existen varios tipos de proteasas que se clasifican en función de su estructura bioquímica:

- serinproteasas: elastasa neutrofilica, proteinasa 3, catepsina G,
- cisteinaproteasas: catepsina-B, -H, -K, -L y -S, y
- metaloproteasas de matriz (MMPs): MMP-1, -2, -3, -7, -8, -9, -12, -13, -14.

La elastasa neutrofílica (NE) es una serinproteasa secretada por los neutrófilos e inhibida por la α_1 -antitripsina en el parénquima pulmonar y es la principal responsable en el proceso que lleva a generar enfisema. Además de su papel como proteasa, la NE está también implicada en la hipersecreción mucosa y en la inducción de otras citoquinas pro-inflamatorias como la IL-8. La demostración de que la α_1 -antitripsina, principal antiproteasa endógena, puede inactivarse con la exposición al humo del tabaco ha puesto en relieve el papel de la NE en la etiopatogenia de la EPOC en fumadores con niveles de α_1 -antitripsina normales (28) (Barnes PJ. 2003).

La catepsina-G y la proteinasa 3, producidas también por los neutrófilos, tienen propiedades similares a la elastasa neutrofílica y también son inhibidas por la α_1 -antitripsina.

Las metaloproteasas de matriz (MMPs) son una familia de endopeptidasas secretadas al medio extracelular por varios tipos celulares (neutrófilos y macrófagos alveolares) en respuesta a la exposición al humo del tabaco y su activación se traduce en una alteración de la estructura tisular. Existe evidencia del papel de las MMPs en la patogenia de la EPOC: en el lavado broncoalveolar de pacientes con enfisema se ha demostrado un aumento en la concentración de MMP-1 y MMP-9 y un aumento de la actividad de ésta última (35) (Betsuyaku T. 1999). Los macrófagos alveolares de los fumadores expresan más MMP-9 que los de los sujetos no fumadores y existe un incremento aún mayor en los macrófagos de los pacientes con EPOC (36) (Russell REK. 2002).

La actividad de las proteasas liberadas por las células inflamatorias es inhibida por antiproteasas endógenas.

La principal de todas ellas es la α_1 -antitripsina, potente inhibidor de las serinproteasas. Actualmente se reconoce que las múltiples variaciones genéticas de la α_1 -antitripsina producen la reducción de la concentración de la α_1 -antitripsina activa circulante (37) (Carrell R. 2002). La deficiencia que produce enfisema precoz mejor descrita es la tipo ZZ, en la que una única sustitución de un aminoácido (Gly342 ---> Lys) resulta en alteraciones estructurales de la α_1 -antitripsina que producen un fallo de su modificación postranslacional normal y una disminución de su secreción por los hepatocitos dando lugar a concentraciones plasmáticas

muy bajas (38) (Lomas D. 2002). La deficiencia de la α_1 -antitripsina ZZ es una causa rara de enfisema y representa < 1% de los pacientes, pero desde hace tiempo se ha propuesto que el humo del tabaco pueda oxidar a la α_1 -antitripsina produciendo un deterioro de su función antiproteasa y por consiguiente un aumento de la actividad de la NE (39) (Carp H. 1978).

Los principales inhibidores fisiológicos de las MMPs son la α_2 -macroglobulina y los llamados inhibidores tisulares de MMP (TIMP-1, -2, -3, -4). La secreción de TIMP-1 por los macrófagos alveolares está aumentada en respuesta a estímulos inflamatorios, sin embargo se ha visto que este aumento está bloqueado en pacientes con EPOC, favoreciéndose la elastólisis (36) (Russell REK. 2002).

Sin embargo, el equilibrio proteasas/antiproteasas no explicaría por sí mismo el avance de la enfermedad siendo necesarias otras alteraciones en el mecanismo de reparación que deben seguir al de destrucción pero que hasta la fecha aún no están bien identificadas.

2.3.3 Estrés oxidativo

El estrés oxidativo se define como la lesión tisular, celular o molecular, producida por la liberación de radicales libres de oxígeno (ROS).

El propio humo del cigarrillo contiene elevada concentración de ROS y las células inflamatorias y estructurales que se activan tras la exposición al humo del tabaco en las vías aéreas de los pacientes con EPOC, como neutrófilos, macrófagos, eosinófilos y células epiteliales también producen ROS (40,41) (MacNee W. 2001, Núñez-Naveira L. 2007).

Así, el humo del tabaco contiene y a la vez estimula la liberación de radicales libres de oxígeno (ROS), como el anión superóxido (O_2^-) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) por parte de estas células inflamatorias. El O_2^- y el H_2O_2 pueden interactuar en presencia de hierro libre para formar el radical hidroxilo (OH) altamente reactivo. El O_2^- también se puede combinar con óxido nitroso (NO) para formar peroxinitrito ($ONOO^-$) (42) (Beckman J. 1996), que como ya se ha comentado, parece contribuir a la corticorresistencia de estos pacientes (Figura 9).

Estos ROS estimulan una cadena de estrés oxidativo que juega un papel muy importante en la patogenia de la EPOC (Figuras 10, 11 y 12):

- Además de causar lesión tisular, al inactivar los inhibidores de las antiproteasas como la α_1 -antitripsina (43) (Taggart C. 2000), aceleran la metabolización de la elastina en el parénquima pulmonar,
 - son capaces de activar algunas de las vías de transcripción de señales dependientes de NF- κ B y AP-1 y también de las vías de señalización de las quinasas ERK (quinasa regulada por señal extracelular), de JNK (Quinasa c-Jun N-terminal) y de protein-quinasa activada por mitógenos p38 (p38 MAPK) que, a su vez, activan genes que codifican mediadores de la inflamación, como TNF- α , IL-8 y MMP-9, amplificando la respuesta inflamatoria neutrofílica (44) (Barnes, PJ. NEJM 1997). El factor de transcripción NF- κ B está activado en las vías aéreas y en los macrófagos alveolares de los pacientes con EPOC y está aún más activado durante las exacerbaciones. (45) (Di Stefano A. 2002). Es muy probable que el estrés oxidativo sea un importante activador de este factor de transcripción en los pacientes con EPOC. (Figura 10)

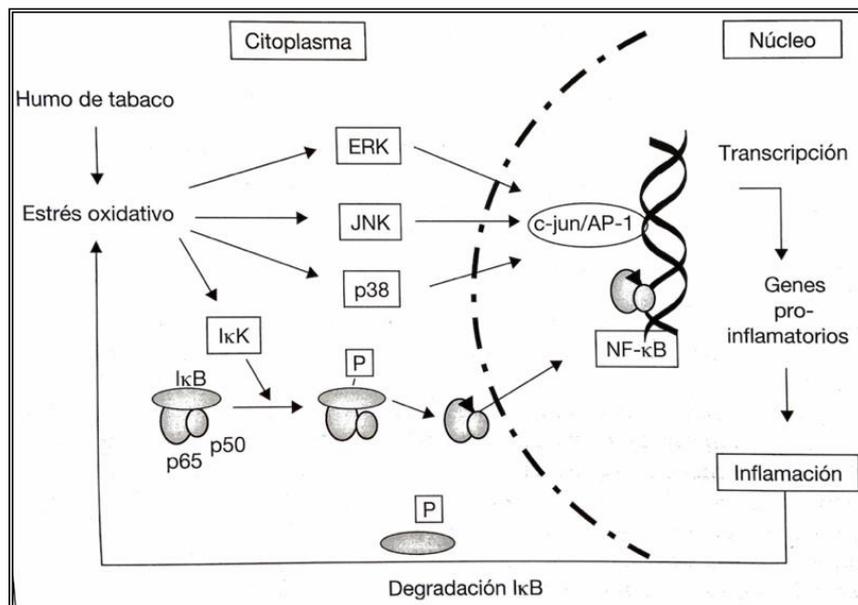


Figura 10. Activación de vías de señalización por el estrés oxidativo.

- El estrés oxidativo también conduce a la oxidación de ácido araquidónico y a la formación de una nueva serie de mediadores prostanoideos denominados isoprostanos, que pueden ejercer significativos efectos funcionales en la vía aérea, como broncoconstricción y exudación plasmática (46) (Janssen LJ, 2001).

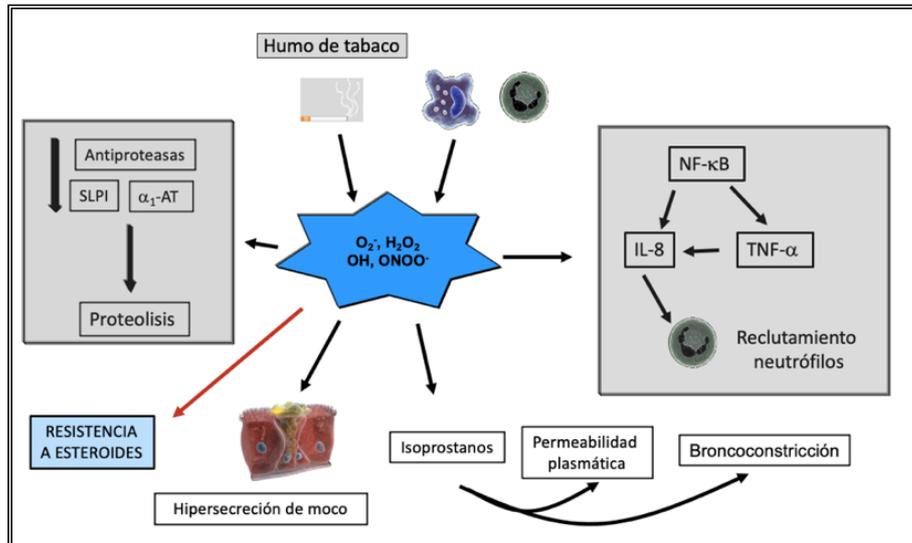


Figura 11. El papel del estrés oxidativo en la EPOC. Las ROS del humo de tabaco y de células inflamatorias (macrófagos y neutrófilos) producen la disminución de antiproteasas favoreciendo la proteólisis, activan el NF-κB que amplifica la respuesta inflamatoria, estimulan la hipersecreción mucosa y producen otros efectos directos sobre la función de la vías aéreas que favorecen la broncoconstricción.

- Otro evento inducido por el estrés oxidativo que participa en la patogenia de la EPOC es la remodelación de las cromatinas, que mediante la activación de las histonas nucleolares permite el desenrollamiento del ADN dejando que los factores de transcripción, como el NF-κβ y ARN (ácido ribonucleico)-polimerasa accedan a la maquinaria transcripcional aumentando la expresión génica de los mediadores inflamatorios. Se sabe que este proceso es sensible a oxidantes y que está controlado por las histonas acetiltransferasas (HAT), que producen la acetilación de las histonas, y por las histonas desacetilasas (HDAC) que revierten la acetilación produciendo de nuevo el enrollamiento del ADN en una apretada estructura de cromatina que lleva a la supresión de la transcripción génica o silenciamiento genético. Se ha demostrado que la exposición al humo de tabaco reduce la actividad de la proteína histona desacetilasa 2 (HDAC-2) en los macrófagos alveolares de los fumadores (47) (Ito K. 2001) favoreciendo así la expresión génica de mediadores de inflamación. Este reducción de la actividad y de la expresión de las HDAC-2 provocada por el estrés oxidativo, a través de la vía del peroxinitrito, es uno de los mecanismos propuestos para explicar la corticorresistencia en los pacientes con EPOC, como se explicará en el apartado correspondiente (48) (Barnes PJ. 2004). (Figuras 11 y 12).

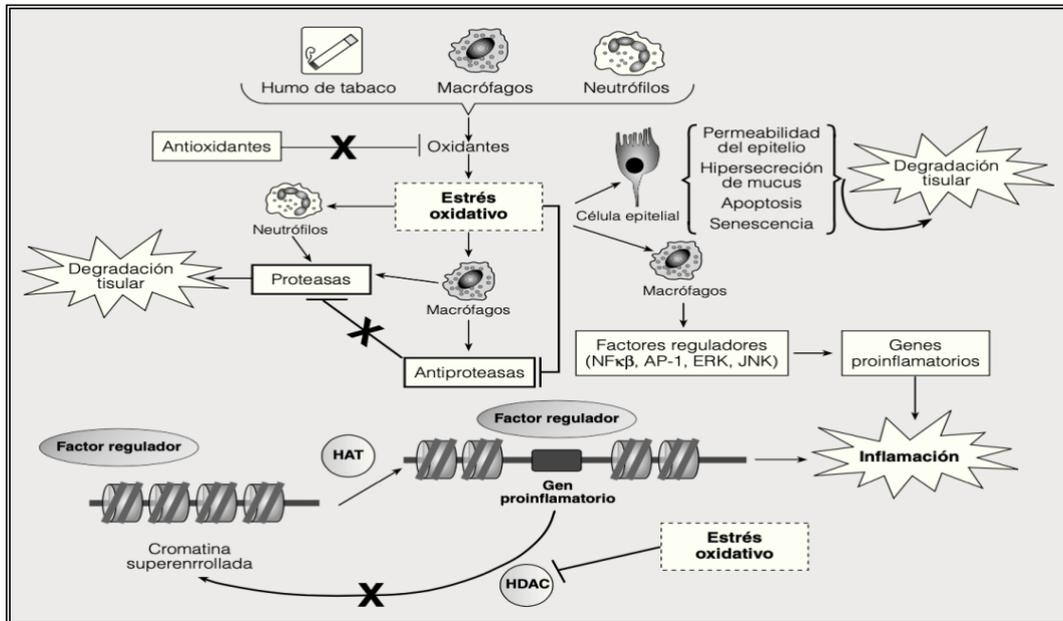


Figura 12. Efectos del estrés oxidativo. Los ROS están presentes en el humo del tabaco y son producidos también por las células de la respuesta inmunitaria tras ser activadas por el humo del tabaco. Si su carga desborda los sistemas de detoxificación antioxidante, se produce estrés oxidativo, que produce daño tisular directo, altera la producción de citocinas y proteasas por neutrófilos y macrófagos, e inhibe los sistemas antiproteasa. También afecta a la acción de las deacetilasas (HDAC) y acetilasas (HAT) de las histonas, parte de la maquinaria de remodelación de la cromatina, bloqueando las HDAC y favoreciendo la acetilación y la configuración desarrollada de la cromatina. Esta configuración facilita el acoplamiento al ADN de factores reguladores de la maquinaria transcripcional e induce la expresión de genes proinflamatorios. Figura tomada de la referencia 41.

- En esta reducción de la actividad de la HDAC-2 parece estar implicada también la activación de la vía de señalización de la fosfoinositol 3-quinasa (PI3K) por el propio estrés oxidativo. Las fosfoinositol 3-quinasas (PI3K) son una familia de proteínas que catalizan la fosforilación del anillo hidroxilo en posición 3 (3-OH) de los fosfoinositoles (PIs) y generan segundos mensajeros que controlan múltiples vías de señalización intracelular como son la expresión y activación de mediadores inflamatorios, el reclutamiento de células inflamatorias, el funcionamiento de células inmunes, el remodelado de la vía aérea y se ha observado que participan también en la corticorresistencia de los pacientes con EPOC. Concretamente, el estrés oxidativo activa la fosfoinositol 3-Quinasa δ (PI3K δ) (isoforma restringida fundamentalmente a los leucocitos), y esta fosforila otras quinasas en cascada, como Akt, provocando la inactivación de las histonas deacetilasas (HDAC2) por fosforilación (49) (Ito K. 2007). Estudios *in vitro* han demostrado que la inhibición de la vía PI3K mediante inhibidores no selectivos como LY-294002 es capaz de restaurar la insensibilidad a los corticoesteroides aumentando la actividad de la HDAC-2 en los pacientes con EPOC. (50) (To Y. 2010). Estos datos muestran que la vía de la PI3K puede jugar un importante papel en la patogénesis de la EPOC y esta afirmación viene reforzada

por la observación de que la migración neutrofílica aberrante y disfuncionante característica de estos pacientes es corregida con la inhibición de la PI3Kδ (51). (Sapey E. 2011).

2.4 Fisiopatología de la limitación al flujo aéreo en la EPOC

La enfermedad pulmonar obstructiva crónica es una de las pocas enfermedades respiratorias que incluye una afirmación sobre la función pulmonar en su definición: enfermedad respiratoria frecuente, prevenible y tratable caracterizada por una *limitación persistente al flujo aéreo*, que es habitualmente progresiva, y está asociada a una respuesta inflamatoria de las vías aéreas y del pulmón a partículas nocivas y gases (1) (GOLD. 2021).

Probablemente el punto inicial es la inflamación de las vías aéreas provocada por la inhalación del humo del tabaco u otras partículas nocivas (como hemos visto en el apartado previo) y los eventos finales son la discapacidad física y la muerte prematura.

En el proceso de desarrollo de la enfermedad, la limitación del flujo aéreo es un elemento central y en cierta medida el puente que conecta los defectos biológicos con los síntomas. En definitiva, la limitación del flujo aéreo es un mecanismo clave que determina la disnea, la discapacidad progresiva y la insuficiencia ventilatoria en los pacientes con EPOC (52). (Milic-Emili J. 2000).

El flujo aéreo viene determinado por el cociente entre: a) el gradiente de presión entre el alvéolo y la boca que va a generar la corriente de aire, y b) las resistencias de las vías aéreas que se oponen a la misma.

La limitación crónica al flujo aéreo característica de la EPOC provoca una disminución del flujo espiratorio debido:

- a la obstrucción de las vías respiratorias (por cambios inflamatorios en la pared bronquial consistentes en engrosamiento de la misma, hiperplasia muscular y fibrosis peribronquial que distorsionan y reducen el calibre de la luz de la vía aérea y por la alteración de la secreción y transporte de moco), que determina el incremento de las resistencias,

- y a una pérdida de la retracción elástica del pulmón y de las fijaciones alveolares que sostienen las vías aéreas pequeñas (produciendo enfisema) y que determina un incremento de la distensibilidad y una disminución de la presión de retroceso elástico o transpulmonar (53) (Thurlbeck W. 1991) (54) (Cosío M. 1999).

En la práctica clínica con frecuencia se utilizan los términos limitación al flujo aéreo y obstrucción bronquial como sinónimos, pero ya hemos visto que no lo son y que tienen diferente significado en la fisiopatología de la EPOC.

Las implicaciones clínicas de esta distinción entre limitación al flujo aéreo y obstrucción bronquial son:

- la destrucción del parénquima pulmonar es esencialmente un fenómeno irreversible, mientras que la inflamación y la obstrucción bronquial pueden ser, hasta cierto punto, tratadas con fármacos antiinflamatorios y broncodilatadores;
- la presencia de limitación al flujo aéreo es más relevante en la fisiopatología y la clínica de la EPOC (disnea, tolerancia al ejercicio, insuficiencia respiratoria, etc.) que la simple obstrucción de las vías aéreas.

La limitación al flujo aéreo crónica produce un retardo en el vaciamiento pulmonar durante la espiración, primero durante niveles diferentes de esfuerzo hasta llegar a producirse en reposo conforme avanza la enfermedad, impidiendo una espiración completa y aumentando la capacidad residual funcional (FRC), dando lugar a lo que se conoce como hiperinsuflación pulmonar (55) (Calverley PM. 2005).

La hiperinsuflación pulmonar viene definida por un incremento de la capacidad residual funcional (FRC) por encima de los valores predichos. La FRC es la cantidad de gas remanente en los pulmones y las vías aéreas al final de una espiración a volumen corriente. En los sujetos normales, la FRC se corresponde con el volumen de equilibrio elástico del sistema respiratorio, es decir, del volumen al cual la retracción elástica interna de los pulmones es contrarrestada por la retracción elástica externa de la pared torácica. En estas circunstancias, la FRC se posiciona alrededor del 40% de la capacidad pulmonar total (TLC). El acto de respirar insufla los pulmones por medio de la contracción de los músculos inspiratorios y la espiración se

produce pasivamente hasta la FRC por la retracción elástica almacenada durante la inspiración precedente (56) (Agostoni E. 1964).

En los pacientes con EPOC, el volumen de equilibrio estático del sistema respiratorio se mantiene en un volumen pulmonar mayor que en los sujetos normales a causa de la disminución de la retracción elástica pulmonar de manera que el punto de equilibrio entre la retracción elástica pulmonar y de la caja torácica (el volumen de FRC) es mayor, alrededor del 55-60% de la TLC.

Esta hiperinsuflación pulmonar es la principal consecuencia de la limitación del flujo aéreo y tiene devastadoras consecuencias sobre la mecánica de la respiración. La respiración a un volumen pulmonar más elevado aumenta el trabajo ventilatorio y supone una carga adicional sobre los músculos inspiratorios cuya capacidad generadora de presión está deteriorada por la hiperinsuflación, al alterar la disposición geométrica del diafragma y la longitud-tensión de sus fibras (57) (Rochester DF. 1991).

Con respecto a la repercusión clínica, como ya se ha comentado, esta limitación al flujo aéreo y su consecuencia directa, la hiperinsuflación pulmonar, son los mecanismos clave que determinan la disnea, la intolerancia al esfuerzo, la discapacidad progresiva y la insuficiencia ventilatoria en los pacientes con EPOC (52) (Milic-Emili J. 2000) (58) (Elbehairy AF. 2015).

2.5 Participación del sistema colinérgico en la EPOC

El sistema colinérgico o parasimpático desempeña un papel esencial en la regulación del tono bronquial al ser la principal inervación vegetativa de las vías aéreas en la especie humana (59) (Barnes PJ. 1987). Las fibras colinérgicas presinápticas parten de diferentes áreas del tronco cerebral y llegan a los ganglios parasimpáticos localizados en las paredes de las vías respiratorias a través del nervio vago, donde se produce la sinapsis neuronal y surgen las fibras postganglionares que inervan los diferentes tejidos diana: la musculatura lisa, manteniendo el tono de la vía aérea; las glándulas submucosas, estimulando la secreción de moco, y los vasos sanguíneos, produciendo vasodilatación. Los nervios parasimpáticos predominan en la vía aérea proximal y van disminuyendo hacia la vía aérea periférica. Todos los efectos del sistema

colinérgico están mediados por la acetilcolina (ACh), su principal neurotransmisor (59) (Barnes PJ. 1987).

Desde el punto de vista estructural los receptores muscarínicos son receptores acoplados a la proteína G que es la que transduce la interacción ligando-receptor a una gran variedad de proteínas efectoras intracelulares como pueden ser distintas enzimas, canales iónicos, proteínas reguladoras o proteínas señalizadoras. Estos receptores acoplados a proteínas G forman parte integral de la membrana plasmática y estas proteínas G serían el componente intermedio del complejo "receptor-proteína G-efector" actuando como interruptores.

Dentro de la familia de proteínas G se distinguen dos grandes subfamilias: las heterotriméricas y las monoméricas. La unión de un agonista muscarínico a su receptor va a desencadenar la activación de una proteína G heterotrimérica. Estas proteínas G heterotriméricas constan de tres subunidades (α , β y γ) y dependiendo del tipo de receptor muscarínico, la activación de un determinado subtipo de la subunidad α de la proteína G va a provocar una respuesta enzimática efectora distinta (Figura 13) (60) (Wettschureck N. 2005):

- la activación del subtipo α_{Gi} \rightarrow producirá inhibición de la adenilciclase,
- la activación del subtipo $\alpha_{Gq/11}$ \rightarrow activará a la fosfolipasa C (PLC) e inducirá la formación de inositol 1,4,5-trifosfato (IP3) y de diacilglicerol (DAG) a partir de fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP₂).

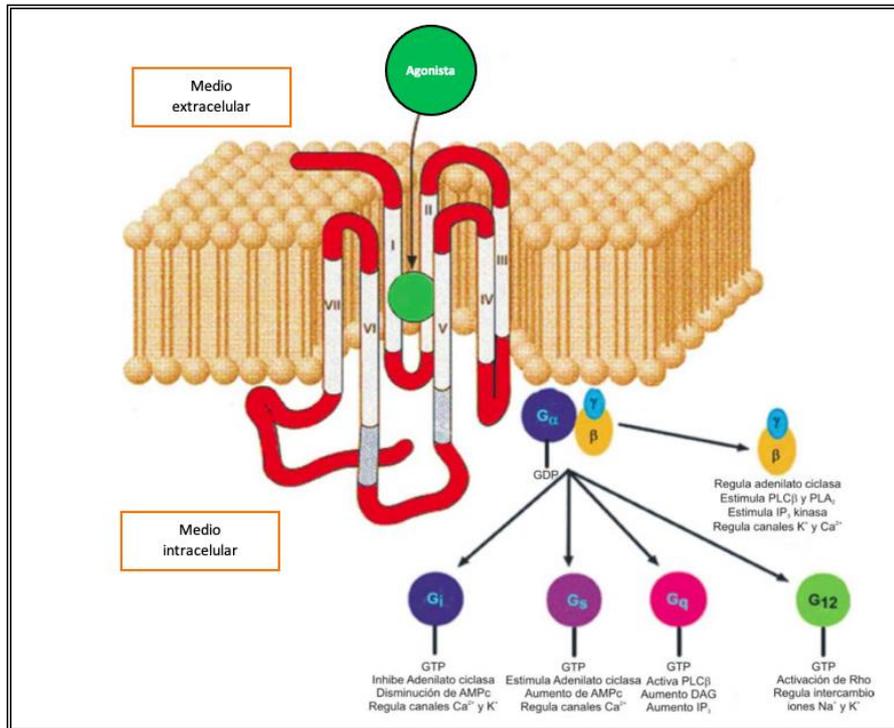


Figura 13. Estructura de receptor muscarínico acoplado a proteína G. Conformación de siete segmentos transmembrana del receptor muscarínico (I-VII). La proteína G está inactiva en forma de trímero (α , β y γ) asociada a GDP (guanosín difosfato). Al intercambiarse el GDP por GTP (guanosín trifosfato) se disocia el trímero activándose así la subunidad α de la proteína G. Dependiendo del subtipo de subunidad α activado la respuesta efectora será distinta.

De los cinco subtipos diferentes de receptores muscarínicos (M1-M5) descritos, solo tres ejercen diferentes funciones fisiológicas y participan en el control del calibre de la vía aérea (M1, M2 y M3), su localización y funciones se recogen en la Tabla 1.

- Los receptores "impares" M1, M3 y M5 están acoplados al subtipo $Gq/11$ de la subunidad α de la proteína G y su activación media la contracción bronquial activando la fosfolipasa C (PLC) que conducirá a la formación de inositol 1,4,5-trifosfato (IP3) necesaria para activar la secreción intracelular de calcio,
- y los "pares" M2 y M4 están acoplados al subtipo G_i de la subunidad α de la proteína G y median la activación de la PI3K y la inhibición de la adenilciclase con la consiguiente disminución en la formación de AMPc. (62) (Gosens R. 2006).

No se ha estudiado la relevancia en las vías aéreas de los receptores M4 y M5, pero por su tipo de unión a la proteína G, el M4 sería similar al M2 y el M5 al M1 y M3.

Los receptores M1, localizados en los ganglios parasimpáticos, paredes alveolares y glándulas submucosas, actúan como facilitadores de la neurotransmisión liberando la ACh que actúa sobre los receptores M3 (figura 14).

Los receptores M3 (acoplados al subtipo Gq/11 de la subunidad α de la proteína G) están presentes en el músculo liso y las glándulas submucosas y son los principales responsables de la broncoconstricción y la hipersecreción mucosa. Se encuentran fundamentalmente en el músculo liso de las vías aéreas grandes, pero también en las pequeñas y distribuidos por todo el pulmón. El antagonismo de este receptor M3 es el principal responsable del efecto broncodilatador producido por los fármacos antagonistas muscarínicos (figura 14)

Por último, los receptores M2 que se encuentran en las terminaciones nerviosas colinérgicas (nervios posganglionares) actúan inhibiendo la liberación local de ACh, es decir que ejercen un *feed-back* negativo en la acción vagal (autorreceptor). Estos últimos, son los receptores más abundantes en el músculo liso bronquial donde también controlan la broncodilatación inducida por los β -adrenorreceptores, al inhibir la adenilciclasa. (61,62) (Barnes PJ 1993; Gosens R. 2006). El bloqueo de este receptor aumenta la liberación de ACh y puede producir broncoconstricción (figura 14).

Para el tratamiento de la broncoconstricción en la EPOC el fármaco antimuscarínico ideal sería aquel que inhibiera solo los receptores M1 y M3 y respetara los receptores M2.

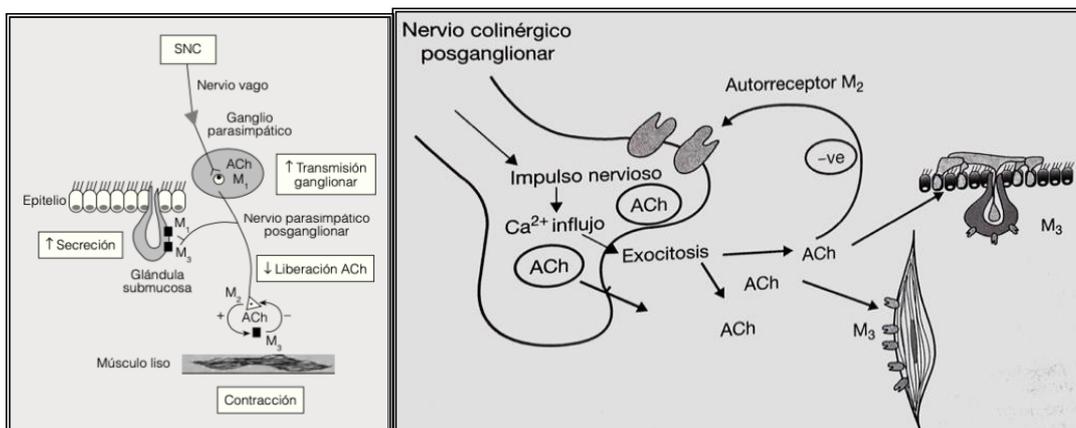


Figura 14. Esquema de la inervación colinérgica en la vía aérea y localización de los receptores muscarínicos (M1, M2, M3). Los nervios parasimpáticos posganglionares M3 inervan el músculo liso y las glándulas de las vías aéreas. La ACh liberada activa los receptores M3 produciendo secreción de moco y broncoconstricción. Su acción sobre los receptores M2 presinápticos inhibe la liberación de más ACh.

Tabla 1. Tipos de receptores muscarínicos en la vía aérea

Receptor	Localización	Acción
M ₁	Ganglios parasimpáticos	Facilita la transmisión sináptica
	Glándulas mucosas Pared alveolar	Aumenta la secreción (?)
M ₂	Nervios posganglionares	Autorreceptor: inhibe la liberación de acetilcolina
	Músculo liso bronquial	
M ₃	Músculo liso bronquial	Broncoconstricción
	Glándulas mucosas	Aumento de la secreción
	Células epiteliales	
	Células endoteliales	

En condiciones normales existe una baja actividad tónica basal de la musculatura bronquial que depende del tono colinérgico. La actividad parasimpática aumenta a través de reflejos nerviosos vagales broncoconstrictores, que se desencadenan por la estimulación de las terminaciones sensoriales próximas a las células epiteliales. Los estímulos desencadenantes pueden ser diversos: inhalación de partículas, gases, aerosoles, aire frío o caliente, etc. Por tanto, los nervios colinérgicos constituyen la vía broncoconstrictora dominante en las vías aéreas en humanos. Tanto en el asma como en el EPOC existe una hiperreactividad bronquial a estos estímulos que parece deberse a un estado de hiperexcitabilidad a cualquier nivel del arco reflejo vagal.

La broncoconstricción producida por estimulación vagal cumple una función fisiológica, ya que el aumento del tono de las vías aéreas ayuda a prevenir el colapso de aquellas vías aéreas que no tienen cartílago y mejora el tono de las vías cartilaginosas. Aunque la broncoconstricción produce obstrucción de la vía aérea, es necesario un pequeño aumento del tono del músculo para mantener las vías permeables, especialmente para evitar su colapso durante la espiración. No obstante, un excesivo aumento del tono colinérgico es el responsable de parte de la obstrucción de la vía aérea que se observa en los pacientes con EPOC (63) (Brussaco V. 2006) y el tono colinérgico aumenta a medida que se incrementa la gravedad de la obstrucción.

Los fármacos antimuscarínicos bloquean de forma competitiva el efecto de la acetilcolina sobre los receptores de la musculatura lisa bronquial, por ello son especialmente útiles en el tratamiento de la EPOC ya que el tono colinérgico vagal parece ser el componente reversible del estrechamiento de la vía aérea en esta enfermedad (64) (Barnes PJ. 1995) (65) (Barnes PJ.

2000). La eficacia broncodilatadora dependerá del grado en el que el reflejo colinérgico broncoconstrictor contribuya al broncoespasmo de cada paciente concreto, por lo que son especialmente útiles en la EPOC, y esta actividad anticolinérgica se manifestará con independencia de cuál sea la causa de aumento del tono vagal (66) (Undem BJ. 2005).

A diferencia de lo que sucede en el asma, donde la obstrucción de la vía aérea se debe a múltiples factores, la inhibición del tono muscular de la vía aérea puede ser el principal, si no el único, medio farmacológico de aumentar el flujo aéreo en pacientes con EPOC.

El tono colinérgico puede estimarse indirectamente *in vivo* midiendo el aumento del FEV₁ tras la administración de un agente anticolinérgico (o antimuscarínico). Utilizando este método, Gross *et al* (67) (1989) demostraron que el tono colinérgico aumenta en los pacientes con EPOC en comparación con los sujetos sanos, siendo el aumento del FEV₁ directamente proporcional a la gravedad de la enfermedad. Este aumento del tono colinérgico puede abolirse con los antimuscarínicos y, dado que la resistencia depende de la cuarta potencia del radio, puede tener un impacto clínicamente importante en estos pacientes. Por ello los fármacos anticolinérgicos pueden producir una broncodilatación igual o superior a la de los agonistas β_2 en pacientes con EPOC. Además tienen un efecto favorable adicional bloqueando la hipersecreción mucosa.

De este modo, los fármacos antimuscarínicos en la EPOC pueden producir un efecto clínico favorable a través de diversos mecanismos que incluyen un efecto broncodilatador, reducción de la hipersecreción mucosa y protección de la vía aérea frente a estímulos broncoconstrictores por ello son fármacos cruciales en el tratamiento de estos pacientes.

2.5.1 Papel del sistema colinérgico no neuronal en la EPOC

El término "sistema colinérgico no neuronal" se refiere a la síntesis o degradación de ACh y la respuesta a este neurotransmisor en células no neuronales. (68) (Wessler IK. 1998)

A pesar de que la acetilcolina se ha considerado tradicionalmente como un neurotransmisor clásico, cada vez está más reconocido que la ACh puede también servir de molécula de señalización autocrina y paracrina. Es decir, la producción de acetilcolina en la vía aérea no solo está restringida al sistema nervioso parasimpático como hemos visto, sino que puede ser

secretada por múltiples células del sistema inmune innato (neutrófilos, macrófagos, basófilos, eosinófilos, mastocitos, células dendríticas) que expresan receptores muscarínicos funcionales y por células del epitelio bronquial, jugando un papel importante en la modulación de la respuesta inflamatoria (69–73) (Wessler IK 2001, Wessler IK 2008, Racke K 2004, Fuji T 2017, Koarai A, 2018). (Figura 15)

Las células inmunes están dotadas de todos los elementos necesarios para constituir un sistema colinérgico independiente, como ACh, acetilcolintransferasa (ChAT, enzima sintetizadora de ACh) y acetilcolinesterasa (AChE, enzima que hidroliza la ACh) y estas células además son capaces de expresar receptores muscarínicos y nicotínicos funcionales en respuesta a estímulos antigénicos, participando así en las respuesta inflamatoria (72) (Fuji T. 2017).

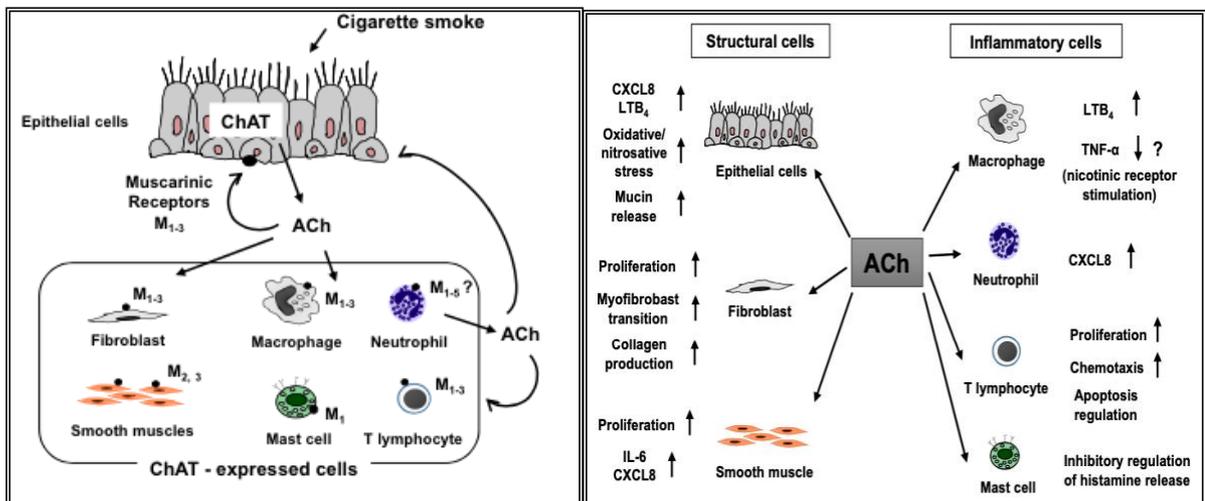


Figura 15. Sistema colinérgico no neuronal en la vía aérea y efectos inflamatorios de la acetilcolina (ACh) en las células estructurales e inflamatorias. Figura tomada de la referencia 73.

En este sentido parece interesante analizar en detalle el papel del sistema colinérgico no neuronal de los neutrófilos ya que es la célula efectora clave en la patogenia inflamatoria de la EPOC y objeto principal de este estudio.

2.5.1.1 Participación del sistema colinérgico no neuronal en la respuesta inflamatoria en la vía aérea de la EPOC

Se sabe ya desde hace más de 40 años que los neutrófilos de sangre periférica tienen sitios de unión para agonistas muscarínicos como pilocarpina y antagonistas como atropina, lo que demuestra la presencia de receptores muscarínicos en estas células (74) (Dulis BH. 1979). Según los resultados de diversos estudios parece que el patrón de expresión de estos receptores muscarínicos es diferente en función de la patología inflamatoria subyacente. Así los neutrófilos de donantes sanos y pacientes con artritis reumatoide expresan los subtipos M3, M4 y M5 pero no M1 y M2 (75) (Bany U. 1999).

Profita *et al* (76) (Profita M. 2005) analizaron los neutrófilos de esputo de pacientes EPOC, de individuos sanos fumadores y no fumadores y observó una sobreexpresión de M3 en pacientes EPOC con respecto a fumadores y a controles no fumadores y observó también que la incubación de estos neutrófilos con acetilcolina aumentaba significativamente la producción de leucotrieno-B4 (LTB4), activaba la vía p42/p44 MAPK y aumentaba la actividad quimiotáctica de neutrófilos en los pacientes EPOC con respecto a los otros dos grupos. Estos resultados son totalmente consistentes con un estudio que demostró que los macrófagos alveolares bovinos liberan moléculas quimiotácticas de eosinófilos, monocitos y neutrófilos en respuesta a la acetilcolina, con probablemente una participación predominante del leucotrieno B4 (77) (Sato E. 1998).

La migración de estas células inflamatorias se ha visto que es dependiente de la activación de la vía de señalización de la fosfoinositol 3-kinasa (PI3K) a través de la estimulación de los receptores acoplados a la proteína G (78) (Thomas MJ. 2005) como los receptores muscarínicos M2.

En esta línea, otro trabajo llevado a cabo con macrófagos alveolares de pacientes con EPOC demostró que en ellos existe un aumento en la expresión del transportador de ACh de alta afinidad, de acetilcolintransferasa, de transportador vesicular de ACh (VAcHT) y de receptores muscarínicos M1, M2 y M3. En este trabajo la estimulación de los receptores M3 de los macrófagos promovió una elevada secreción de LTB4 por parte de los macrófagos alveolares

de los pacientes EPOC lo que sugiere el posible papel anti-inflamatorio de los fármacos antimuscarínicos (79) (Koarai A. 2012).

Estas observaciones revelan claramente que la expresión regulada de los subtipos de receptores muscarínicos es una característica de las células inflamatorias que migran a las vías respiratorias en respuesta a diversos estímulos, aunque es necesario dilucidar el impacto funcional preciso de la expresión de estos receptores dinámicos en estas células (62) (Gosens R. 2006).

Además de sus efectos directos sobre las células inflamatorias, la acetilcolina también puede desencadenar la liberación de quimiocinas y citocinas de las células estructurales. Las células del epitelio bronquial liberan quimiotáctico de eosinófilos, monocitos y neutrófilos en respuesta a la ACh (80) (Koyama S. 1992) (Figura 15). También se sabe que la acetilcolina induce la liberación de GM-CSF (factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos) de las células epiteliales bronquiales humanas mediante un mecanismo que involucra receptores nicotínicos (81) (Klapproch H. 1998).

Otro efecto demostrado es que la exposición al humo del tabaco puede inducir secreción de acetilcolina por el sistema colinérgico no neuronal que mediará la secreción de IL-8 (potente factor quimiotáctico de neutrófilos) contribuyendo así a la inflamación neutrofílica crónica y al remodelado de la vía aérea de los pacientes EPOC (82,83) (Cortijo J. 2011; Gosens R. 2009).

En resumen, en vista de los resultados de los estudios mencionados, los agonistas y antagonistas de los receptores muscarínicos en los neutrófilos tienen un efecto evidente en la regulación positiva o negativa de las respuestas innatas. Estos fenómenos impactan en la migración, la capacidad fagocítica, la degranulación, la generación de especies reactivas de oxígeno, la producción de citocinas y la expresión de moléculas de adhesión, lo que conduce a modificaciones sustanciales en la capacidad de los neutrófilos para participar en la respuesta inflamatoria de enfermedades como la EPOC. (84) (Covantes-Rosales CE. 2019)

Todos estos hallazgos demuestran que existe una participación del sistema colinérgico no neuronal en la respuesta inmune innata en la vía aérea de los pacientes con EPOC.

Por todo ello es de esperar que los fármacos antimuscarínicos puedan tener un efecto antiinflamatorio e inhibir la progresión de la enfermedad regulando este proceso inflamatorio. Sin embargo el papel de los fármacos antimuscarínicos en la modulación de la respuesta inflamatoria en la vía aérea de los pacientes EPOC sigue pobremente estudiada, como se abordará más adelante.

2.6 Diagnóstico y clasificación de gravedad de la EPOC

El diagnóstico preliminar de sospecha de EPOC (1,3,4) (GOLD 2021, Miravittles M. 2021, Miravittles M. 2017) se basa en:

- La exposición previa a factores de riesgo (humo de tabaco, polución ocupacional, urbana o doméstica, y
- la presencia de síntomas respiratorios compatibles (disnea, tos +/- expectoración).

El diagnóstico de EPOC siempre necesita ser confirmado mediante una espirometría forzada con test broncodilatador. Todas las guías nacionales e internacionales sobre evaluación y manejo de la EPOC (1,4) (GOLD 2021, Miravittles M. 2017) indican que la medición del FEV₁ (volumen espiratorio forzado en un segundo) es el parámetro fundamental de la función respiratoria:

- para confirmar el diagnóstico de EPOC,
- clasificar la gravedad de la enfermedad,
- y evaluar su progresión.

El FEV₁ se mide sobre la gráfica de flujo/volumen de una maniobra espiratoria forzada. Esta maniobra se registra desde el punto de máxima inspiración hasta la espiración completa a la máxima velocidad posible durante al menos 6-9 segundos para medir también la FVC (capacidad vital forzada).

Se considera que existe obstrucción al flujo aéreo si el cociente FEV₁/FVC es inferior a 0.7 tras el test broncodilatador independientemente de la edad, género, etnia, talla y peso y este será el parámetro diagnóstico de EPOC. Las limitaciones obvias de un índice tan absoluto son bien conocidas (85)(Viegi G. 2000). Sin embargo existe un acuerdo generalizado acerca de la necesidad de una herramienta simple para el diagnóstico de EPOC, y para reducir el gran infradiagnóstico de una enfermedad cuyo impacto sobre la salud pública está claramente documentado como ya se ha tratado en apartados previos.

Así, hoy en día, todas las guías sobre la EPOC aceptan que el diagnóstico de EPOC se establece cuando se obtiene un cociente FEV₁/FVC menor de 0.7 tras el test broncodilatador, y que su gravedad se clasifica en función del porcentaje del FEV₁ previsto (FEV₁ % prev). (Tabla 2) (Figura 16).

Tabla 2. Clasificación de la gravedad de la obstrucción de la EPOC

Grado de obstrucción	FEV ₁ tras broncodilatador
Leve – GOLD 1	≥ 80 % predicho
Moderada – GOLD 2	50 % ≤ FEV ₁ < 80 % predicho
Grave – GOLD 3	30 % ≤ FEV ₁ < 50 % predicho
Muy grave – GOLD 4	< 30 % predicho

(1,4) En pacientes con FEV₁/FVC < 0.7 post-broncodilatador

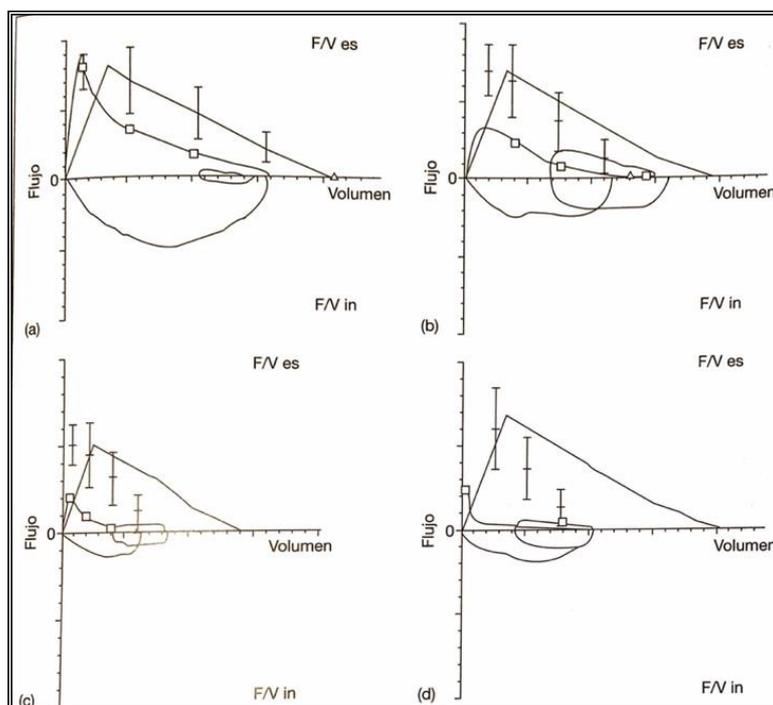


Figura 16. Curvas de flujo-volumen (FV) de pacientes con diferentes grados de EPOC. a) Leve (FEV₁ previsto > 80%); b) Moderada (FEV₁ prev 56%); c) Grave (FEV₁ prev 37%) d) Muy grave (FEV₁ prev 21%). Línea negra triangular: curva FV prevista. F/V es: parte espiratoria de curva FV. F/V in: parte inspiratoria de curva FV

El test broncodilatador, que consiste en repetir la espirometría después de administrar un broncodilatador de forma estandarizada (400 mcg de salbutamol o 160 mcg de bromuro de ipratropio), permite objetivar la reversibilidad de la obstrucción. Se considera positiva si se

confirma un aumento del $FEV_1 > 200$ ml y del 12 % del valor anterior a la broncodilatación. La reversibilidad de la obstrucción tras la prueba broncodilatadora es muy variable en la EPOC y con frecuencia se observan cambios a lo largo del tiempo. Por este motivo, en la actualidad, la existencia de una prueba broncodilatadora positiva no excluye el diagnóstico de EPOC ni confirma el de asma (4) (Miravittles M. 2017).

Tras la fundamental publicación de Fletcher y Peto en 1977 (86) (Fletcher C. 1977), sobre la historia natural de la limitación al flujo aéreo, la progresión de la EPOC se evalúa comúnmente por medio de la medición del declive anual de FEV_1 . Este declive está acelerado en fumadores y en pacientes EPOC en comparación con sujetos sanos (50-100 ml/año frente a 30 ml/año, respectivamente) (Figura 17). El abandono del tabaquismo retarda la tasa de declive del FEV_1 a cualquier edad (1,86) (GOLD 2021, Fletcher C. 1977).

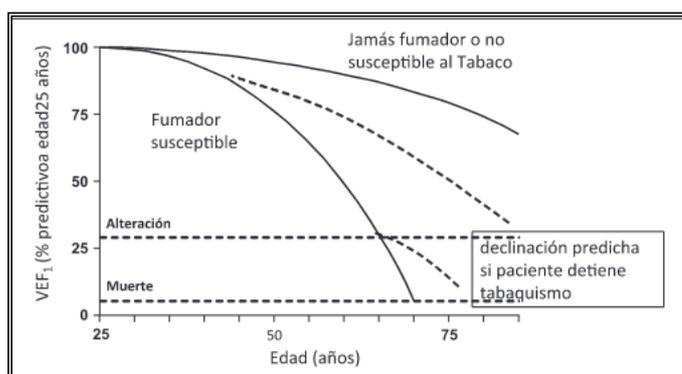


Figura 17. Curva de Fletcher & Peto. Declive del FEV_1 en relación al consumo de tabaco en fumadores susceptibles. Figura adaptada de referencia 86

2.6.1 Estratificación del riesgo

Una vez confirmado el diagnóstico de EPOC y clasificado por gravedad en función del FEV_1 post-broncodilatador (Tabla 1) interesa valorar el nivel de riesgo. Se entiende como tal la probabilidad de que el paciente pueda presentar agudizaciones, progresión de enfermedad, futuras complicaciones, mayor consumo de recursos sanitarios o mayor mortalidad (3) (Miravittles M. 2021).

Los factores considerados para la evaluación de riesgo y su proceso de estratificación son algo distintos en la Guía Española de la EPOC (GesEPOC 2021) (3) con respecto al documento de la Global Initiative for Obstructive Lung Disease (GOLD) (1) (GOLD 2021).

En la Guía Española de la EPOC (GesEPOC 2021) (3) los factores considerados para la evaluación del riesgo son (Figura 18):

- FEV₁ post-broncodilatador,
- el grado de disnea medido por la escala modificada de la *Medical Research Council* (mMRC) y
- la historia de agudizaciones durante el último año.

Todos los componentes de esta clasificación de riesgo han demostrado tener poder predictivo sobre la mortalidad (87) (Cabrera C. 2019), por tanto a mayor nivel de riesgo, mayor necesidad de intervenciones terapéuticas.

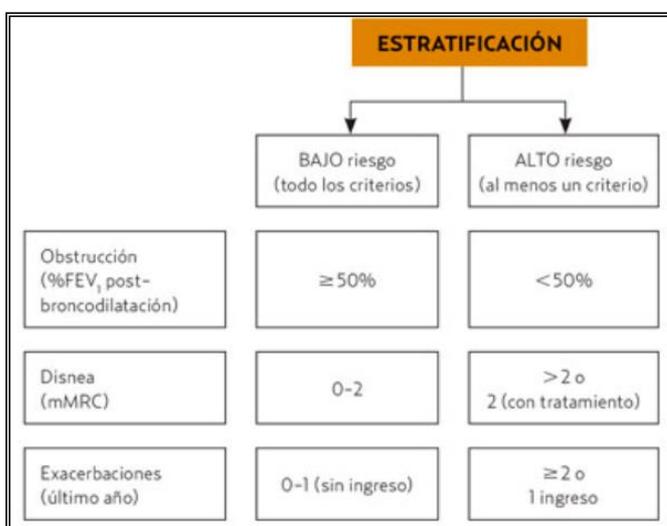


Figura 18. Estratificación del riesgo de los pacientes EPOC según GesEPOC 2021.
Figura tomada de la referencia 3

La Global Initiative for Obstructive Lung Disease (GOLD) tras clasificar por gravedad al paciente en función del grado de obstrucción (FEV₁ post-broncodilator; GOLD 1, 2, 3, 4) (Tabla 2) propone, en su última actualización recientemente publicada (88) (GOLD 2023) estratificarlo en 3 categorías (A, B, E) en función de los siguientes parámetros (Figura 19):

- el número de exacerbaciones en el último año,
- el grado de disnea medido por la escala modificada de la *Medical Research Council* (mMRC) y

- la puntuación en el Cuestionario CAT (COPD Assessment Test): cuestionario que evalúa mediante 8 items el impacto que, los síntomas relacionados con la EPOC, tienen en el estado de salud del paciente (89) (Jones PW. 2009).

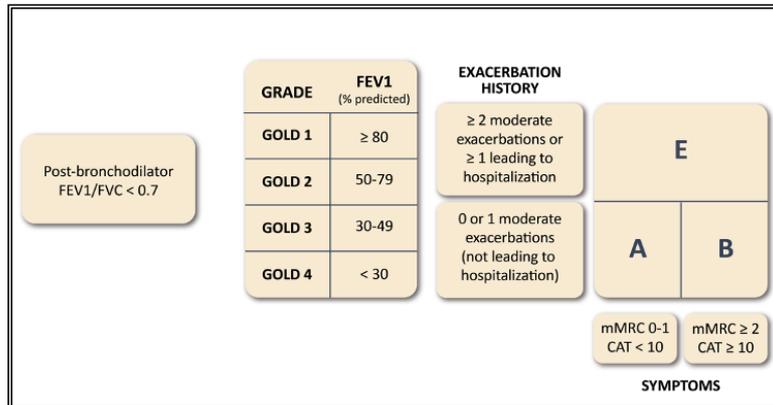


Figura 19. Estratificación del riesgo de los pacientes EPOC según GOLD 2023
 Figura tomada de la referencia 88

Los principales objetivos de clasificar la gravedad y estratificar el riesgo de los pacientes EPOC serán ayudar a decidir cuál es el tratamiento de inicio más adecuado y, en controles posteriores, evaluar el grado de control sintomático, la estabilidad clínica y funcional y en función de estos parámetros modificar el tratamiento en caso necesario (1,3,4,88) (GOLD 2021, Miravittles M. 2017, Miravittles M. 2021, GOLD 2023).

2.7 Exacerbaciones en la EPOC

El curso clínico de la EPOC se caracteriza por presentar episodios agudos de inestabilidad clínica en los que se produce un empeoramiento mantenido de la sintomatología respiratoria cuya intensidad va más allá de la variabilidad inherente a esta enfermedad y que precisan de una modificación de la medicación habitual. Estos episodios, que varían en gravedad, duración y también en consecuencias son llamadas exacerbaciones o agudizaciones (1,4) (GOLD 2021, Miravittles M 2017).

Desde el punto de vista fisiopatológico, las agudizaciones son eventos complejos habitualmente relacionados con un incremento de la inflamación local y sistémica, con un aumento de la producción de moco y un marcado atrapamiento aéreo, eventos que

contribuyen al empeoramiento de la disnea, de la tos y al incremento del volumen y la purulencia de la expectoración.

Los pacientes con EPOC sufren un promedio de 1-4 exacerbaciones/año sin embargo la gravedad, la duración y la frecuencia de las mismas varía enormemente de unos pacientes a otros. Mientras algunos pacientes no sufren estos episodios, otros lo hacen de forma repetida, clasificándose como fenotipo exacerbador aquellos que sufren 2 o más exacerbaciones al año o una grave que precise ingreso hospitalario (1,4) (GOLD. 2021, Miravittles M. 2017).

El motivo por el cuál existe una predisposición individual a sufrir más exacerbaciones es desconocido, pero múltiples estudios, como el estudio ECLIPSE (90) (Hurst J. 2010) han demostrado que el principal factor de riesgo para sufrir una exacerbación es el antecedente de exacerbaciones previas, por tanto intentar prevenirlas será un objetivo clave en el tratamiento de estos pacientes.

La identificación de la causa que provoca la exacerbación es de gran importancia de cara a la planificación de un tratamiento adecuado. Sin embargo, en aproximadamente un tercio de los casos la etiología no se llega a conocer. La causa más frecuente es la infección del árbol traqueobronquial (50-70%), mientras que la contaminación ambiental puede ser la causante de un 5-10% de los casos (4) (Miravittles M. 2017).

Estos episodios son elementos claves en el curso natural de la enfermedad por cuanto:

- Generan una gran carga asistencial y enormes costes. En España la exacerbación de EPOC origina un 10-12% de las consultas de medicina primaria y el 1-2% de todas las visitas a urgencias médicas hospitalarias y de estas últimas el 40-50% van a precisar ingreso hospitalario lo que supone el 10% de las hospitalizaciones de causa médica (91) (Soler JJ. 2001). De hecho las hospitalizaciones debidas a exacerbaciones son responsables de la mayor parte del gasto relacionado con la EPOC (11) (Global Burden of Disease Study (GBD) 2015).
- Impactan de forma negativa sobre la calidad de vida de los pacientes ya que contribuyen a la progresión multidimensional de la enfermedad condicionando su

pronóstico y aumentando el riesgo de muerte (13) (Decramer M. 2012). Cada vez existe mayor evidencia que apoya que las exacerbaciones graves, y sobre todo si requieren ingreso hospitalario, pueden ser por sí mismas un factor de riesgo independiente de mortalidad (92) (Soler-Cataluña JJ. 2005) (93) (Soler-Cataluña JJ. 2009).

Por todo ello el tratamiento de las exacerbaciones y sobre todo su prevención se ha convertido en un objetivo prioritario en el manejo de los pacientes en fase estable.

2.8 Tratamiento farmacológico del EPOC estable

Como ya se ha comentado en el apartado de impacto global de la EPOC, hasta el momento y a pesar de la continua actividad investigadora en EPOC y la generación de nuevas evidencias en su tratamiento, sigue siendo una enfermedad sin un tratamiento eficaz en términos de curación. Hasta la fecha ningún ensayo clínico publicado ha demostrado que exista ningún tratamiento que modifique la pérdida de función pulmonar progresiva (94,95) (Tashkin DP. 2008; Calverley P. 2007).

El abandono del hábito tabáquico es la única intervención capaz de influir en la historia natural de la EPOC. Según las principales guías y consensos nacionales e internacionales del abordaje de esta enfermedad, el tratamiento del tabaquismo es la medida terapéutica más eficaz y coste-efectiva (1,4) (GOLD. 2021; Miravittles M. 2017). Pero en realidad esta intervención, farmacológica o no según sea necesario, es una estrategia más preventiva que curativa ya que pretende prevenir o ralentizar el desarrollo de EPOC o reducir su progresión (96) (van Eerd EA. 2016).

Por tanto, partiendo de la premisa que no existe un tratamiento curativo, los objetivos generales de su tratamiento farmacológico serán (3,88) (Miravittles M. 2021, GOLD 2023):

- Reducir los síntomas de la enfermedad,
- Disminuir la frecuencia y gravedad de la exacerbaciones,
- Mejorar la calidad de vida y pronóstico
- Mejorar la supervivencia.

Recordando la definición de EPOC, puesto que se trata de una enfermedad caracterizada por una limitación del flujo aéreo persistente, que suele ser progresiva, y que se asocia con una reacción inflamatoria crónica de las vías aéreas y del pulmón en respuesta a la exposición a partículas nocivas y gases (1) (GOLD. 2021), parece lógico que el pilar del tratamiento sean los fármacos inhalados broncodilatadores (BD) en mono o terapia doble, a los que se les podrá asociar fármacos antiinflamatorios, como los corticoides inhalados (CI) en función de una serie de criterios como ahora veremos.

2.8.1 Broncodilatadores inhalados

Paradójicamente pese a que la EPOC se define como una limitación al flujo aéreo con carácter escasamente reversible, la mayor parte del tratamiento farmacológico va dirigido a intentar dilatar los bronquios que se encuentran obstruidos por la inflamación, el edema y el broncoespasmo.

Estos fármacos actúan relajando el tono de la musculatura lisa de la vía aérea produciendo broncodilatación lo que se traducirá en una mejoría en la limitación al flujo espiratorio sin cambios en la presión de retroceso elástico del pulmón.

Según su mecanismo de acción los fármacos broncodilatadores (BD) se clasifican en beta₂-agonistas o antimuscarínicos y en función de su duración de acción en broncodilatadores de acción corta (BDCD) o de acción prolongada (BDLD). Los acrónimos que hacen referencia a cada uno los tipos de BD por su nombre en inglés son:

- SABA: beta₂-agonistas de acción corta (*short acting beta agonist*)
- SAMA: antimuscarínico de acción corta (*short acting muscarinic antagonist*)
- LABA: beta₂-agonistas de acción prolongada (*long acting beta agonist*)
- LAMA: antimuscarínico de acción prolongada (*long acting muscarinic antagonist*)

Los BDL D mejoran la disnea, la tolerancia al esfuerzo, la calidad de vida y disminuyen la frecuencia y la gravedad de las exacerbaciones (94,97,98) (Tashkin DP 2008, Puhan MA 2009, Anzueto A 2018), y los BDCD son eficaces en el control rápido de los síntomas.

Los principales fármacos BD inhalados comercializados en España y sus combinaciones en un mismo dispositivo se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Clasificación de los BD inhalados para la EPOC

	Principio activo	Presentación	Dosis recomendada
Beta-2 adrenérgicos	Salbutamol	ICP: 100 µg/inh	200 µg/4-6 h
	Terbutalina	Turbuhaler®: 500 mg/inh	500 µg/6 h
	Salmeterol	ICP: 25 µg/inh Accuhaler®: 50 µg/inh	50 µg/12 h
	Formoterol	ICP: 12 µg/inh Turbuhaler®: 9 µg/inh Aerolizer®: 12 µg/inh	12 µg/12 h
	Indacaterol	Breezhaler®: 150 µg/inh Breezhaler®: 300 µg/inh	150 µg/24 h
Anticolinérgicos	Olodaterol	Respimat®: 2,5 µg/inh	5 µg/24 h
	Bromuro de ipratropio	ICP: 20 µg/inh	20-40 µg/6-8 h
	Bromuro de tiotropio	Handihaler®: 18 µg/inh Respimat®: 2,5 µg/inh	18 µg/24 h 5 µg/24 h
	Acidinio	Genuair®: 340 µg/inh	340 µg/12 h
	Glicopirronio	Breezhaler®: 50 µg/inh	50 µg/24 h
LABA/LAMA	Umeclidinio	Ellipta®: 62,5 µg/inh	62,5 µg/24 h
	Indacaterol/glicopirronio	Breezhaler®: 110/50 µg/inh	110/50 µg/24 h
	Acidinio/formoterol	Genuair®: 340/12 µg/inh	340/12 µg/12 h
	Umeclidinio/vilanterol	Ellipta®: 62,5/25 mg/inh	62,5/25 mg/24 h
	Tiotropio/olodaterol	Respimat®: 2,5/2,5 µg/inh	5/5 µg/24 h

Presentación y dosis recomendada. ICP: inhalador en cartucho presurizado. Tabla tomada de la referencia 3

2.8.1.1 Broncodilatadores inhalados de acción corta (BDCD)

Estos fármacos añadidos al tratamiento de base con BDL, son de elección para el tratamiento a demanda de los síntomas sea cual sea el nivel de gravedad de la enfermedad. (1,4) (GOLD. 2021; Miravittles M. 2017). Su inicio de acción se produce en los primeros 15-20 minutos y su acción se prolonga alrededor de 4-6 horas tras su administración.

- **Beta₂-agonistas:** su principal acción es la relajación de la musculatura lisa de las vías aéreas estimulando el receptor β₂ adrenérgico que activará la adenilato ciclasa del músculo liso aumentando la concentración de monofosfato de adenosina cíclico (AMP cíclico) intracelular y consecuentemente producirá broncodilatación. El salbutamol y la terbutalina son sus principales representantes.
- **Antimuscarínicos:** el bromuro de ipatropio es un antagonista muscarínico no selectivo que por tanto bloquea los receptores muscarínicos M₁, M₂ y M₃ y ejerce su efecto broncodilatador al bloquear el efecto de la acetilcolina (ACh) en los receptores M₃ expresados en la musculatura lisa de la vía aérea. Sin embargo, como se muestra en la figura 13, los receptores M₂ presinápticos son autorreceptores y controlan la liberación excesiva de acetilcolina, por tanto su bloqueo por antagonistas muscarínicos no selectivos

como el bromuro de ipratropio puede producir que la mayor liberación de acetilcolina no controlada sobrepase parte del bloqueo de los receptores M₃. (61) (Barnes PJ. 1993). Este hecho ha originado la necesidad de utilizar antagonistas muscarínicos que bloqueen solo los receptores M₃, o los M₁ y M₃ y de fármacos con una acción más prolongada para poder administrarlos en una o dos dosis diarias.

2.8.1.2 Broncodilatadores inhalados de acción prolongada (BDLD)

Estos fármacos son el pilar del tratamiento del paciente EPOC en fase estable y son el primer escalón terapéutico recomendado en todas las guías (1,4) (GOLD. 2021; Miravittles M. 2017) para los pacientes sintomáticos porque:

- Mejoran los síntomas: al reducir la hiperinsuflación dinámica en reposo y durante el esfuerzo, mejoran la capacidad inspiratoria, la disnea y la tolerancia al esfuerzo. Aunque la magnitud de estos cambios no son fáciles de predecir con la medición del FEV₁ en reposo ni se acompañan de una mejoría significativa del grado de obstrucción (99,100) (Calverley P 2004, Kew KM 2013)
- Mejoran la función cardiaca también al disminuir la hiperinsuflación, efecto que podría justificar la disminución de la mortalidad observada en los grandes ensayos clínicos con BDLD en pacientes EPOC (101) (Celli B. 2009).
- Reducen el número de exacerbaciones: con relación a la prevención de agudizaciones, el tiotropio (LAMA con mayor tiempo en el mercado) ha demostrado ser más eficaz que salmeterol (LABA) o indacaterol (LABA) (102,103) (Vogelmeier C 2011, Decramer M. 2013). Los resultados del ensayo clínico UPLIFT (94) demostraron también una reducción del riesgo de exacerbaciones, hospitalización e insuficiencia respiratoria con tiotropio frente al tratamiento habitual durante 4 años. Por este motivo y en base a estos resultados es de primera elección un LAMA sobre un LABA cuando se indica en monoterapia (3) (Miravittles M. 2021).

2.8.1.2.1 Beta₂-agonistas de acción prolongada (LABA)

Los LABA disponibles en España son los clásicos salmeterol y formoterol (ambos de administración cada 12 horas; además el formoterol tiene la peculiaridad de un rápido inicio

de acción, tan rápido como salbutamol) y los nuevos LABA de mayor duración de acción lo que permite su administración cada 24h: indacaterol, olodaterol y vilanterol.

Salmeterol y formoterol producen una mejoría del FEV₁ y de los volúmenes pulmonares, de la disnea, del estado de salud y disminuyen el número de exacerbaciones (100) (Kew KM 2013). Indacaterol mejora también la disnea, la calidad de vida y reduce el número de exacerbaciones (104,105) (Han J 2013, Geake JB 2015). Los LABA más recientemente incorporados al mercado (olodaterol y vilanterol) también han demostrado mejorar los síntomas y la función pulmonar (106,107) (Koch A 2014, Kempford R 2013). Pero ninguno de ellos ha conseguido modificar la tasa de declive de la función pulmonar ni la mortalidad de los pacientes con EPOC.

Además de la broncodilatación prolongada, los LABA ejercen otros efectos adicionales que podrían ser de relevancia clínica en la EPOC. Por ejemplo, parte del beneficio sintomático de estos fármacos podría estar mediado por la reducción de la hiperinsuflación dinámica y por tanto de la disnea. Di Marco *et al* (108) (Di Marco F. 2003) documentaron que formoterol producía un mayor incremento agudo de la capacidad inspiratoria que salbutamol, salmeterol y bromuro de oxitropio (agente antimuscarínico) y que este aumento de la capacidad inspiratoria está estrechamente relacionado con la mejoría de sensación disneica en reposo.

Los LABA además pueden incrementar el nivel de AMPc en los neutrófilos inhibiendo así su adhesión, acumulación y activación, e induciendo su apoptosis, cuyo resultado final es una posible reducción del número y del estado de activación de estas células inflamatorias en el tejido y en la luz de las vías aéreas. (109,110) (Johnson M 2001, Johnson M 2002)

2.8.1.2.2 Antimuscarínicos de acción prolongada (LAMA)

Los antimuscarínicos han sido considerados tradicionalmente el tratamiento broncodilatador de elección en la EPOC. Los avances en el estudio de los receptores muscarínicos de la vía aérea han llevado al desarrollo de fármacos con acción más específica y prolongada. El bromuro de tiotropio (primer LAMA comercializado) es un anticolinérgico de acción específica M3 (con una semivida de 35h), que presenta una disociación muy rápida de los receptores M2 (64) (Barnes PJ. 1995), lo que se traduce en una acción broncodilatadora prolongada que

permite una única administración diaria, facilitando el cumplimiento terapéutico y un mejor control sintomático durante todo el día, incluyendo el descanso nocturno. El resto de LAMA comercializados (bromuro de aclidinio, glicopirronio y umeclidinio) también son antagonistas muscarínicos específicos M3 con una rápida disociación de M2. Salvo el bromuro de aclidinio que se administra cada 12h el resto de LAMA tienen una prolongada vida media lo que permite su administración una vez al día. A modo de resumen los hallazgos más significativos de los múltiples estudios controlados y comparativos que se han publicado con los LAMA, pero sobre todo con tiotropio (porque es el que más tiempo lleva en el mercado) y que avalan su papel en la EPOC son: mejoran la disnea y la tolerancia al esfuerzo al disminuir la hiperinsuflación dinámica, mejoran el FEV₁ y FVC paralelamente a la mejora en la capacidad inspiratoria, mejoran la calidad de vida y disminuyen el número de exacerbaciones y hospitalizaciones. (94,101,102,111,112) (Tashkin D 2004, Celli B 2009, Vogelmeier C 2011, Melani AS 2015, Jones PW 2012).

2.8.1.2.2.1 Bromuro de aclidinio y su potencial efecto antiinflamatorio

El bromuro de aclidinio o aclidinio (Figura 20) es un antimuscarínico inhalado de efecto prolongado con una selectividad cinética sobre el receptor M3 y una rápida disociación de M2 con una vida media que permite su administración cada 12h.

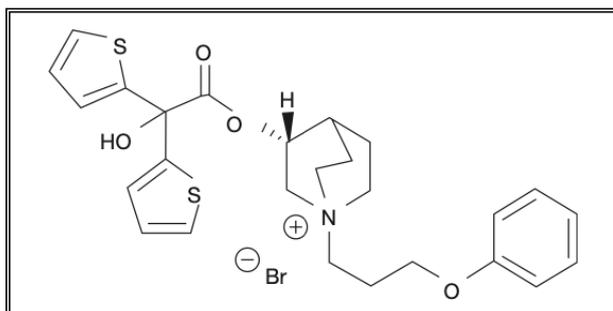


Figura 20. Estructura química del bromuro de aclidinio

En estudios *in vitro* aclidinio manifestó afinidades similares a las de tiotropio por los cinco subtipos de receptores muscarínicos humanos analizados (Tabla 4) sin selectividad por un receptor muscarínico concreto, pero ambos manifestaron un tiempo de permanencia en el receptor M3 muy prolongada (lo que le confiere una selectividad cinética por este receptor) y más breve en M2, siendo el tiempo de permanencia de aclidinio en M3 aproximadamente la mitad que el de tiotropio (29h frente a 62h). (113) (Gavaldà A. 2009)

Tabla 4. Farmacología comparativa de aclidinio y tiotropio.

Parámetro	ACL	TTP
Estudios de unión a receptores <i>in vitro</i>^a		
Afinidad de unión (K_i ; nmol/l)		
M ₁	0,10	0,13
M ₂	0,14	0,13
M ₃	0,14	0,19
M ₄	0,21	0,30
M ₅	0,16	0,18
Tiempo de permanencia (h)		
M ₂	4,69	15,11
M ₃	29,24	62,19
Estudios con broncoprotectores <i>in vivo</i>^b		
Inicio del efecto (h)	0,5	1,3
Duración de acción (h)	29	64
<p>a Con receptores muscarínicos recombinantes humanos.</p> <p>b Con el modelo de broncoconstricción inducida por acetilcolina en cobayas anestesiadas; broncoprotección se refiere a la inhibición de la broncoconstricción inducida por acetilcolina.</p> <p>ACL = aclidinio; K_i = constante de inhibición; TTP = tiotropio.</p>		

Figura adaptada de la referencia 113

Su eficacia y seguridad como fármaco broncodilatador que avala su indicación en la EPOC se han publicado en varios ensayos clínicos cuyos resultados fundamentales son que mejora el FEV₁, la disnea y la calidad de vida en EPOC moderado-grave comparado con placebo, además reduce de forma significativa la incidencia de síntomas nocturnos, la necesidad de tratamiento de rescate y la aparición de exacerbaciones en comparación con placebo. (112,114,115) (Jones PW 2012, Kerwin EM 2012, Wise RA. 2019). Aclidinio inhalado presenta una escasa biodisponibilidad sistémica y su perfil de acontecimientos adversos es similar a placebo con una baja incidencia de eventos adversos cardiovasculares y anticolinérgicos (116) (Gelb A. 2013). Comparado con otros LAMA (tiotropio y glicopirronio) los resultados de estudios preclínicos *in vitro* sugieren que el aclidinio muestra mayor seguridad y menos efectos secundarios sistémicos debido a su rápida hidrólisis plasmática en sus metabolitos inactivos (vida media de hidrólisis en plasma de 0.04h) (117) (Gavaldà A. 2014).

Dado que la disfunción del sistema colinérgico no neuronal parece estar implicada también en la fisiopatología de la EPOC (62) (Gosens R. 2006) como se ha mencionado anteriormente, el potencial efecto antiinflamatorio y anti-remodelado de los fármacos antimuscarínicos estudiado en modelos preclínicos podría añadir valor a su establecido efecto broncodilatador para el tratamiento de la EPOC.

En este sentido, estudios *in vitro* con aclidinio sobre su potencial efecto anti-remodelado han observado que reduce la transformación de los fibroblastos pulmonares humanos en miofibroblastos tras la exposición a carbacol (agonista colinérgico), a factor de crecimiento transformante beta o a extracto de humo de cigarrillo. Asimismo, también suprime la sobreexpresión inducida por carbacol de MUC5AC (el principal componente macromolecular del moco respiratorio) en tejido bronquial humano *in vitro* y la sobreexpresión inducida por carbacol y humo de cigarrillos en cultivos de células del epitelio respiratorio humano (82,118) (Cortijo J. 2011, Milara J. 2012).

Más adelante, en el apartado sobre efectos antiinflamatorios de los fármacos antimuscarínicos se desarrollará la evidencia publicada hasta la fecha del aclidinio a este respecto .

2.8.2 Otros broncodilatadores: Teofilinas

Las teofilinas son fármacos broncodilatadores débiles pero que pueden presentar efectos aditivos a los broncodilatadores habituales. Una revisión de los estudios disponibles controlados con placebo llevada a cabo por la Cochrane Library ha mostrado su eficacia como fármaco broncodilatador, aunque depende de las dosis empleadas (119) (Ram F. 2002). Se ha descrito que las teofilinas pueden tener un efecto positivo sobre la fuerza del diafragma, producir un aumento del rendimiento de los músculos respiratorios, una disminución del atrapamiento aéreo y una mejoría del aclaramiento mucociliar. La dosis habitual es de 200-300 mg/12h oral en comprimidos de liberación sostenida pero su toxicidad es dosis-dependiente y sus efectos adversos son importantes (náuseas, diarrea, cefalea, irritabilidad, arritmias, convulsiones, hipopotasemia) lo que obliga a monitorizar sus concentraciones plasmáticas (120) (Ram F. 2005). Por todo ello, dada su limitada eficacia clínica y su estrecho margen terapéutico en la actualidad son consideradas fármacos de tercera línea en el tratamiento de la EPOC (1,4) (GOLD 2021, Miravittles M 2017).

2.8.3 Fármacos Antiinflamatorios

Hasta la fecha la prevención de las exacerbaciones es el principal criterio clínicamente relevante para valorar la eficacia de fármacos antiinflamatorios en el tratamiento del EPOC estable (1) (GOLD 2021).

Sin embargo, la demostración de un sustrato inflamatorio en la patogenia de la EPOC ha despertado interés por la utilización de fármacos que puedan contrarrestar los potenciales efectos nocivos de la inflamación desencadenada por el humo del tabaco en estos pacientes.

2.8.3.1 Corticoides inhalados (CI)

La gran eficacia de los CI en el tratamiento de asma hizo que se probara su utilidad en la EPOC, pese a la escasa evidencia científica acerca de que puedan ejercer alguna acción terapéutica antiinflamatoria sobre las células más directamente implicadas en la patogenia de esta enfermedad, los neutrófilos. Además la evidencia existente de los estudios *in vitro* sugiere que la inflamación neutrofílica de la EPOC es corticorresistente (24,121) (Boardman C. 2014, Barnes PJ. 2013) como se desarrollará más adelante

Por tanto su principal indicación en los pacientes EPOC será la prevención de exacerbaciones, y como el principal predictor para sufrir futuras exacerbaciones es la historia previa de las mismas (122) (Halpin DMG. 2020), los pacientes con frecuentes exacerbaciones, a pesar de tratamiento broncodilatador óptimo, serán sus principales candidatos, sin embargo no todos los pacientes responden a CI y además los CI a largo plazo asocian importantes y frecuentes efectos secundarios (candidiasis oral, disfonía, neumonías) (123) (Yang I. 2012). Por lo tanto, el uso de CI para la prevención de las exacerbaciones en la EPOC no debe ser un tratamiento “por defecto” y debe guiarse por criterios basados en la evidencia (124) (Agustí A. 2018).

Estudios recientes han mostrado que el recuento de eosinófilos en sangre es un biomarcador fácilmente disponible en la EPOC y que predice la magnitud de respuesta a los CI (siempre añadidos al tratamiento broncodilatador de mantenimiento) en términos de reducción de la tasa de exacerbaciones, sobre todo en aquellos con unas cifras > 300 eosinófilos/mm³, disminuyendo la respuesta conforme desciende la eosinofilia periférica (125,126) (Bafadhel M. 2018, Pascoe S. 2019).

Basándose en todas estas evidencias la última actualización de la guía española de manejo de la EPOC (GesEPOC) (3) (Miravittles M. 2021) restringe el uso de CI, y siempre asociados a LABA o LAMA-LABA, nunca en monoterapia, únicamente a los pacientes de alto riesgo con fenotipo exacerbador (dos o más exacerbaciones al año tratadas de forma ambulatoria o al menos una exacerbación al año que haya precisado ingreso hospitalario) que asocien eosinofilia periférica (> 300 eosinófilos/ mm^3) en fase clínica estable, ya que son los pacientes que mayor respuesta clínica experimentan a los CI (127,128) (Pavord ID 2016, Suissa S. 2018), o bien cuando coexistan los diagnósticos de EPOC y asma, independientemente del nivel de gravedad, porque se ha demostrado que su uso asociado a LABA produce una disminución significativa del número de agudizaciones y una mejora de la calidad de vida, si bien no han demostrado un efecto beneficioso sobre la mortalidad (95,129,130) (Peter MA. 2007, Nannini LJ 2013, Vestbo J 2016).

En este sentido la Global Initiative for Obstructive Lung Disease (1) (GOLD 2021) y su reciente actualización (88) (GOLD 2023) es menos restrictiva que la Guía Española de la EPOC (GesEPOC 2021) (3) (Miravittles M. 2021) y recomienda considerar su uso también (además de en las mismas situaciones que la GesEPOC) en pacientes con al menos una exacerbación moderada al año a pesar de un tratamiento broncodilatador adecuado que asocien concentraciones de eosinófilos en sangre entre $100 - 300$ células/ mm^3 , mientras que la GesEPOC en estos pacientes recomienda que se tengan en cuenta aquellos factores que se asocian con una mayor efectividad y seguridad de los CI, como son: agudizaciones más frecuentes y graves, la ausencia de tabaquismo activo y sin neumonías previas (131) (Stolz S. 2020).

Las principales combinaciones de LABA/CI disponibles en el mercado se muestran en tabla 5.

Tabla 5. Presentación, dispositivos y dosis recomendada de combinaciones LABA/CI

Principio activo	Presentación	Dosis recomendada
<i>LABA/CI</i> Beclometasona/formoterol	NH: 100/6 $\mu\text{g}/\text{inh}$ ICP Modulite® 100/6 $\mu\text{g}/\text{inh}$	200/12 $\mu\text{g}/12$ h
Formoterol/budesonida	TH: 4,5/160 y 9/320 $\mu\text{g}/\text{inh}$ SM: 4,5/160 y 9/320 $\mu\text{g}/\text{inh}$ EH: 4,5/160 y 9/320 $\mu\text{g}/\text{inh}$	9/320 $\mu\text{g}/12$ h
Salmeterol/propionato de fluticasona	AH: 50/500 $\mu\text{g}/\text{inh}$ FP : 50/500 $\mu\text{g}/\text{inh}$	50/500 $\mu\text{g}/12$ h
Furoato de fluticasona/vilanterol	EL: 100/25 $\mu\text{g}/\text{inh}$ alación	100/25 $\mu\text{g}/24$ h

NH: Nexthaler®, ICP: inhalador en cartucho presurizado, TH: Turbuhaler®, SM: Spiromax®, EH: Easyhaler®, AH: Accuhaler®, FP: Forspiro®, EL: Ellipta®. Tabla modificada de la referencia 3

2.8.3.2 Inhibidores de la fosfodiesterasa-4 (PDE4)

La principal acción antiinflamatoria de los inhibidores de PDE4 es inhibir la cascada intracelular dependiente del AMPc. El roflumilast, su principal representante, de administración oral una vez al día (500 µg/d) ha demostrado prevenir las exacerbaciones en pacientes con EPOC grave y muy grave que presentan tos y expectoración crónica y que además sufren frecuentes exacerbaciones. Este efecto se mantiene cuando se añade roflumilast al tratamiento de mantenimiento con un BDL, ya sea LABA o LAMA o incluso a la triple terapia (LABA/LAMA/CI) (132,133) (Fabbri LM. 2009, Martínez FJ. 2015).

Tanto el roflumilast como los CI son fármacos antiinflamatorios, aunque sus modos de acción son diferentes. De hecho, la inflamación neutrofílica típica de la EPOC es característicamente resistente a altas dosis de corticosteroides orales o inhalados como ya se ha comentado. Por contra, en estudios *in vitro* e *in vivo*, roflumilast ha mostrado efectos sobre los neutrófilos y también sobre los macrófagos y los linfocitos CD8+ (134) (Milara J. 2014). Todo ello indica que sus acciones son claramente distintas. Los resultados obtenidos en ensayos clínicos con la administración concomitante de CI y roflumilast indican que esta asociación es segura y que roflumilast mantiene su eficacia clínica (135) (Rennard SI. 2011). Sin embargo el uso de este fármaco antiinflamatorio se ha visto muy limitado por sus frecuentes efectos adversos que han dado lugar a una alta tasa de abandonos en los ensayos clínicos, aunque suelen aparecer al inicio del tratamiento, son reversibles y disminuyen con el tiempo. Los más frecuentes son diarrea, náusea, disminución de apetito, pérdida de peso, dolor abdominal, alteraciones del sueño y cefalea (88) (GOLD 2023).

2.8.4 Recomendaciones de las Guías de manejo de la EPOC

Como ya se ha comentado en el apartado de clasificación de gravedad, una vez confirmado el diagnóstico de EPOC y clasificado por gravedad en función del FEV₁ post-broncodilatador (Tabla 2), se valorará el nivel de riesgo (Figuras 18 y 19), entendiendo como tal la probabilidad de que el paciente pueda presentar agudizaciones, progresión de enfermedad, futuras complicaciones, mayor consumo de recursos sanitarios o mayor mortalidad, ya que en función

de esta estratificación seleccionaremos el tratamiento farmacológico en fase estable más adecuado para cada paciente. (1,3,88) (GOLD 2021, Miravittles M. 2021, GOLD 2023).

Así en la última actualización de la GesEPOC del 2021 (3) (Miravittles M. 2021) se hacen las siguientes recomendaciones:

- Pacientes de riesgo bajo: monoterapia con LAMA. Si en el seguimiento persisten sintomáticos a pesar del LAMA, progresar a doble terapia broncodilatadora LAMA-LABA. Esta asociación ha demostrado frente a la monoterapia un beneficio funcional, mejoría de los síntomas, de la calidad de vida y de la necesidad de tratamiento de rescate (136,137) (Calzetta L 2016, Nici L 2020).
- Pacientes de alto riesgo:
 - No agudizador: doble terapia con LAMA-LABA
 - Agudizador SIN eosinofilia en sangre periférica: LAMA-LABA de primera elección. En estos pacientes la eficacia de los CI como hemos visto es menor, pero en aquellos casos con eosinófilos entre 100-300/mm³ y que además asocien otros factores relacionados con una mayor seguridad y eficacia de los CI como son:
 - agudizaciones más frecuentes y graves
 - agudizaciones previas que responder a corticoides orales
 - no fumadores activos y
 - sin antecedentes de neumonías (131) (Stolz S. 2020),

recomiendan empezar con una combinación LABA/CI. En ambos casos si se siguen repitiendo las exacerbaciones se recomienda escalar a la triple terapia (LABA/LAMA/CI).

- Agudizador CON eosinofilia (> 300 eosinófilos/mm³) en sangre periférica: asociación LABA/CI como primera opción y recomiendan como siguiente escalón terapéutico la triple terapia (LABA/LAMA/CI). Estudios recientes sobre triple terapia fija en estos pacientes han demostrado mayor eficacia en comparación con la combinación LABA/CI (mejoría de la función pulmonar, de los síntomas y una mayor reducción de las agudizaciones) (138,139) (Lipson DA 2018, Rabe KF 2020).

La última actualización de la GOLD 2023 (88) clasifica a los pacientes en 3 categorías, A, B y E, según la frecuencia de agudizaciones y el nivel de síntomas (Figura 19) y prescinde de la función pulmonar para la decisión de tratamiento. No parece pertinente describir las opciones de tratamiento para cada categoría porque en realidad no son tan distintas a las recomendadas por la GesEPOC, si no que se trata de 2 enfoques diferentes de organizar las posibles opciones de tratamiento para finalmente hacer prácticamente las mismas recomendaciones.

En resumen, las recomendaciones de tratamiento de la EPOC en fase estable podrían resumirse en estos 3 principios básicos:

- Optimizar el tratamiento broncodilatador para paliar los síntomas y reducir el riesgo de exacerbaciones;
- añadir CI si a pesar de la broncodilatación siguen existiendo exacerbaciones y el paciente tiene eosinofilia periférica (> 300 eosinófilos/ mm^3), y por último;
- si a pesar de un tratamiento inhalado óptimo persisten los síntomas o las exacerbaciones, evaluar los rasgos tratables (disnea, bronquitis crónica, enfisema grave, déficit de alfa1 antitripsina, insuficiencia respiratoria, bronquiectasias, infección bronquial crónica, hipertensión pulmonar precapilar, caquexia) y la necesidad de tratamiento de segunda línea según cada caso (1,3) (GOLD 2021, Miravittles M. 2021).

2.9 Efectos anti-inflamatorios de fármacos antimuscarínicos

Una reciente revisión sistemática de la literatura publicada hasta la fecha sobre el impacto del tratamiento con LAMA en la inflamación de la vía aérea (140) (Calzetta L. 2021) que incluye estudios *in vitro*, modelos animales y estudios clínicos en pacientes EPOC, analiza los resultados de un total de 49 estudios (29 estudios realizados en animales de investigación, 11 *in vitro*, 6 estudios clínicos en pacientes EPOC y 3 estudios *in vitro* e *in vivo* con modelos animales) y concluye que los LAMA podrían ejercer un significativo efecto anti-inflamatorio en la práctica clínica tras los resultados obtenidos en los estudios pre-clínicos.

A. TIOTROPIO

De todos los LAMA comercializados, del que más evidencia existe sobre su efecto anti-inflamatorio en la vía aérea es el tiotropio (34 de los 49 estudios incluidos en esta revisión están realizados con tiotropio). Sus principales efectos anti-inflamatorios descritos son:

En estudios *in vitro*:

- Reduce la expresión de IL-8 y mejora la expresión y actividad de la HDAC2 en células bronquiales (141) (Anzalone G. 2016) tras estimulación con IL-17A.
- Reduce la expresión de IL-8, IL-6 y IL-1 β en células epiteliales traqueales de humanos estimuladas por rinovirus (142) (Yamaya M. 2012).
- Reduce la migración de neutrófilos inducida por macrófagos alveolares de pacientes EPOC estimulados por LPS, mediante el bloqueo del receptor M3 en los macrófagos estimulados y además reduce también la producción de especies reactivas de oxígeno provocada por LPS (143) (Vacca G. 2011).

En estudios con modelos animales:

- Reduce la sobre-expresión de IL-1 β , IL-6, IFN- γ y TNF- α en tejido pulmonar y el número total de células inflamatorias, neutrófilos y macrófagos en lavado broncoalveolar de ratones expuestos al humo de cigarrillo +/- infectados por virus influenza H1N1 (144,145) (Bucher H. 2016, Wollin L. 2010).
- En gatos domésticos expuestos al humo de cigarrillo, la inhalación de tiotropio reduce en lavado broncoalveolar la sobre-expresión de IL-6, IL-8, MCP-1 y TNF- α y el número total de células inflamatorias, macrófagos y eosinófilos pero no de neutrófilos ni linfocitos (146) (Kolahian S. 2014).

En estudios clínicos con pacientes EPOC: A pesar de los prometedores resultados preclínicos comentados, los 6 estudios clínicos publicados (147–152) (Santus P. 2012, Ozol D. 2014, Holownia A. 2010, Perng D-W. 2009, Lin Y-H. 2017, Powrie DJ. 2007) que analizan el efecto anti-inflamatorio de tiotropio *in vivo* en pacientes EPOC son todos no randomizados y clasificados como de baja o media calidad metodológica (según la escala de Jadad) como para sacar conclusiones de relevancia clínica de los resultados obtenidos. Por tanto siguen siendo necesarios ensayos clínicos aleatorizados expresamente diseñados para analizar el papel antiinflamatorio de los LAMA para poder posicionarlos como tal en la práctica clínica.

B. ACLIDINIO

En lo que respecta al papel antiinflamatorio del aclidinio en pacientes EPOC la literatura publicada hasta la fecha todavía es muy escasa.

In vitro: solo hay un estudio realizado *in vitro* sobre células epiteliales bronquiales estimuladas con humo de cigarrillo en el que no se demuestra que el aclidinio consiga contrarrestar la sobre-expresión del IL-8 ni mejorar la expresión nuclear reducida de HDAC2 (153) (Ferraro M. 2019).

En modelos animales:

- En ratones expuestos a *Aspergillus fumigatus*, la inhalación de aclidinio reduce la eosinofilia en lavado broncoalveolar, pero no modifica el número de macrófagos, linfocitos ni neutrófilos y tampoco modula la sobre-expresión de IL-4, IL-6, IL-13 ni TNF (154) (Damera G. 2010)
- En cobayas (*Guinea pigs*) expuestos al humo de cigarrillo, la inhalación de aclidinio atenúa la infiltración neutrofílica de los septos alveolares sin diferencias en el número de macrófagos ni eosinófilos (155) (Domínguez-Fandos D. 2014).

Por todo ello, dado que hasta la fecha no hay datos que describan el efecto del bromuro de aclidinio sobre los patrones inflamatorios descritos en la EPOC, nos plantemos llevar a cabo el presente estudio.

2.10 Corticorresistencia en la EPOC

A pesar de que la inflamación neutrofílica es la piedra angular de la progresión del daño estructural en la vía aérea de los pacientes EPOC, cuatro grandes ensayos clínicos de 3 años de duración han demostrado el escaso efecto de los corticoesteroides inhalados sobre la pérdida de función pulmonar en el EPOC, aunque sí que se ha visto que consiguen una reducción de las exacerbaciones (22) (Barnes PJ. 2004).

Ni los corticoesteroides orales ni los inhalados suprimen la inflamación en la vía aérea de pacientes EPOC y los macrófagos alveolares parecen ser corticorresistentes en estos

pacientes. Además los glucocorticoides prolongan la supervivencia de los neutrófilos, lo que contribuye a la inflamación neutrofílica característica de la EPOC. A la vista de estos hallazgos se ha sugerido que la inflamación neutrofílica que caracteriza a la EPOC, a diferencia de la inflamación eosinofílica característica del asma, es resistente a los glucocorticoides (GC) (156) (Barnes PJ. 2013).

En este sentido tiene un gran interés científico y probablemente importantes implicaciones clínicas y terapéuticas conocer los mecanismos moleculares de actuación de los GC así como las posibles causas de la insensibilidad a los mismos.

2.10.1 Mecanismos antiinflamatorios de los corticoesteroides

Para poder entender los mecanismos de corticorresistencia es fundamental entender primero los mecanismos moleculares por los cuales los corticoesteroides ejercen su efecto antiinflamatorio. Este efecto antiinflamatorio lo ejercen activando la síntesis de genes antiinflamatorios (trans-activación), inhibiendo la expresión de genes pro-inflamatorios (trans-represión) o mediante efectos post-transcripcionales (Figura 21) (157) (Barnes PJ 2010).

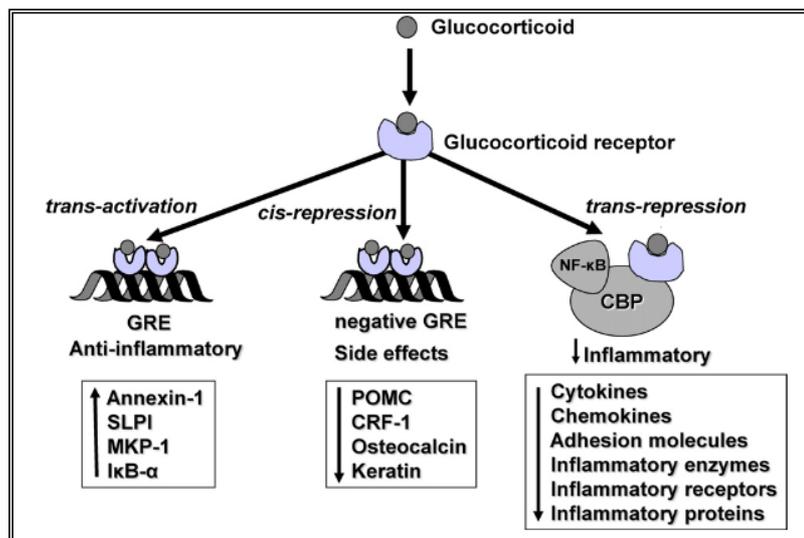


Figura 21. Los corticoesteroides regulan la expresión génica por diversas vías. Figura tomada de la referencia 157

2.10.1.1 Activación de la expresión de genes antiinflamatorios

Los corticoesteroides difunden a través de la membrana celular y se unen y activan al receptor de glucocorticoides (GR, isoforma GR α) en el citoplasma para que rápidamente éste sea translocado al núcleo, donde ejercerá sus efectos moleculares. Además del receptor GR α existe otra isoforma del receptor GR (isoforma GR β) que interactúa con el DNA pero no con los glucocorticoides, de manera que puede actuar como un inhibidor dominante de la acción de los esteroides (158) (Lewis-Tuffin LJ. 2006). Por tanto un aumento del receptor GR β en los pacientes EPOC puede ser uno de los mecanismos de cortico-resistencia (159) (Marwick JA. 2010) como luego se explicará.

Una vez el GR es translocado al núcleo se unirá al ADN por medio de su dominio central en forma de dímeros. La interacción de los dímeros GR-GC (receptor de glucocorticoide-glucocorticoide) con la doble hélice de ADN se realiza en la región denominada GRE (elementos de respuesta a los glucocorticoides), que junto con determinados coactivadores como el CBP (proteína de unión del CREB; CREB: proteína de unión del AMPc al elemento de respuesta), que tiene actividad de histona acetiltransferasa (HAT) intrínseca, provocará la acetilación de las histonas y la apertura de la cromatina, dando lugar a la inducción de la transcripción de genes que codifican proteínas antiinflamatorias como MKP-1 (proteín-quinasa activada por mitógeno fosfatasa 1), SILP (inhibidor de la leucoproteasa secretora), GILZ (cremallera de leucina inducida por glucocorticoides), I κ B- α (inhibidor NF- κ B) , CRISPLD2 (proteína secretora rica en cisteína que contiene el dominio LCCL 2), la anexina I y los que codifican a los receptores β 2-adrenérgicos (Figura 22) (157) (Barnes PJ 2010).

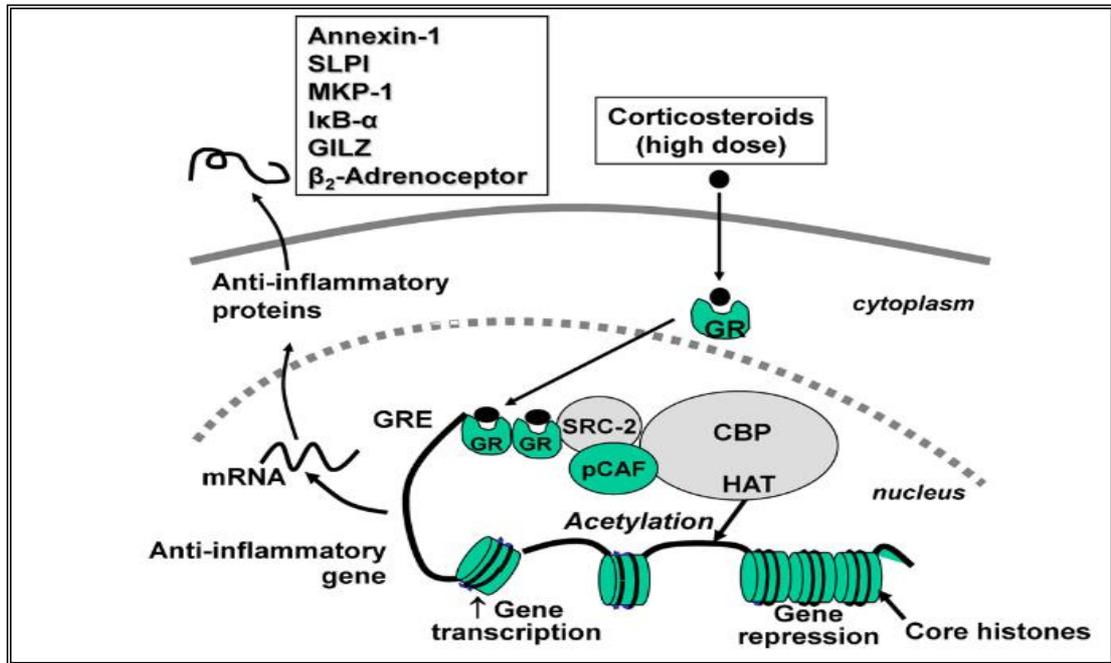


Figura 22. Activación de la expresión de genes antiinflamatorios por los corticosteroides. Los GR se unen a los receptores citoplasmáticos de glucocorticoides (GR) que se trasladan al núcleo donde se unen a los elementos de respuesta a los glucocorticoides (GRE) en la región promotora de genes sensibles a los esteroides y también directa o indirectamente a moléculas coactivadoras como la proteína de unión a CREB (CBP), el factor de activación p300 / CBP (pCAF) o coactivador 2 del receptor de esteroides (SRC-2), que tienen actividad intrínseca de histona acetiltransferasa (HAT), lo que provoca la acetilación de lisinas en la histona H4, lo que conduce a la activación de genes que codifican proteínas antiinflamatorias, como inhibidor de leucoproteasa secretora (SLPI), quinasa fosfatasa-1 activada por mitógenos (MKP-1), inhibidor de NF- κ B ($I\kappa B-\alpha$) y proteína de cremallera de leucina inducida por glucocorticoides (GILZ). Figura tomada de la referencia 157

2.10.1.2 Inhibición de la expresión de genes pro-inflamatorios

La acción principal de los glucocorticoides es desactivar múltiples genes inflamatorios activados que codifican citocinas, quimiocinas, moléculas de adhesión, enzimas inflamatorias y receptores participantes en la respuesta inflamatoria. Estos genes se activan en las vías respiratorias por factores de transcripción proinflamatorios, como el factor nuclear NF- κ B y la proteína activadora-1 (AP-1), que generalmente están activados en los sitios donde existe inflamación como en la vía aérea del EPOC, dando lugar a la activación de múltiples genes inflamatorios.

El complejo GR-GC consigue la trans-represión de estos genes inflamatorios al unirse en forma de monómero al complejo CBP-NF- κ B e inhibir a la HAT intrínseca y además reclutando HDAC-2 que de nuevo compactará al ADN reprimiendo la expresión de genes inflamatorios (Figura 21) (157) (Barnes PJ 2010).

Es decir, el GR-GC puede competir con los sitios de unión de otros factores de transcripción en la CBP (proteína de unión del CREB) o alternativamente activar moléculas correpressoras de la transcripción que tienen actividad HDAC. Ito *et al* (160) demostraron que los GC inhiben la actividad HAT de la fracción p65 del NF- κ B y que el GR-GC recluta HDAC2 para inhibir la acetilación de la histona H4 en las lisinas 8 y 12 inducida por IL-1b. En consecuencia, todo ello resulta en la deacetilación de las histonas nucleares, lo que modifica de nuevo la configuración de la cromatina haciendo que esta se compacte alrededor de las histonas, reduciendo el acceso de los factores de transcripción proinflamatorios (como el NF- κ B y el AP-1) a sus locus de unión en el ADN, produciendo finalmente, una represión de la transcripción inflamatoria (también denominada trans-represión). Es decir, los GC ejercerán su acción antiinflamatoria por un doble mecanismo, inhibiendo la acetilación de las histonas mediada por los factores transcripcionales con actividad intrínseca HAT y reclutando histonas desacetilasas a los sitios de transcripción. (Figura 23) (157) (Barnes PJ 2010).

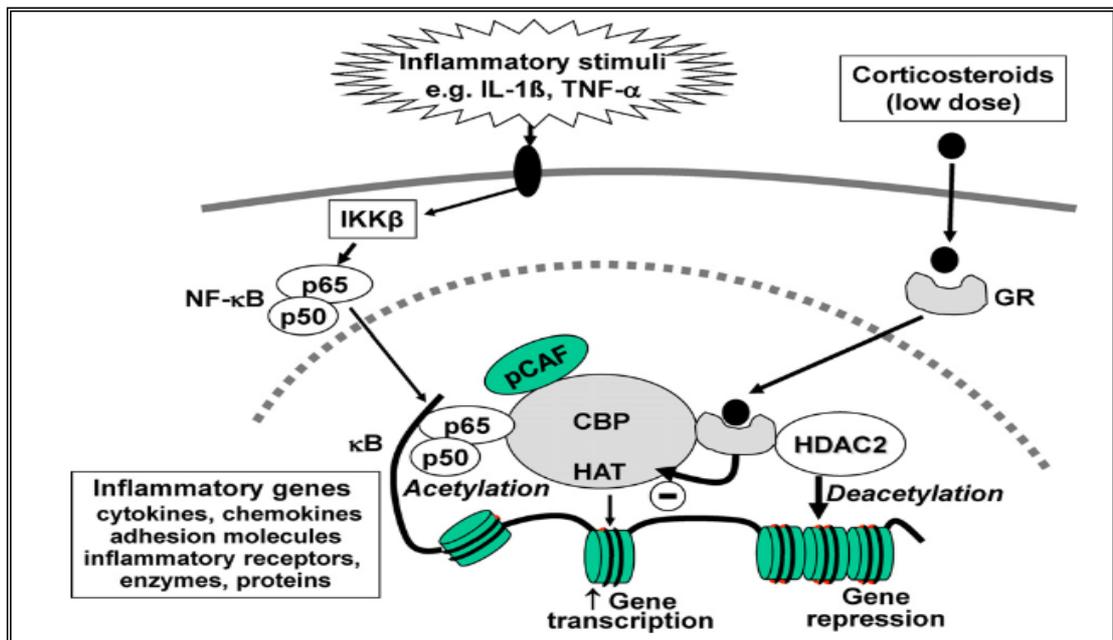


Figura 23. Inhibición de la expresión de genes inflamatorios por los corticoesteroides. Los genes inflamatorios se activan por estímulos inflamatorios, como la IL-1 β o el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), lo que provoca la activación de IKK β (inhibidor de la I- κ B quinasa- β), que activa el factor de transcripción factor nuclear κ B (NF- κ B). Un dímero de las proteínas p50 y p65 NF- κ B se transloca al núcleo y se une a sitios específicos de reconocimiento de κ B y también a coactivadores, como la proteína de unión a CREB (CBP) o el factor de activación de p300 / CBP (pCAF), que tienen actividad intrínseca de histona acetiltransferasa (HAT). Esto da como resultado la acetilación de la histona central H4, lo que provoca un aumento de la expresión de genes que codifican múltiples proteínas inflamatorias. Los receptores de glucocorticoides (GR) después de la activación por GC se trasladan al núcleo y se unen a estos coactivadores para inhibir la actividad de HAT directamente y además reclutar histona desacetilasa-2 (HDAC2), que invierte la acetilación de histonas y conduce a la supresión de estos genes inflamatorios activados. Figura tomada de la referencia 157

Otro de los importantes mecanismos por el cual los GC ejercen su efecto antiinflamatorio es a través de su potente efecto inhibitorio sobre las vías de señalización MAPK mediante la inducción de la síntesis de MKP-1 que inhibirá así la expresión de múltiples genes inflamatorios (Figura 24) (157) (Barnes PJ 2010), ya que la MKP-1 es la protein-quinasa encargada de controlar el proceso inflamatorio en la vía aérea mediante *feed-back* negativo sobre el resto de vías de señalización MAPKs pro-inflamatorias (ERK, JNK y p38 MAPK).

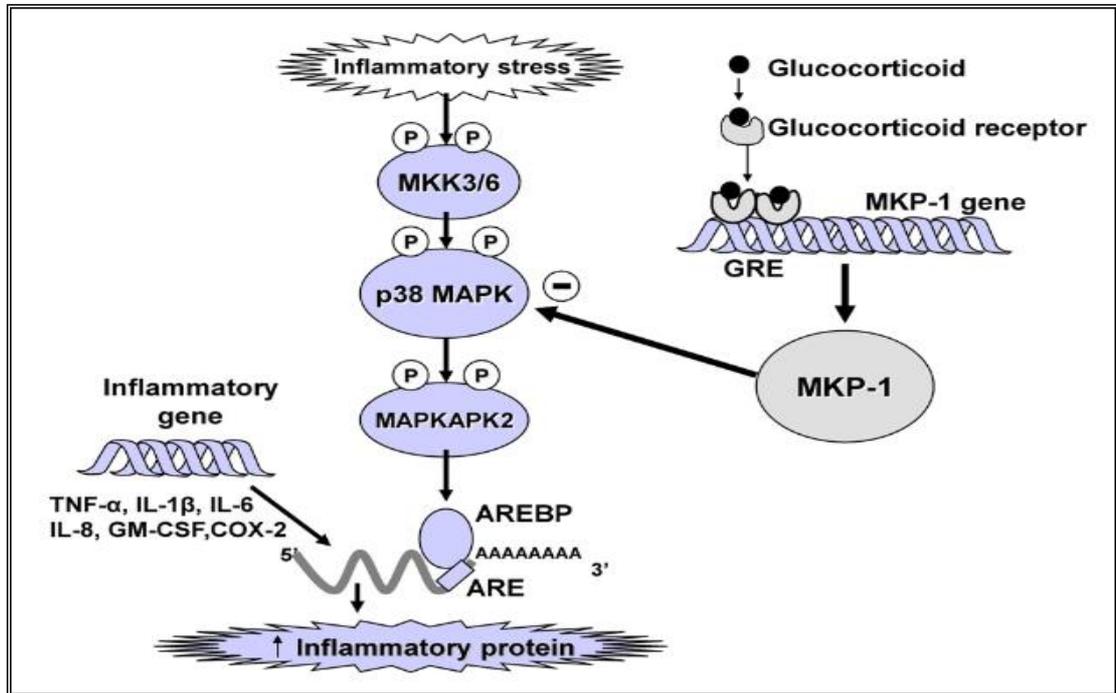


Figura 24. Inhibición de la p38-MAPK por los GC. p38 MAP quinasa (p38 MAPK) es activada por estrés inflamatorio a través de la activación de MAP quinasa quinasa (MKK)-3 y -6. La p38 MAPK activa mediante fosforilación a la MAP quinasa (MAPKAPK)-2, que desempeña un papel en la estabilización del ARN mensajero (ARNm) que codifica varias proteínas inflamatorias, como el TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) y ciclooxigenasa (COX)-2. Este ARNm se caracteriza por elementos ricos en AU (ARE) en la región 3' sin traducir, que hacen que el ARNm sea inestable y se degrade rápidamente. Las proteínas de unión a ARE (AREBP) estabilizan estas proteínas y pueden ser activadas (probablemente indirectamente) por MAPKAPK-2. Los corticosteroides inducen la expresión de MAP quinasa fosfatasa (MKP) -1, que inhibe la p38 y, por lo tanto, previene la transcripción de múltiples proteínas inflamatorias. Figura tomada de la referencia 157

2.10.2 Mecanismos moleculares de corticorresistencia en la EPOC

Aunque ya se han identificado diversos mecanismos moleculares que contribuyen al descenso del efecto antiinflamatorio de los glucocorticoides en los pacientes con EPOC, la prevalencia de los mismos sigue sin conocerse.

Los principales mecanismos de corticorresistencia descritos en diferentes enfermedades inflamatorias son los siguientes (156,157) (Barnes PJ 2013, Barnes PJ 2010), incluso se han observado heterogeneidad de mecanismos dentro de una misma enfermedad (Tabla 6):

- **Resistencia familiar a glucocorticoides:** es un síndrome muy raro de resistencia familiar a GC con herencia dominante y de expresión variable que obedece a una mutación del receptor GR. Solo hay una docena de pacientes descritos en la literatura, aunque también se ha descrito algún caso esporádico y son claramente diferentes de aquellos con enfermedades inflamatorias cortico-resistentes, e incluso en pacientes con asma corticorresistente a los que se realizó análisis mutacional del GR, no se demostró ninguna alteración en su estructura (161,162) (Lamberts SW. 2001, Lane SJ. 1994).

Tabla 6. Mecanismos moleculares de corticorresistencia en el EPOC

Resistencia familiar a glucocorticoides
Modificación de receptor GRα
↑ Fosforilación: ↓ translocación nuclear
↑ p38 MAPK causado por IL-2, IL-4, IL-13 o MIF
↑ JNK causado por citoquinas pro-inflamatorias
↑ ERK causado por superantígenos microbianos
↓ MKP-1
Nitrosilación: por aumento de NO al aumentar iNOS
Ubiquitinación: ↑ degradación por proteosoma
↑ expresión del receptor GRβ
Activación de los factores de transcripción proinflamatorios
AP-1, JNK
Acetilación de la histona defectuosa
↓ acetilación de residuos de lisina específicos (K5 y K16) en la histona-4
↓ HDAC-2:
↑ estrés oxidativo
↑ activación PI3K δ

Tomada de la referencia 156. Ver explicación en texto y explicación de abreviaturas

- **Modificación de receptor GR α :** Son varios los mecanismos descritos de esta modificación (Figura 25):
 - Por fosforilación del receptor GR que disminuirá su translocación al núcleo:
 - Existe un subgrupo de pacientes asmáticos resistente a GC que tienen aumentada en sus vías aéreas la expresión de IL-2, IL-4, IL-13 en células T y monocitos. Estas interleucinas activan la familia de las quinasas p38 MAPK, JAK-3 (quinasa Janus-asociada 3) y JNK (quinasa c-jun-N-terminal) que fosforilan los residuos 226 o 211 del GR y disminuyen así su afinidad por el glucocorticoide, su estabilidad y su translocación nuclear (163,164) (Bhavsar P. 2010; Ismaili N. 2004).

- El MIF (factor inhibidor de la migración del macrófago) es una citoquina con potente acción antiglucocorticoide vía fosforilación del GR-GC a través de la activación de la vía p38 MAPK.
 - La disminución del MKP-1 (inhibidor endógeno de las vías p38 MAPK, ERK y JNK) también ha sido considerado un mecanismo de corticorresistencia en la EPOC porque provoca un aumento de la actividad de la p38 MAPK y la fosforilación del GR, como se ha demostrado que sucede en pacientes asmáticos con pobre respuesta a esteroides (165) (Bhavsar P. 2008).
 - Superantígenos microbianos como la enterotoxina estafilocócica B inducen también corticorresistencia en las células T *in vitro* a través de la activación de la ERK (quinasa regulada por señal extracelular) que fosforila también al GR (166) (Li LB. 2004).
- Por nitrosilación del receptor GR que reduce la unión y afinidad por el ligando: el aumento de la expresión de la óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) produce un aumento del óxido nítrico (NO) que puede reducir la respuesta a los corticoesteroides al nitrosilar al receptor GR y reducir su afinidad por los GC.
 - Por Ubiquitinación del receptor GR que aumentará la degradación del receptor por el proteosoma (167) (Wallace AD. 2001).

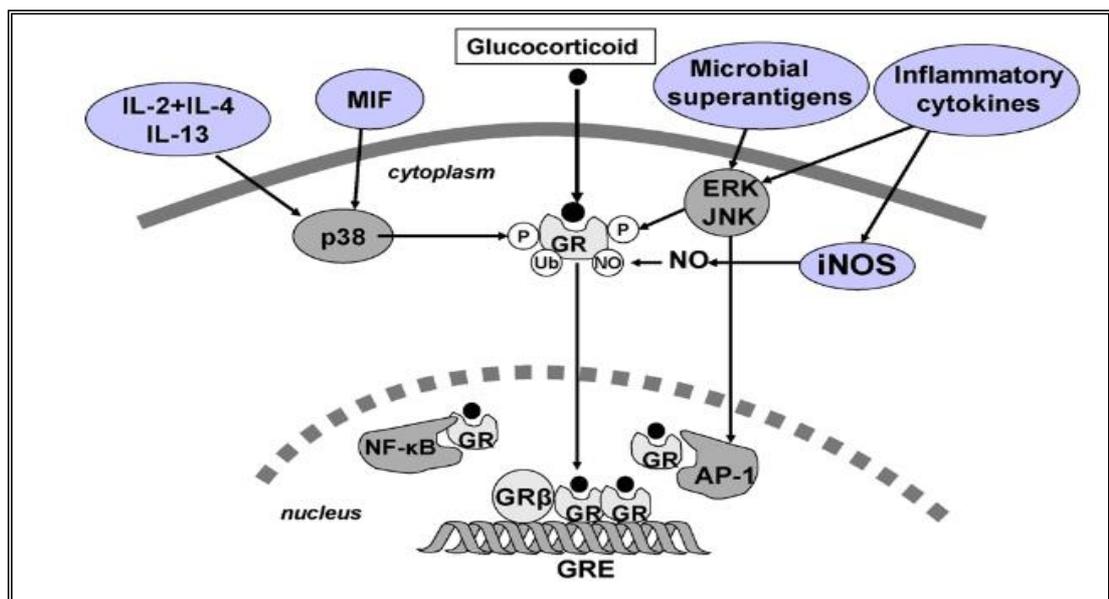


Figura 25. Mecanismos moleculares de corticorresistencia. Los receptores de glucocorticoides (GR) pueden modificarse en varias formas para reducir su translocación nuclear y su eficacia transactivacional. La fosforilación (P) puede ocurrir como resultado de la activación de la p38MAPK, que puede ser activada por IL-2, IL-4 o IL-13, o por el factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF), por la activación de JNK por citoquinas proinflamatorias o de ERK activada por superantígenos microbianos. El GR también puede nitrosilarse (NO) mediante la nitración de residuos de tirosina como resultado del aumento de óxido nítrico por medio de iNOS o ubiquitinado (Ub), lo que da

como resultado la degradación del GR por el proteasoma. Se puede evitar que GR se una a los elementos de respuesta a glucocorticoides (GRE) mediante el secuestro por la proteína activadora del factor de transcripción-1 (AP-1), que es activada por JNK, o por la unión de GR β a los sitios de unión GRE. Figura tomada de la referencia 157

- **Por aumento de la expresión del receptor GR β :** como ya se ha comentado, esta isoforma del receptor compite con la isoforma GR α (que es la que se une a los glucocorticoides) por la unión al GRE del ADN o por la unión a moléculas coactivadoras actuando como un inhibidor dominante de la acción de los esteroides (158) (Lewis-Tuffin LJ. 2006). El aumento en la expresión de GR β es inducida por citoquinas proinflamatorias y por superantígenos microbianos (como la enterotoxina estafilocócica B) (Figura 25) y este aumento explicaría la pérdida de respuesta a corticoides en algunos pacientes con asma grave no alérgico. Sin embargo en la mayoría de células de estos pacientes la expresión de GR β es mucho menor que la de GR α , haciendo este mecanismo poco probable de la corticorresistencia observada (168) (Pujols L. 2007). Hasta la fecha no hay estudios publicados que hayan investigado la expresión de GR β en los pacientes con EPOC (156) (Barnes PJ. 2013).
- **Por activación de los factores de transcripción proinflamatorios:** Excesiva activación del activador de la proteína-1 (AP-1): este factor de transcripción se une al GR-GC e impide su unión al GRE y por tanto su acción sobre el ADN. El AP-1 puede ser activado por citoquinas proinflamatorias como TNF- α a través de la vía JNK (Figura 25) (169) (Adcock IM. 1995). La vía JNK está activada en los pacientes con EPOC, pero hasta el momento no ha sido investigado si este mecanismo contribuye a su corticorresistencia.
- **Acetilación de la histonas defectuosa:** Como ya hemos visto en el apartado correspondiente, la acetilación de histonas juega un papel crítico en la regulación de genes inflamatorios y en el mecanismo de acción de los esteroides (Figura 26). Uno de los mecanismos de corticorresistencia más estudiado es el relacionado con la disminución de la actividad de la histona deacetilasa-2 (HDAC2), que contribuye tanto al aumento en la expresión de mediadores proinflamatorios como a limitar la capacidad del receptor GR α para reprimir la expresión de genes proinflamatorios.

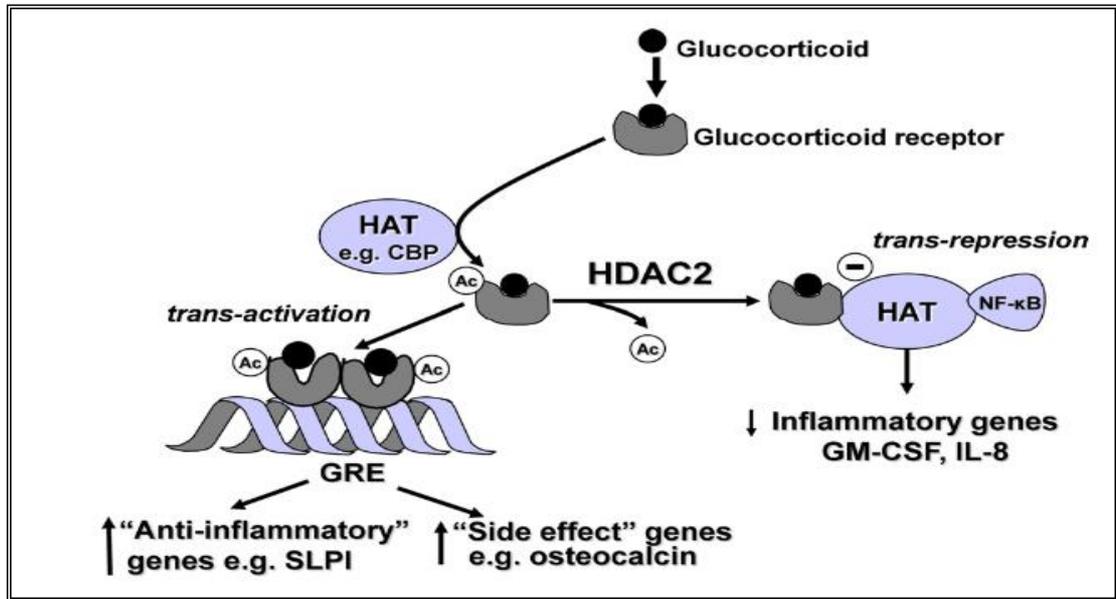


Figura 26. Acetilación del receptor de glucocorticoides (GR). El complejo GR-GC es acetilado gracias a coactivadores con actividad HAT intrínseca como el CBP. Un dímero de GR acetilado se unirá al GRE en el ADN para activar la expresión de genes anti-inflamatorios (trans-activación). La deacetilación del GR por la HDAC2 es necesaria para que el GR interactúe con los coactivadores de los factores de transcripción como NF- κ B e inhiba la expresión de genes inflamatorios (trans-represión). Figura tomada de la referencia 157

Los glucocorticoides activan genes que responden a glucocorticoides, como MKP-1, mediante la acetilación de residuos de lisina específicos (K5 y K16) en la histona-4. En una pequeña proporción de pacientes con asma resistente a glucocorticoides se ha visto que el GR se transloca normalmente al núcleo después de la exposición a glucocorticoides, pero no acetila K5, y por tanto no se produce la trans-activación de genes antiinflamatorios (170) (Matthews JG. 2004). El reclutamiento de HDAC2 para los genes inflamatorios activados es uno de los mecanismos principales de trans-represión de la inflamación mediada por los glucocorticoides (160) (Ito K. 2006) y se ha visto que en algunas enfermedades en las que los pacientes responden pobremente a los GC existe una reducción de la actividad y de la expresión de HDAC2. Por ejemplo en los pacientes con EPOC, la HDAC2 está notablemente disminuida en los macrófagos alveolares, en las vías respiratorias y en tejido pulmonar periférico (171) (Ito K. 2005) y se encuentran cambios similares en las células mononucleares de sangre periférica y en los macrófagos alveolares de pacientes con asma refractaria y en las vías respiratorias de asmáticos fumadores (165,172) (Bhavsar P 2008; Murahidy A. 2005) (Figura 27).

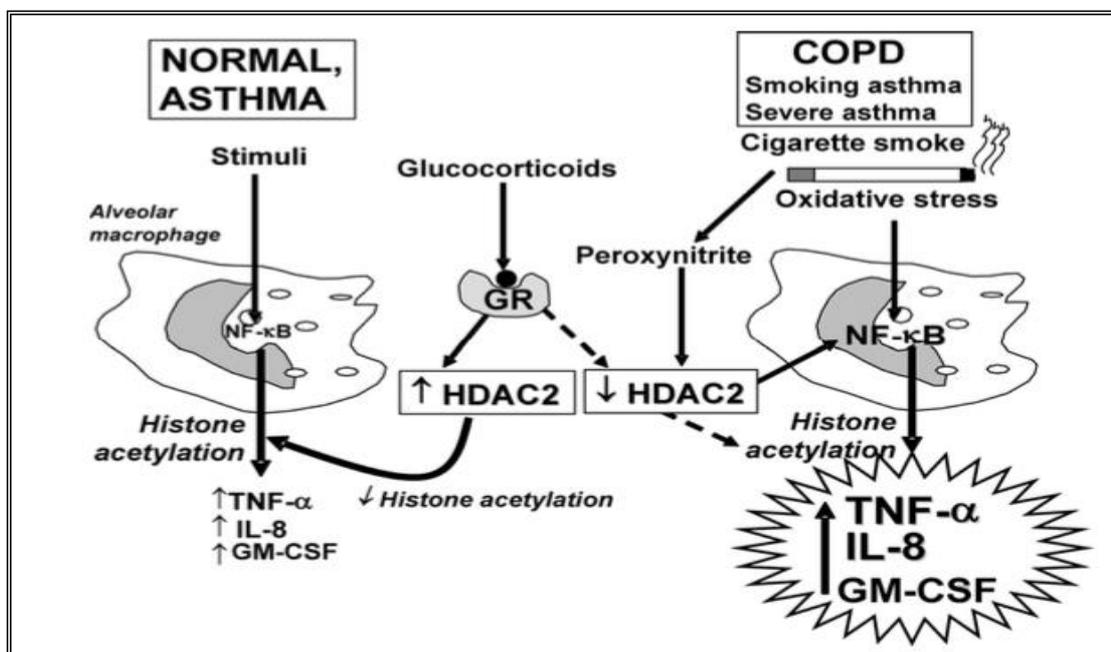


Figura 27. Mecanismo de corticorresistencia en EPOC, asma grave y asmáticos fumadores. La estimulación de macrófagos alveolares de sujetos sanos y asmáticos activa el NF- κ B y otros factores de transcripción para activar la histona acetiltransferasa que conduce a la acetilación de histonas y, posteriormente, a la transcripción de genes que codifican proteínas inflamatorias, como el TNF- α , IL-8 y GM-CSF. Los glucocorticoides revierten esto uniéndose a los receptores de glucocorticoides (GR) y HDAC2. De manera que revierten la acetilación de histonas inducida por NF- κ B y bloquea la expresión de genes inflamatorios. En pacientes con EPOC y asmáticos fumadores, el humo del cigarrillo y los neutrófilos activados generan estrés oxidativo que deteriora la actividad de HDAC2. Esto amplifica la respuesta inflamatoria a la activación de NF- κ B y también reduce el efecto antiinflamatorio de los glucocorticoides. Figura tomada de la referencia 157

Además la corticorresistencia de los macrófagos alveolares de pacientes con EPOC se ha visto que puede revertirse al sobreexpresar HDAC2 al nivel observado en sujetos sanos (mediante el uso de un vector plásmido) (160) (Ito K. 2006), lo que apoya la importante participación de la HDAC2 en la insensibilidad a los corticoesteroides. Los mecanismos moleculares por los cuales se produce esta reducción de la expresión de HDAC2 en los pacientes con EPOC se están empezando a dilucidar (173) (Barnes PJ. 2006). El estrés oxidativo y el estrés nitrosativo observado en estos pacientes dan como resultado la formación de peroxinitrito, que nitrosila residuos de tirosina en HDAC2, dando lugar a su inactivación, ubiquitinación y degradación (Figura 28) (174) (Ito K. 2004). El estrés oxidativo también activa la fosfoinositol 3-quinasa-delta (PI3K δ), que conduce a la fosforilación e inactivación de HDAC2 (47,50) (Ito K. 2001; To Y. 2010) como se observa en la figura 28.

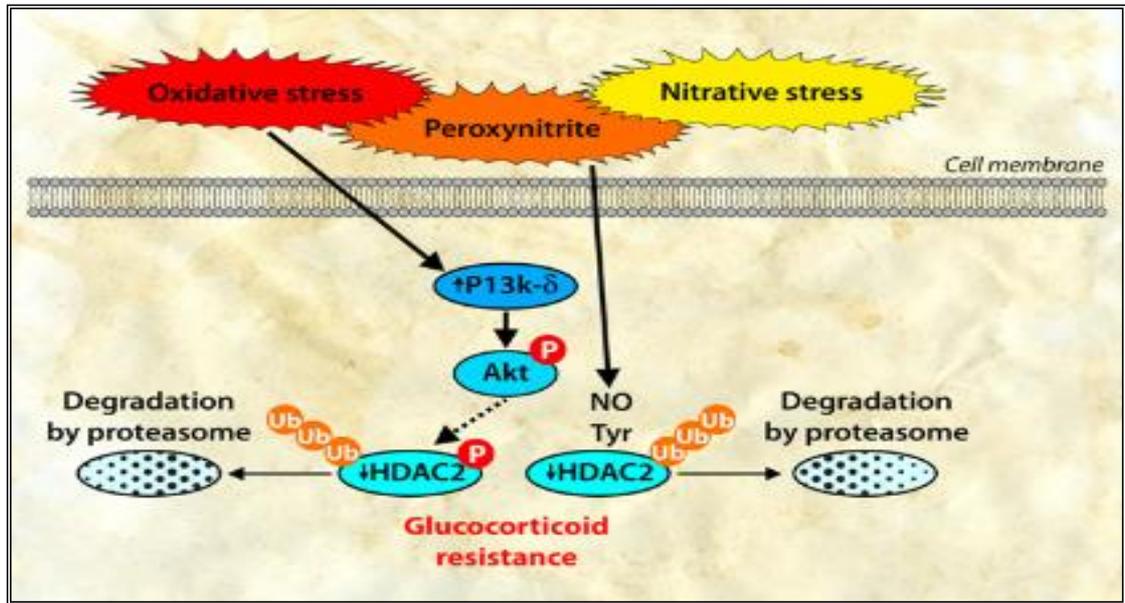


Figura 28. Mecanismos de disminución de la expresión de HDAC2 en pacientes EPOC. El estrés oxidativo activa PI3Kδ, que fosforila quinasas, como Akt, que a su vez dará lugar a la fosforilación e inactivación de HDAC2. Además, el estrés oxidativo y nitrosativo generan peroxinitrito, que nitrosila (NO) residuos de tirosina (Tyr) en HDAC2 para inhibir su actividad. Estas modificaciones de HDAC2 dan como resultado su ubiquitinación (Ub), apuntando a la enzima para la degradación por parte del proteasoma y conduciendo a una expresión reducida y finalmente a la corticorresistencia. Figura tomada de la referencia 156

La PI3Kδ es una importante vía de señalización intracelular que desempeña un papel crucial en la expresión y activación de mediadores inflamatorios, el reclutamiento de células inflamatorias, la función de células inmunitarias, el remodelado de las vías respiratorias y mediante la fosforilación de la HDAC2 se ha demostrado que participa en la insensibilidad a los corticosteroides en los pacientes con EPOC (49) (Ito K. 2007). Marwick JA *et al* (175) (2010) también demostraron la participación de la PI3Kδ en la corticorresistencia al observar un aumento de la expresión y señalización de la vía PI3Kδ en los macrófagos pulmonares de pacientes EPOC respecto a sujetos sanos, que el estrés oxidativo produce un aumento de la fosforilación de la quinasa Akt de un modo PI3Kδ-dependiente en monocitos de sangre periférica y macrófagos alveolares de pacientes EPOC y que la inhibición selectiva de la PI3Kδ (pero no de la vía PI3Kγ) restauraba el efecto antiinflamatorio de los corticoesteroides en los monocitos de sangre periférica de los pacientes EPOC igualándolo al observado en sujetos sanos.

Todo estas observaciones sugieren que el estrés oxidativo provocado por exposición al humo de tabaco en los pacientes con EPOC podría ser un importante desencadenante de la corticorresistencia en estos pacientes tanto por aumento del peroxinitrito como

por activación intracelular de la vía de señalización PI3K δ produciendo por ambas vías la disminución de la actividad y de la expresión de la HDAC2 que es el mecanismo de corticorresistencia más estudiado y demostrado en la EPOC.

Por tanto es de esperar que estrategias terapéuticas encaminadas al aumento de la actividad de la HDAC2 o al bloqueo de la vía de la PI3K δ restauren la función de los glucocorticoides y podrían ser una diana terapéutica a explorar.

Además de los mecanismos de corticorresistencia descritos, diversos estudios han propuesto la existencia de un perfil específico de mediadores inflamatorios moleculares en la EPOC que son resistentes al efecto de los corticoesteroides. Entre los diferentes perfiles moleculares descritos, los neutrófilos de personas sanas y de pacientes EPOC parecen mostrar corticorresistencia mediante la secreción y expresión de IL1 β , IL-8, IL-17, TNF α , GM-CSF, CCL-5, MMP-2 y MMP-9 (158,176–181) (Lewis-Tuffin LJ. 2010; To Y. 2010; Culpitt S. 2003; Irusen E. 2002; Kent L. 2009; Marwick JA. 2008; Mortaz E. 2008).

A este respecto parece interesante evaluar la eficacia de otros fármacos antiinflamatorios y que inhiban la vía de la PI3K δ , como el bromuro de acilidinio, en aquellas moléculas corticorresistentes en un contexto de estrés oxidativo y ambiente inflamatorio como ocurre en la EPOC.

2.11 Implicaciones terapéuticas de la corticorresistencia en la EPOC

La resistencia a los efectos antiinflamatorios de los esteroides es probablemente una de las principales barreras para el tratamiento eficaz de la EPOC y el asma grave. Una mejor comprensión de los mecanismos moleculares implicados en esta corticorresistencia ha identificado varias potenciales estrategias terapéuticas para tratar mejor estas dos patologías, encaminadas a la reversión de la corticorresistencia interfiriendo en las vías que la producen (182) (Barnes PJ. 2013).

Quizás la diana más atractiva sea aumentar la expresión y actividad de la HDAC2 porque ya se ha demostrado que la restauración de HDAC2 con un vector plasmídico restaura la respuesta a los esteroides en macrófagos alveolares de pacientes con EPOC que normalmente son resistentes (160) (Ito K. 2006).

Las opciones terapéuticas exploradas en este sentido hasta la fecha son las siguientes:

2.11.1 Antiinflamatorios alternativos de amplio espectro

Una estrategia popular para el tratamiento del asma grave y la EPOC es el desarrollo de tratamientos antiinflamatorios de amplio espectro como alternativa a los corticosteroides. El desarrollo de estos fármacos no está resultando fácil porque los efectos secundarios después de la administración vía oral son muy comunes, por lo que se están investigando formulaciones que sean efectivas por vía inhalada.

Los inhibidores de la fosfodiesterasa (PDE4) como el roflumilast ya se comercializa como el primer fármaco antiinflamatorio vía oral para la EPOC (133) (Martínez FJ. 2015). Sin embargo, su uso puede estar limitado por los frecuentes efectos secundarios (debidos a la inhibición de la PDE4) que incluye náuseas, diarrea, pérdida de peso y dolores de cabeza. Para evitarlos se han desarrollado inhibidores de PDE4 inhalados, pero hasta la fecha no han demostrado ser eficaces. Estudios *in vitro* sobre neutrófilos de pacientes EPOC han demostrado su potente efecto antiinflamatorio y que además de conseguir revertir la corticorresistencia muestra efecto sinérgico/aditivo con dexametasona (134) (Milara J. 2014).

Varios inhibidores de p38MAPK han estado en desarrollo clínico y teóricamente podrían ser particularmente efectivos porque la activación de p38MAPK, como hemos visto anteriormente, parece ser uno de los mecanismos de corticorresistencia en pacientes con asma y EPOC (163) (Bhavsar P. 2010). Los inhibidores selectivos de p38MAPK están ahora en desarrollo clínico para EPOC y el asma grave, pero de nuevo la dosis adecuada está limitada por los efectos secundarios después de la administración oral. En pacientes con artritis reumatoide, se ha observado una pérdida de eficacia (tolerancia) después de la administración prolongada, lo que sugiere que se pueden desarrollar vías de escape que aún se desconocen

(183) (Hammaker D. 2010). También se están desarrollando inhibidores de p38MAPK inhalados para evitar sus efectos secundarios sistémicos pero todavía se encuentran en fase experimental (184) (Pehrson R. 2018).

El bloqueo de NF- κ B con inhibidores selectivos del inhibidor de la quinasa NF- κ B (IKK β) podría ser otra forma de tratar la inflamación resistente a los corticosteroides, pero es probable que estas moléculas tengan importante toxicidad y efectos secundarios ya que carecen de especificidad y pueden bloquear también funciones fisiológicas del NF- κ B que participan en la inmunidad y homeostasis celular, por lo tanto, solo sean adecuados para la aplicación tópica (185) (Gupta S. 2010).

2.11.2 Restauración de la actividad de la HDAC2

Como ya se ha señalado con anterioridad el objetivo más atractivo para revertir la corticorresistencia probablemente sea aumentar la expresión y la actividad de la HDAC2 disminuida en los pacientes EPOC como consecuencia del estrés oxidativo bloqueando la vía de la fosfoinositol 3 quinasa delta (PI3K δ) (181) (To Y. 2010) y así volver a sensibilizar las células a los efectos de los glucocorticoides.

Existen varios fármacos potenciales que pueden aumentar la expresión de HDAC2 lo que sugiere que estas terapias podrían ser útiles para revertir la corticorresistencia en estos pacientes.

Se ha visto que dosis bajas de teofilina restaura la actividad de HDAC2 en macrófagos de pacientes con EPOC a niveles normales y revierte así la resistencia a los corticosteroides (186) (Cosío BG. 2004). En ratones expuestos al humo del cigarrillo que tienen inflamación corticorresistente, la teofilina oral es eficaz y consigue revertir la corticorresistencia mediante la inhibición de la vía intracelular de PI3K δ activada por el estrés oxidativo (181) (To Y. 2010). En pacientes con EPOC, una dosis baja de teofilina oral combinada con un CI es más efectiva para reducir la inflamación en el esputo que cualquiera de los dos medicamentos solos, lo que parece demostrar que su tratamiento combinado además tiene efecto aditivo (187) (Ford PA. 2010).

El antidepresivo tricíclico nortriptilina también aumenta la expresión de HDAC2 e invierte la resistencia a los esteroides al inhibir directamente la PI3K δ (188) (Mercado N. 2011). Los inhibidores selectivos de PI3K δ , como IC87114, son igualmente efectivos, (181) (To Y. 2010) y los inhibidores de PI3K δ inhalados se encuentran ahora en desarrollo clínico para el tratamiento de la EPOC y el asma grave (189) (Sadiq MW. 2021).

A pesar de que el estrés oxidativo es un mecanismo importante que conduce a la corticorresistencia de los pacientes con EPOC a través de la expresión reducida de HDAC2, los fármacos antioxidantes actualmente disponibles son poco efectivos porque se inactivan por el propio estrés oxidativo, pero ahora hay un interés considerable en los activadores del factor de transcripción del factor nuclear derivado del eritroide 2 like 2 (Nrf2), que regula la expresión de varios genes antioxidantes. La actividad de Nrf2 está marcadamente reducida en células de pacientes con EPOC, y esto está relacionado con una expresión reducida de HDAC2, que normalmente mantiene a esta proteína desacetilada y activa (190) (Mercado N. 2011). El sulforafano es un activador de Nrf2 y se ha demostrado que aumenta la expresión de HDAC2 y revierte la corticorresistencia en ratones expuestos al humo del cigarrillo y en macrófagos de pacientes con EPOC (191) (Malhorta D. 2011).

Por otro lado, dado que la estimulación muscarínica activa la vía intracelular de PI3K δ (62) (Gosens R. 2006) y, como hemos comentado al inicio, en los pacientes EPOC existe una activación del sistema colinérgico no neuronal, parece lógico pensar que los fármacos antimuscarínicos podrían tener su papel como potenciales fármacos antiinflamatorios y podrían atenuar la corticorresistencia en los neutrófilos de los pacientes EPOC inhibiendo la vía de PI3K δ , sin embargo esta hipótesis no ha sido todavía explorada y por ello nos planteamos llevar a cabo este estudio.

2.11.3 Regulación de genes inducibles por los glucocorticoides

Otra de las estrategias posibles para combatir la corticorresistencia sería la regulación de ciertos genes que son inducibles por los glucocorticoides (156) (Barnes PJ. 2013). Los genes

inducibles por los glucocorticoides con actividad antiinflamatoria cuya modulación podría combatir la corticorresistencia son los siguientes (192) (Moodley T. 2013):

- GILZ (cremallera de leucina que codifica un gen miembro de la familia de dominio 3 (TSC22D3) inducible por glucocorticoides): es un gen inducible por corticoides que inhibe la transcripción de genes inflamatorios al interferir en la actividad de varios factores de transcripción como NF- κ B y AP-1 (193) (Mittelstadt PR. 2001).
- RGS2 (Gen que codifica la proteína reguladora de la señalización de la proteína G2): la proteína reguladora que codifica activa las proteínas GTPasas que inactivan a la proteína G apagando la señalización al unirse al ligando. En el músculo liso bronquial la expresión de RGS2 está aumentada cooperativamente por los glucocorticoides – LABA ejerciendo un efecto broncoprotector. En otras células la expresión de RGS2 puede atenuar la liberación de mediadores pro-inflamatorios.
- CRISPLD2 (Gen de la Proteína secretora rica en cisteína que contiene el dominio LCCL 2) codifica una proteína de secreción frente al estímulo de LPS (componente inmunoestimulador de las bacterias Gram-negativas) en mamíferos. Mejorar la inducción de su expresión podría contribuir a disminuir la respuesta inflamatoria desencadenada por la infección por bacterias gram-negativas y el consecuente shock séptico (194) (Wang ZQ. 2009).

2.11.4 Efecto sinérgico de fármacos antiinflamatorios

La justificación de las combinaciones de fármacos para lograr efectos aditivos o sinérgicos en el tratamiento de la EPOC proviene de estudios clínicos aleatorizados y puede explicarse por interacciones farmacológicas moleculares. Así, por ejemplo, los LABA aumentan la capacidad de respuesta a los corticosteroides al revertir la fosforilación del receptor de glucocorticoides alfa ($GR\alpha$) en la serina 226 (Ser226) y promover la translocación nuclear de $GR\alpha$ (156) (Barnes PJ. 2013). La evidencia existente indica que los LABA también revierten la insensibilidad a los corticosteroides atenuando el estrés oxidativo e inhibiendo la fosfoinositido-3-quinasa delta (PI3K δ), permitiendo así la acción eficiente de la histona desacetilasa-2 (HDAC2) y $GR\alpha$ (195) (Rossios C. 2012). Estos mecanismos, que son compartidos con la teofilina (156) (Barnes PJ. 2013) y, como se demostró también, con el roflumilast (134) (Milara J. 2014), explican los

beneficios clínicos de la terapia combinada para mejorar los efectos antiinflamatorios de los corticosteroides en la EPOC.

3 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Las hipótesis de esta tesis doctoral están basadas en las siguientes consideraciones, expuestas anteriormente y resumidas a continuación:

- La EPOC es una enfermedad muy prevalente que asocia una importante morbi-mortalidad para la que no existe un tratamiento curativo.
- La inflamación neutrofílica, característicamente corticorresistente en la EPOC, es la piedra angular de la progresión del daño estructural en la vía aérea de estos pacientes.
- El estrés oxidativo causado por la exposición al humo de tabaco parece ser el principal desencadenante de esta corticorresistencia al activar la vía de señalización intracelular de la PI3K δ . Por tanto es de esperar que estrategias terapéuticas encaminadas al bloqueo de la vía PI3K δ restauren la función de los glucocorticoides y podrían ser una diana terapéutica a explorar.
- Dado que el humo del tabaco es el principal factor de riesgo para desarrollar EPOC, y que activa la respuesta inmune innata en la vía aérea de los pacientes EPOC, parece razonable considerarlo como estímulo *in vitro* para el presente estudio.
- Parece existir una participación del sistema colinérgico no neuronal en la respuesta inflamatoria neutrofílica en la vía aérea de los pacientes con EPOC y la estimulación de estos receptores muscarínicos activa la vía intracelular de PI3K δ , sin embargo todavía no se ha explorado el posible efecto antiinflamatorio de los fármacos antimuscarínicos en estos pacientes.
- El tratamiento combinado de glucocorticoides con otros fármacos que consiguen revertir la corticorresistencia en los pacientes con EPOC, potencia su efecto antiinflamatorio.

3.1 Hipótesis

En base a todo lo expuesto se establecen las siguientes hipótesis de este proyecto de investigación preclínica:

- El tratamiento con bromuro de aclidinio (fármaco antimuscarínico) podría revertir la corticorresistencia en los neutrófilos de los pacientes EPOC al ejercer un efecto antiinflamatorio.
- La combinación LAMA/CI puede conseguir un efecto antiinflamatorio aditivo entre ambos fármacos.

3.2 Objetivos

El objetivo principal de este proyecto de investigación es evaluar *in vitro* el efecto antiinflamatorio del bromuro de aclidinio sobre los neutrófilos de los pacientes con EPOC y como es capaz de atenuar la corticorresistencia característica de estos pacientes por su efecto aditivo antiinflamatorio al combinarlo con corticoesteroides inhalados, buscando así nuevas combinaciones terapéuticas que podrían ayudar a mejorar el pronóstico de estos pacientes.

Para ello se establecen los siguientes objetivos secundarios específicos:

- Analizar la activación del sistema colinérgico no neuronal en los neutrófilos del esputo y sangre periférica de pacientes con EPOC en fase estable y compararla con la de EPOC exacerbados y la de voluntarios sanos.
- Analizar el efecto antiinflamatorio del bromuro de aclidinio y de la fluticasona por separado sobre los neutrófilos del esputo y sangre periférica de pacientes con EPOC en fase estable y compararlo con las muestras de voluntarios sanos. Para ello se determinarán los siguientes marcadores inflamatorios: IL-8, IL-1 β , GM-CSF, MMP-9, CCL-5.
- Analizar el efecto aditivo de la combinación de bromuro de aclidinio y fluticasona sobre la respuesta antiinflamatoria en los neutrófilos del esputo y sangre periférica de pacientes

con EPOC en fase estable y compararlo con las muestras de voluntarios sanos. Para ello se determinarán los siguientes marcadores inflamatorios: IL-8, IL-1 β , GM-CSF, MMP-9, CCL-5 en todas las muestras.

- Analizar los mecanismos implicados en la mejoría del efecto antiinflamatorio (efecto aditivo) al combinar bromuro de aclidinio y fluticasona, y que consiguen atenuar la corticorresistencia. Para ello se determinará la expresión de mRNA de genes y proteínas implicadas en la corticorresistencia como MIF, HDAC2, GR α , MKP1, CRISPLD2, GILZ y la actividad de PI3K δ , pERK1/2, p-p38 y GRser226.

4 METODOLOGÍA

4.1 Material

4.1.1 Pacientes

Se obtuvieron neutrófilos de esputo, neutrófilos de sangre periférica y sangre total de pacientes con EPOC fumadores en fase estable, EPOC fumadores exacerbados y de controles voluntarios sanos no fumadores.

Los pacientes EPOC fueron seleccionados e incluidos de manera aleatoria consecutiva desde la consulta monográfica de EPOC (los estables) y de la sala de hospitalización de neumología (los exacerbados) del servicio de neumología del Consorcio Hospital General Universitario de Valencia.

Todos los pacientes población del estudio cumplieron con los criterios diagnósticos de EPOC y fueron clasificados según el grado de obstrucción de la vía aérea basada en el FEV₁ postbroncodilatador, siguiendo los criterios recomendados en la Guía Española de manejo del EPOC y la guía GOLD (Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease) (Tabla 2). (1,4) (GOLD 2021, Miravittles M 2017). Para ello a todos los pacientes en fase estable se les realizó una espirometría para evaluar la capacidad vital forzada (FVC), el volumen espiratorio forzado en el primer segundo (FEV₁) y la relación FEV₁/FVC utilizando un espirómetro Vitalograph® αIII (Vitalograph, Maids Moreton, Reino Unido) y en caso de los pacientes exacerbados se incluyeron aquellos que tenían una espirometría forzada realizada en fase estable en los últimos 3 meses, con el mismo espirómetro.

Tabla 2. Clasificación de la gravedad de la obstrucción de la EPOC.

Grado de obstrucción	FEV ₁ tras broncodilatador
Leve – GOLD 1	≥ 80 % predicho
Moderada – GOLD 2	50 % ≤ FEV ₁ < 80 % predicho
Grave – GOLD 3	30 % ≤ FEV ₁ < 50 % predicho
Muy grave – GOLD 4	< 30 % predicho

En pacientes con FEV₁/FVC < 0.7 post-broncodilatador

Los voluntarios sanos no fumadores fueron sujetos de la misma edad que el grupo de estudio y con función pulmonar normal tras realización de una espirometría forzada con el mismo espirómetro referido.

Todos los pacientes con EPOC eran fumadores actuales (> 10 años/paquete) y pertenecían al fenotipo bronquitis crónica (tos y expectoración durante al menos 3 meses al año en dos años consecutivos, estando en situación clínica estable) (4) (Miravittles M. 2017) y sin infección bronquial crónica. En los pacientes con EPOC estable, no hubo exacerbaciones de la enfermedad en las 2 semanas previas a la toma de las muestras de esputo y sangre periférica y se realizó un periodo de lavado de la medicación inhalada crónica de 4 días antes de la toma de muestras de esputo o sangre. Todos los pacientes con EPOC exacerbado incluidos fueron hospitalizados muy probablemente debido a infecciones de las vías respiratorias, basándonos en la clínica de presentación y/o por análisis bacteriológico de sangre y/o esputo. Las muestras de células de pacientes con EPOC exacerbada se recogieron antes de iniciar el tratamiento con corticosteroides sistémicos. Los datos de los pacientes se recogieron en la hoja diseñada para dicho cometido (Anexo 1. Hoja recogida de datos).

En los diferentes experimentos mecanicistas se utilizaron los neutrófilos de pacientes con EPOC estable y los neutrófilos de los pacientes con EPOC exacerbada se utilizaron solo para medir la expresión basal de los componentes colinérgicos no neuronales.

Se obtuvo el consentimiento informado por escrito de cada paciente o voluntario antes de comenzar el muestreo de esputo / sangre y las pruebas de función pulmonar (Anexo 2). Este proyecto fue aprobado por el Comité de Ética local del Consorcio Hospital General Universitario de Valencia (Anexo 3).

4.1.2 Aislamiento de Neutrófilos

Los neutrófilos se aislaron de sangre venosa periférica utilizando dextrano 500 al 3% (en solución salina al 0,9%) junto con Ficoll-Paque Histopaque 1077 (Amersham Pharmacia Biotech, Barcelona, España; medio estéril estándar diseñado para aislar leucocitos) en una proporción de 2:1. La mezcla fue incubada a temperatura ambiente durante 30 minutos hasta

que los hematíes sedimentaron. La fase superior se recogió cuidadosamente y se añadió a Ficoll-Paque Histopaque 1077 (Amershan Pharmacia Biotech) en una proporción de 3:1. Las dos fases generadas se centrifugaron a 150 g y 4°C durante 30 min. Luego, se eliminó el sobrenadante y el sedimento obtenido (que consistió en una mezcla de neutrófilos y baja proporción de eritrocitos residuales y trazas de eosinófilos y basófilos) se resuspendió en un tampón de lisis de eritrocitos (Bioleg- end) durante 5 min en hielo. La suspensión celular se lavó dos veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS). Las preparaciones de neutrófilos tuvieron una pureza mayor del 97%, según se evaluó mediante tinción de Giemsa y una viabilidad > 99%, según se midió mediante exclusión con azul tripán. Ni la pureza ni la viabilidad se vieron afectadas en las diferentes condiciones experimentales del estudio.

Los neutrófilos del esputo espontáneo (aproximadamente 2 ml) se obtuvieron de los pacientes con EPOC estable y exacerbado y se procesaron con ditiotreitól. El esputo se procesó lo antes posible (dentro de las 2h) fue vertido en una placa de Petri y todas las porciones que macroscópicamente parecían libres de contaminación salival (hasta 1.000 mg) se colocaron en un tubo de poliestireno de 15 ml. Esta porción seleccionada se trató con 4 veces el volumen de ditiotreitól (DTT) (*Sputalysin 10%*; *Calbiochem Corp., San Diego, CA*, recién diluido a 0,1% en agua destilada), para disociar los enlaces disulfuro del moco. La mezcla se agitó durante 15 segundos y se aspiró suavemente dentro y fuera de una pipeta Pasteur para asegurar la mezcla. El tubo de poliestireno se colocó posteriormente en un agitador (*Dade Tube Rocker; Baxter Diagnostics Corporation, Miami, FL*) y se agitó durante 15 minutos. Para detener el efecto del DTT en la suspensión celular, se añadieron 4 volúmenes más de D-PBS y se homogeneizó el tubo 5 min más. La suspensión se filtró a través de una gasa de nailon (*BBSH Thompson, Scarborough, Ontario*) de 48- μ m de tamaño de poro para eliminar los agregados celulares, suciedad y mucosidad. La suspensión clara resultante se centrifugó a 790 x g durante 10 min. Los sedimentos de células de esputo se resuspendieron en medio de cultivo *Roswell Park Memorial Institute 1640* (RPMI-1640) (medio celular para cultivos celulares) enriquecido con suero fetal de bovino al 10%, penicilina-estreptomina al 1% y 1 mmol/L de L-glutamina a una concentración de 1×10^6 células/ml. Se incubó una alícuota que contenía 4×10^5 células en una placa de 24 pocillos durante 1 hora a 37°C con 5% CO₂ en aire humidificado. Se descartaron las preparaciones que contenían < 95% de neutrófilos. Ni la pureza ni la viabilidad

de las preparaciones celulares se vieron afectadas por las diferentes condiciones experimentales del estudio.

4.1.3 Preparación de la solución del extracto de humo de cigarrillo

Dado que el humo del tabaco es el principal factor de riesgo para desarrollar EPOC, y que activa la respuesta inmune innata en la vía aérea de los pacientes EPOC, parece razonable considerarlo como estímulo *in vitro* para el estudio de las propiedades antiinflamatorias del bromuro de acilidinio.

El extracto de humo de cigarrillo (EHT) se preparó como se ha descrito anteriormente (196) (Milara J. 2010). Brevemente, el humo de un cigarrillo de investigación (2R4F; *Tobacco Health Research, Universidad de Kentucky, Lexington, KY, EE. UU.*) fue generado por una bomba respiratoria (*Rodent Respirator 680; Harvard Apparatus, March-Hugstetten, Alemania*) a través de un mecanismo de inhalación que imita el patrón de fumar humano (3 bocanadas/min; 1 bocanada 35 ml; cada bocanada de 2 segundos de duración con 0,5 cm por encima del filtro) y se burbujeó en un matraz que contenía 25 ml de RPMI-1640 precalentado (37°C). (Figura 29)

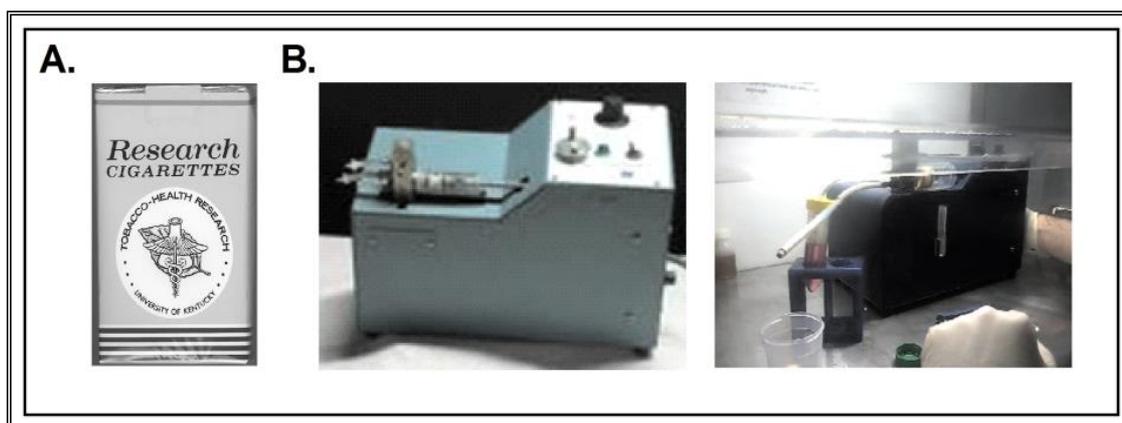


Figura 29. El extracto de humo de tabaco (EHT) generado fue utilizado como estímulo en los experimentos *in vitro*. A. Cigarros de investigación 2R4F utilizados en los experimentos. B. Bomba de respiración utilizada para generar el extracto de humo de tabaco (EHT) y burbujearlo en el medio de cultivo.

La solución de EHT resultante se consideró como EHT al 100% y se usó para experimentos dentro de los 30 minutos posteriores a la preparación. Una concentración de EHT al 10% corresponde aproximadamente a la exposición asociada con fumar dos paquetes de cigarrillos

por día (197) (Su Y. 1998). Para testar la citotoxicidad/apoptosis inducida por EHT, se trataron los neutrófilos aislados con concentraciones de EHT de hasta el 5% durante 6 h.

4.2 Métodos

Tabla 7. Resumen de los estudios *in vitro*

Células	Proceso	Estímulo	Parámetro	Método
Neutrófilos de sangre periférica y esputo	Mediadores inflamatorios	LPS 1µg/ml EHT 5% Carbacol	IL-8	ELISA
			IL1β	LUMINEX
			CCL-5	
			GM-CSF	
			MMP-9	
	Mecanismos de corticorresistencia	LPS 1µg/ml EHT 5% Carbacol	GRα	RT-PCR
			GRβ	
			MKP-1	
			MIF	
			PI3Kδ	
			HDAC-2	
			CRISPLD2, GILZ	
			β ₂ -ADR	
			ChAT, VACHT, CHT1, OCT-1-3, and M1-M5	

LPS: lipopolisacárido; EHT: extracto de humo de tabaco; CCL-5 quimiocina ligando 5; GM-CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos; MMP: metaloproteasas; GR: receptor de glucocorticoide; MKP-1: proteinquinasa activada por mitógenos fosfatasa 1; MIF: factor inhibidor de migración de macrófagos; PI3Kδ: fosfatidil-inositol quinasaδ; HDAC: histona deacetilasa; CRISPLD2: proteína secretora rica en cisteína que contiene el dominio LCCL2; GILZ: cremallera de leucina inducida por glucocorticoides; β₂-ADR: receptor β₂-adrenérgico; ChAT: acetilcolintransferasa; VACHT: transportador vesicular de acetilcolina; CHT: Transportador de colina de alta afinidad; OCT: Proteína orgánica transmembrana que transporta Ach; M: receptor muscarínico; RT-PCR: Reacción en cadena de polimerasa a tiempo real

4.2.1 Análisis de mediadores inflamatorios secretados por los neutrófilos

Como ya se ha comentado en la introducción los neutrófilos de pacientes EPOC parecen mostrar corticorresistencia mediante la secreción y expresión de IL1β, IL-8, IL-17, GM-CSF, CCL-5 y MMP-9.

Por ello en este trabajo nos planteamos medir la secreción de estos mediadores por los neutrófilos aislados de esputo y sangre periférica de pacientes EPOC y voluntarios sanos y demostrar como estos mediadores inflamatorios muestran una pobre respuesta a la inhibición por los corticoesteroides en un contexto de inflamación crónica como sucede en la EPOC.

Los neutrófilos del esputo y de sangre periférica se ajustaron a 500×10^3 células por pocillo en placas de 24 pocillos y se incubaron en RPMI-1640 durante 1 hora a 37°C en CO_2 humidificado al 5%.

Las células se dejaron sin tratar o se trataron durante 1 hora con los siguientes fármacos mostrados en la Tabla 8:

Tabla 8. Fármacos y sus concentraciones para la experimentación

Fármacos	Concentraciones
Bromuro de aclidinio (LAMA)	0.1nM-1 μ M
Propionato de Fluticasona (CI)	0.1nM-1 μ M
Atropina (antagonista muscarínico)	0.1nM-1 μ M
p-fluoro-hexahidrosiladifenidol (pFHHSid; inhibidor de M3)	10 nM, 1 μ M
Metoctramina (inhibidor de M2)	100 nM, 1 μ M
LY294002 (inhibidor de PI3K)	1 μ M
Hexametonio (antagonista del receptor nicotínico)	100 μ M
Bromuro de aclidinio (LAMA) + Propionato de Fluticasona (CI)	10nM + 10nM

Tras 1 hora de tratamiento las células fueron estimuladas con 1 μg de lipopolisacárido (LPS)/ml (como mediador inflamatorio), EHT al 5% (como estímulo oxidante) o carbacol 10 μM (agonista colinérgico) durante 6h.

En otros experimentos, se añadieron 10 U de acetilcolinesterasa (AChE) / ml 1 h antes del estímulo para eliminar la acetilcolina extracelular y durante el período de 6 h de estimulación con LPS o EHT. Se seleccionó EHT 5% como estímulo en los neutrófilos del esputo porque el LPS solo no aumentó los niveles IL-8 sobre los valores basales, como se informó anteriormente (198) (Plumb J. 2012). Así que se utilizó LPS como estímulo para los neutrófilos de sangre periférica y EHT al 5% para los del esputo.

Los estímulos y fármacos se incubaron junto con las células durante 6 h. Se recogieron los sobrenadantes y se centrifugaron a 120 g durante 5 min. El sobrenadante libre de células se utilizó para medir IL-1 β , IL-8, metaloproteínasa-9 (MMP9), CCL-5, factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF). Se utilizaron extractos celulares para medir la expresión de ARNm después de 6 h de estimulación celular. Los niveles de IL-8 se midieron utilizando un kit de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas disponible comercialmente para IL-8 (*R&D Systems, Nottingham, Reino Unido*) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

Se midieron MMP9, CCL-5, GM-CSF e IL-1 β utilizando tecnología LUMINEX, de acuerdo con el protocolo del fabricante.

4.2.2 Análisis de la activación del sistema colinérgico no neuronal en los neutrófilos

Para el estudio de la activación del sistema colinérgico no neuronal en los neutrófilos de los pacientes EPOC y compararlo con los neutrófilos de los voluntarios sanos se analizó la expresión de las siguientes proteínas (Tabla 9) mediante RT-PCR (*Applied Biosystems*) en tiempo real como después se explicará:

Tabla 9. Proteínas expresadas por activación del sistema colinérgico no neuronal
Ensayos de Expresión Génica TaqMan®

Proteínas	Referencia (Nº Catálogo)
OCT 1: Proteína orgánica transmembrana que transporta Ach -1	Hs00222691_m1
OCT 2 Proteína orgánica transmembrana que transporta Ach -2	Hs01010726_m1
OCT 3 Proteína orgánica transmembrana que transporta Ach -3	Hs00427552_m1
ChAT: Acetilcolin transferasa	Hs00252848_m1
CHT1: transportador de colina de alta afinidad	Hs00222367_m1
M1: receptor muscarínico 1	Hs00265195_s1
M2: receptor muscarínico 2	Hs00265208_s1
M3: receptor muscarínico 3	Hs100265216_s1
M4: receptor muscarínico 4	Hs00265219_s1
M5: receptor muscarínico 5	Hs00255278_s1
VACHT: Transportador vesicular de acetilcolina	Hs00268179_s1
β_2 -ADR: receptor β_2 -adrenérgico	Hs00240532_s1

4.2.3 Estudio de los mecanismos de corticorresistencia

Para la aproximación a los posibles mecanismos de corticorresistencia se evaluó la expresión de ARNm, mediante RT-PCR también, de los siguientes genes de interés (Tabla 10):

Tabla 10. Genes analizados para analizar mecanismos de corticorresistencia
Ensayos de Expresión Génica TaqMan®

Proteínas	Referencia (Nº Catálogo)
MIF	Hs00236988
MKP-1	Hs00610256
PI3K δ	Hs00192399
HDAC2	Hs00231032
GR α	Hs00353740_m1
CRISPLD2	Hs00230322_m1
GILZ	Hs00608272_m1

4.2.3.1 Estudio de la expresión génica: Técnicas de Biología molecular

4.2.3.1.1 Extracción de ARN total y cuantificación

Para aislar el ARN total de los neutrófilos de sangre periférica y esputo en condiciones basales y tras la exposición a los diferentes fármacos y estímulos descritos en el apartado 3.2.1 y en las tablas 7, 8 y 9, se utilizó el reactivo *TriPure Isolation Reagent (Roche Diagnostics, Indianapolis, USA)*, que es una solución monofásica de fenol y tiocianato de guanidina (Trizol), que permite separar ARN, ADN y proteínas.

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

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

4.2.3.1.2 Retrotranscripción inversa (RT)

En la reacción de retrotranscripción inversa (RT), la enzima retrotranscriptasa inversa sintetiza ácido desoxiribonucleico (ADN) complementario (ADNc) a partir de un ARN molde.

Tomando en consideración la cuantificación del ARN extraído, se transformó un total de 300 ng de ARN en ADNc utilizando el kit "*Taq Man para la retrotranscripción inversa*". Se realizó este proceso en un termociclador *9800 Fast Thermal Cycler (Applied Biosystems, Perkin-Elmer Corporation, CA, EEUU)* con los siguientes pasos: incubación durante 10 minutos a 25°C , ciclo de 30 minutos a 42°C e inactivación de la enzima durante 5 minutos a 95°C . El ADNc sintetizado se almacenó a -20°C hasta su utilización. (Figura 30)

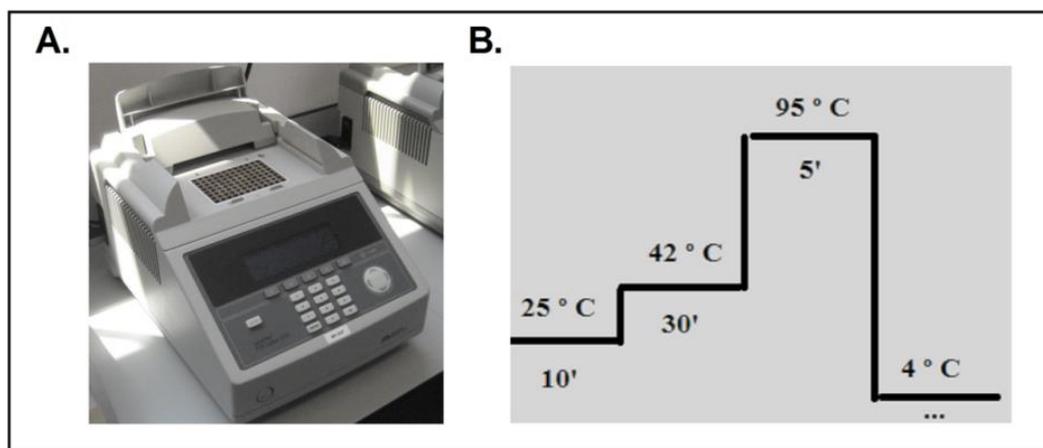


Figura 30. Retrotranscripción inversa. A. Termociclador *9800 Fast Thermal Cycler* para realizar la reacción de retrotranscripción inversa. B. Etapas de la reacción. En la figura se muestran temperaturas (°C) y tiempos (minutos) de los distintos pasos de la reacción.

4.2.3.1.3 RT-PCR a tiempo real

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) consiste en la amplificación selectiva de una región de ADN de interés utilizando oligonucleótidos como cebadores de la síntesis de ADN. Los cebadores se unen específicamente a secuencias que flanquean la región que se pretende amplificar. La reacción de amplificación consiste en la repetición de un ciclo integrado por tres etapas:

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

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

La variante denominada PCR a tiempo real (RT-PCR) constituye una forma precisa de detectar y cuantificar los niveles de ARN mensajero (ARNm). Los equipos de RT-PCR permiten la detección directa del producto de amplificación durante la fase exponencial de la reacción empleando lectores de fluorescencia que permiten medir la fluorescencia emitida durante la reacción. Para ello se utilizaron *Ensayos de Expresión Génica TaqMan®*, que son mezclas pre-formuladas de sondas y cebadores específicos para el gen de interés marcadas con fluorocromos. Los reactivos TaqMan utilizan una sonda fluorogénica y la actividad 5' nucleasa de la Taq polimerasa de ADN para detectar un producto de PCR específico a medida que se acumula durante la reacción, tal y como se detalla en la siguiente figura (Figura 31).

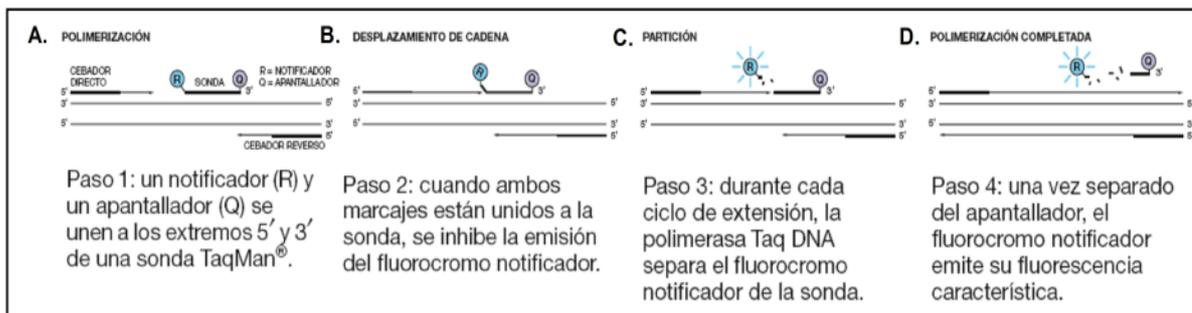


Figura 31. Sistema TaqMan® para RT-PCR. Los reactivos TaqMan utilizan una sonda fluorogénica y la actividad 5' nucleasa de la Taq polimerasa de ADN para detectar un producto específico de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a medida que se acumula durante la reacción (Figura extraída de "Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System: Guía de reactivos" 2006, 2010)

La existencia de estas sondas fluorogénicas permite la detección en tiempo real únicamente de los productos de amplificación específicos. En las tablas 9 y 10 se enumeran los *Ensayos de Expresión Génica TaqMan®* utilizados para el estudio de la expresión de los genes de interés.

Cada reacción de PCR contenía los siguientes componentes:

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

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

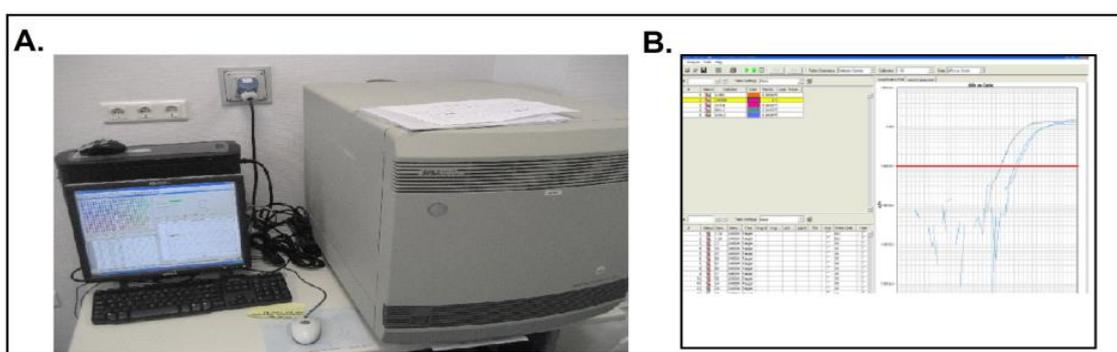


Figura 32. RT-PCR a tiempo real. A. Termociclador *7900HT Fast Real-Time PCR System* para la realización de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real (RT-PCR). B. Software *RQ Manager* utilizado para el análisis de las curvas de amplificación obtenidas y la cuantificación de la expresión génica.

A partir de los datos de fluorescencia registrados se obtuvieron curvas de amplificación en las que se representaba el logaritmo de la intensidad de fluorescencia frente al número de ciclos transcurridos (Figura 32). Para medir la expresión de un determinado gen se utilizó el ciclo

umbral (Ct), ciclo en el que se alcanza el nivel prefijado de fluorescencia. Cuantas más copias haya de ARNm de partida del gen estudiado, más ADNc se obtendrá en la retrotranscripción inversa y antes comenzará la amplificación a ser exponencial.

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

En este método se utiliza la siguiente ecuación:

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

Siendo:

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

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

Para que la determinación a través de esta fórmula aritmética sea válida, debe cumplirse que la eficiencia de la reacción para el gen problema y para el gen de referencia sea aproximadamente igual. El proveedor de las sondas utilizadas en los experimentos garantiza que la eficiencia en las reacciones es de 1. Se estudió cada muestra por duplicado, se corrigieron los valores frente al gen referencia y se normalizaron frente al grupo control. Se calculó el valor $2^{-\Delta\Delta Ct}$ de los distintos grupos y se representó junto al grupo control, cuyo valor de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ es igual a 1. El valor $2^{-\Delta\Delta Ct}$ equivale a la expresión relativa de ARNm de un determinado gen.

4.2.3.1.4 Silenciamiento génico mediante ARN interferente (siARN)

El small interfering ARN (siARN) o ARN interferente es un mecanismo de silenciamiento post-transcripcional de genes específicos, de modo que pequeñas moléculas de ARN complementarias a un ARNm conducen a la degradación de éste, impidiendo su traducción en proteínas (Figura 33).

Para transfectar los siARN al interior celular es necesario cargarlos dentro de liposomas capaces de fusionarse con la membrana celular. Así pues, se prepararon dos soluciones por separado: una solución que contenía el siARN diluido en medio Opti-MEM® y una solución de Lipofectamina 2000® diluida en medio Opti-MEM® e incubada 5 minutos a temperatura

ambiente. Ambas soluciones se mezclaron suavemente y se incubaron 20 minutos a temperatura ambiente. La mezcla se añadió sobre las células a una confluencia del 90% y en medio libre de antibióticos, puesto que estos pueden interferir en la transfección. Se incubó a 37°C con 5% CO₂ en aire humidificado durante 6 horas (Figura 33). Pasado este tiempo se renovó el medio de cultivo y se incubaron 24 horas hasta el inicio del procedimiento experimental.

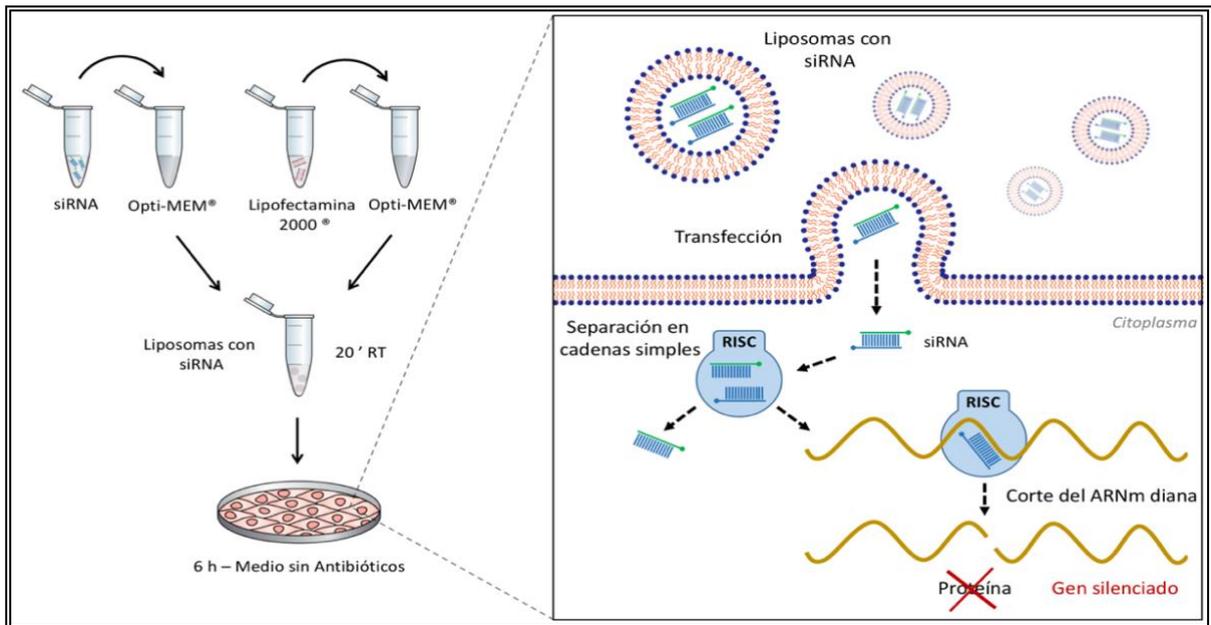


Figura 33. Silenciamiento génico mediante RNA interferente. En el lado izquierdo se ilustra el protocolo para generar liposomas con siARN mediante Lipofectamina 2000®. Cuando se cultivan las células en presencia de estos liposomas (cuadro derecho) sus cubiertas lipídicas se fusionan con la membrana celular e introducen su contenido al citoplasma. Entonces el complejo RISC (RNA-induced silencing complex) provoca el desapareamiento de las dos hebras del siARN y utiliza la hebra antisentido como guía para seleccionar el ARNm complementario de la hebra de siARN presente en el complejo. Finalmente, RISC promueve el corte y posterior destrucción del ARNm diana, provocando la supresión de la expresión del gen.

Este mecanismo de silenciamiento post-transcripcional de genes específicos fue utilizado con el objetivo de analizar que receptor muscarínico funcional es el más implicado en la respuesta inflamatoria.

En este estudio el siARN utilizado fue de *Ambion (Huntingdon, Cambridge, Reino Unido)*. Se transfectaron células epiteliales bronquiales humanas cultivadas Beas2B con 50 nM de un siARN comercial contra el gen M2 (PN 4392421; *Ambion, Austin TX, USA*) o con 50 nM de un siARN contra el gen M3 (PN 4390815; *Ambion, Austin TX, USA*) o con 50 nM del siARN control (*Ambion, Huntingdon, Cambridge, Reino Unido*) en medio de cultivo libre de suero bovino fetal y de antibiótico. Después de 6 h, se aspiró el medio y se reemplazó con medio que contenía

suero durante 48 h más. Se utilizó Lipofectamina 2000® (*Invitrogen, Paisley, Reino Unido*), a una concentración final de 2 µg / ml, como reactivo de transfección.

4.2.3.1.5 Sistema reportero de elemento de respuesta a glucocorticoides (GRE)

Para monitorizar la actividad transcritora del receptor de glucocorticoides α en células *in vitro* se empleó el kit *Signal GRE Reporter Assay* (QIAGEN, nº Cat. 336841). La técnica consiste en transfectar un constructo génico con un sistema reportero, formado básicamente por el gen de la Luciferasa bajo el control de un promotor (m)CMV y de repeticiones en tándem de elementos de respuesta a glucocorticoides (GRE). De modo que la activación como factor de transcripción del GR α por dexametasona provoca su unión a los GRE del sistema reportero y la síntesis de Luciferasa, que generará fluorescencia de manera proporcional. El sistema también incluye una mezcla de constructos del gen de la Luciferasa no inducible, como control negativo; y una mezcla de constructos que expresan constitutivamente el gen de la Luciferasa, como control positivo (Figura 34).

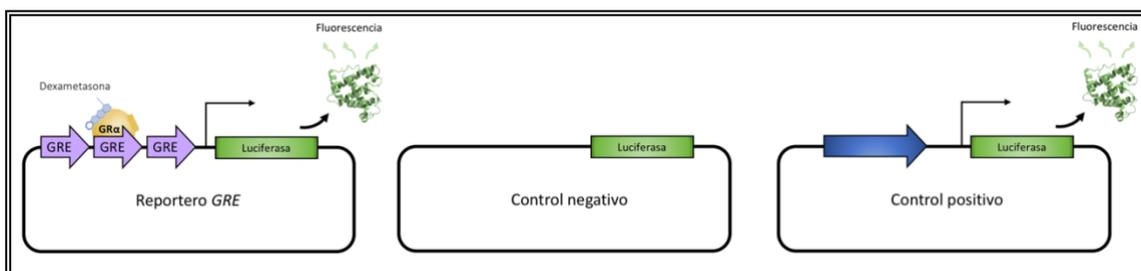


Figura 34. Constructos del kit *Signal GRE Reporter Assay*.

En este trabajo se utilizaron células epiteliales Beas2B (40.000 células/pocillo) y se cultivaron durante 24h a 37°C con 5% CO₂ en aire humidificado en placas de 96 pocillos que contenían medio de cultivo *Eagle modificado de Dulbecco (DMEM)*.

Se utilizó el kit *Signal GRE Reporter Assay* (QIAGEN, nº Cat. 336841) para monitorizar la actividad transcritora del receptor de glucocorticoides α en las células cultivadas, siguiendo las indicaciones del fabricante.

En primer lugar, las células se transfectaron con siARN dirigido al gen M2, al M3 o al control de siRNA codificado como se describió anteriormente.

Después de 24 h, las células se transfectaron con el indicador *Cignal* (100 ng), el control negativo *Cignal* (100 ng) y el control positivo *Cignal* (100 ng) en medio de cultivo sin suero Opti-MEM utilizando Lipofectamine 2000 (Invitrogen) como reactivo de transfección. Posteriormente, las células se incubaron con los reactivos de transfección a 37°C en una incubadora de CO₂ al 5% durante 16 h.

Tras este periodo de incubación, las células fueron preincubadas durante 6h en DMEM con diferentes concentraciones y combinaciones de los fármacos a estudio:

Tabla 11. Fármacos y sus concentraciones utilizados para la experimentación

Fármacos	Concentraciones
Bromuro de aclidinio (LAMA)	0.01nM-1µM
Propionato de Fluticasona (CI)	0.1nM-1µM
Atropina (antagonista muscarínico)	0.01nM-1µM
LY294002 (inhibidor de PI3K)	0.1nM-1µM
Bromuro de aclidinio (LAMA) + Propionato de Fluticasona (CI)	0.01nM-1µM + 1 nM
Atropina + Propionato de Fluticasona (CI)	0.1nM-1µM + 1 nM
LY294002 (inhibidor de PI3K) + Propionato de Fluticasona (CI)	0.1nM-1 µM + 1nM
Propionato de Fluticasona (CI) + Bromuro de aclidinio (LAMA)	0.1nM-1µM + 10 nM
Propionato de Fluticasona (CI) + LY294002	0.1nM-1µM + 1 nM

Después de la segunda incubación de 6 h, se desarrolló el ensayo de luciferasa utilizando el sistema *Dual-Luciferasa Reporter Assay System* (Promega, nº de cat. 1910) siguiendo el protocolo del fabricante. En resumen, se eliminó el medio de cultivo de las células cultivadas, que luego se lavaron cuidadosamente con solución salina tamponada con fosfato (PBS). Después de la eliminación completa de la solución de enjuague, se añadió *Passive Lysis Buffer 1X* y posteriormente, la placa de cultivo se colocó en un agitador orbital para agitar suavemente a temperatura ambiente durante 15 min. El reactivo de ensayo de *Luciferasa II* (LAR II) se preparó resuspendiendo el *Luciferasa Assay Substrate* liofilizado proporcionado en 10 ml del *Luciferasa Assay buffer II* suministrado. Se predispensaron 100 µl de LAR II en el número apropiado de pocillos de una placa de 96 pocillos, seguido de 20 µl de lisado celular y se mezclaron pipeteando dos o tres veces. La placa de ensayo se colocó en un luminómetro (*Victor Luminometer, Perkin-Elmer, Madrid, España*) y se midió la actividad luciferasa. Justo antes de su uso, el reactivo Stop & Glo se preparó diluyendo 1 volumen del sustrato Stop & Glo con 50 volúmenes de tampón Stop & Glo. Después de la medición de la actividad luciferasa, se dispensaron 100 µl de reactivo Stop & Glo en los pocillos correspondientes y se inició una segunda lectura del luminómetro, registrando la actividad luciferasa de *Renilla*. Los

datos se expresan como 2 veces la inducción de luciferasa del indicador GRE (2xGRE) en relación con la de las células no estimuladas.

4.2.3.2 Estudio de la expresión proteica

4.2.3.2.1 Western Blot

La técnica de Western Blot fue utilizada para detectar cambios en p-ERK1/2, p-p38, MKP1 y en el receptor de glucocorticoides fosforilado en el residuo serina 226 (GR-Ser226).

Los neutrófilos incubados en RPMI 1640 se trataron con propionato de fluticasona, bromuro de aclidinio o una combinación de los mismos durante 1 hora y se estimularon con LPS durante 30 minutos. Luego, las células se centrifugaron y la proteína total se extrajo como se describió anteriormente (199) (Milara J. 2012).

Se empleó la electroforesis en gel de acrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS) para separar las proteínas de acuerdo a su peso molecular. Las proteínas desnaturalizadas (20 µg) y el marcador de peso molecular (*Bio-Rad Kaleidoscope de Bio-Rad Laboratories Ltd.*) se cargaron en los pocillos de un gel de acrilamida, formado por un gel de apilamiento (acrilamida al 5%) situado encima de un gel de resolución (acrilamida al 10%). Se aplicó al gel una corriente eléctrica de 100V durante 1 h provocando que las proteínas migrasen a su través. Posteriormente, se transfirieron las proteínas del gel a una membrana de nitrocelulosa *Amersham Hybond ECL Nitrocellulose Membrane (Amersham GE Healthcare)* utilizando un método de transferencia semi-húmeda. La membrana fue bloqueada con albúmina en PBS con 0,1% de TWEEN®20 durante 3 horas e incubada con el anticuerpo primario correspondiente (Tabla 11) durante toda la noche a 4°C. Tras la incubación, se lavó la membrana y se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente, conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) durante 1 hora. (Figura 35).

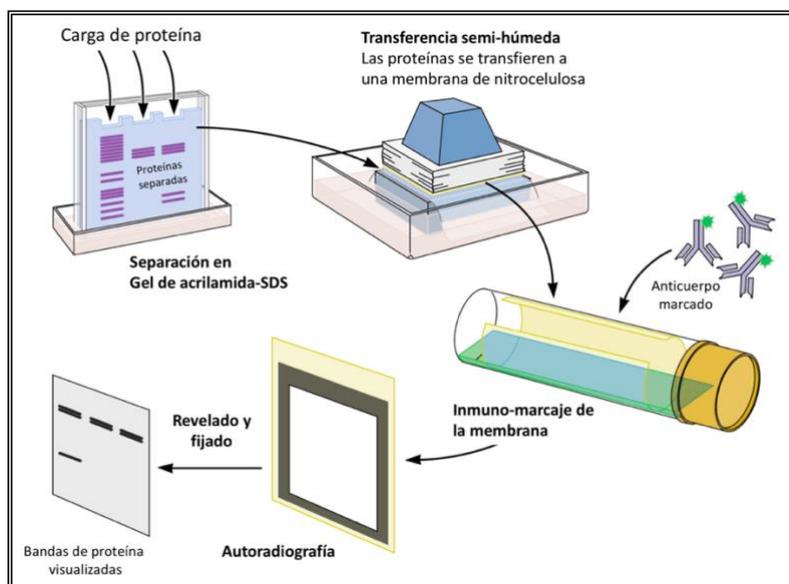


Figura 35. Esquema de la técnica de Western Blot

En la siguiente tabla (Tabla 12) se muestran los anticuerpos primarios y secundarios utilizados.

Tabla 12. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados para Western Blotting

Anticuerpo	Origen	Referencia	Dilución
p-ERK1/2	Conejo	Cell Signaling (4376S)	1:1000
ERK1/2	Conejo	Cell Signaling (4695)	1:1000
p-p38	Conejo	Cell Signaling (4631)	1:1000
p-38	Conejo	Cell Signaling (9212)	1:1000
MKP1	Conejo	Assay Biotech (B1099)	1:1000
β -actina	Ratón	Sigma-Aldrich (A1978)	1:10000
GR-Ser-226	Conejo	Novus Biologicals (NB100-92540)	1:1000
M1	Conejo	Sigma (M9808)	1:1000
M2	Conejo	Sigma (M9558)	1:1000
M3	Conejo	Sigma (0194)	1:1000
M4	Ratón	Merck Millipore (MAB1576)	1:1000
M5	Conejo	Novus Biologicals (NBP1-00907)	1:1000
GR α	Ratón	BD Biosciences (611227)	1:1000

El método utilizado para la detección de proteínas es un método basado en la detección de quimioluminiscencia y para ello se utilizaron los reactivos *ECL Plus* (Amersham GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido). La expresión de proteínas se cuantificó mediante densitometría en relación con la expresión de anticuerpos normalizada utilizando el software GeneSnap versión 6.08. Los resultados se expresan como proporciones de los controles endógenos según sea apropiado.

4.2.3.3 Análisis de la actividad de fosfoinositol 3-quinasa-delta (PI3K δ)

Para medir la actividad de la fosfatidilinositol 3-Quinasa δ (PI3K δ), se aislaron neutrófilos de pacientes con EPOC y luego se incubaron durante 1 h con:

- bromuro de aclidinio (10 nM),
- atropina (100 nM),
- LY294002 (inhibidor de PI3K δ) (1 μ M),
- metoctramina (antagonista selectivo de M2) (1 μ M) o
- pFHHSid (antagonista selectivo M3) (1 μ M).

Las células se estimularon con LPS durante 30 min y luego se centrifugaron. Se extrajo la proteína total y se midió la cantidad usando el *Bio-Rad Assay* (*Bio-Rad Laboratories Ltd., Hemel Hempstead, Reino Unido*) para asegurar cantidades iguales (500 μ g) en la reacción de inmunoprecipitación con anticuerpo anti-PI3-quinasa δ (*p110 δ ; ab32401; Abcam, Cambridge, Reino Unido*).

La actividad de PI3K se midió utilizando el kit de ELISA de actividad de PI3K (n $^{\circ}$ de cat. *K-1000s; Echelon Bioscience, Salt Lake City, UT, EE. UU.*), de acuerdo con el protocolo del fabricante. En resumen, las reacciones de PI3-K se realizaron con el sustrato fisiológico PI3-K de clase I PI(4,5)P₂ (PIP₂). Las reacciones enzimáticas, los estándares de PIP₃ y los controles se mezclaron y se incubaron con la proteína de unión a PIP₃, que es altamente específica y sensible a PIP₃. Esta mezcla se transfirió a una microplaca recubierta con PIP₃ para la unión competitiva y luego se detectó la cantidad de PIP₃ producida por PI3-K, utilizando un detector secundario ligado a peroxidasa y detección colorimétrica, comparando las reacciones enzimáticas con una curva estándar de PIP₃. Los resultados se expresan como PI(3,4,5) P₃ pmol por mg de proteína.

4.2.4 Análisis estadístico de los resultados

Los datos fueron sometidos a un análisis paramétrico, con $p < 0.05$ considerado indicativo de significación estadística. Los datos paramétricos se expresan como la media \pm DE de n experimentos.

Las comparaciones entre 2 grupos fueron analizadas empleando una prueba *t de Student* apareada para muestras dependientes o un t-test no pareado para muestras independientes.

Las comparaciones múltiples fueron analizadas mediante un análisis de varianza unidireccional o bidireccional (ANOVA) seguido de un test *post hoc* de Bonferroni. La concentración de bromuro de aclidinio, propionato de fluticasona, que producen una inhibición del 50% (IC50) se calculó a partir de las curvas de concentración-respuesta mediante regresión no lineal en los neutrófilos de individuos sanos y de los pacientes con EPOC.

5 RESULTADOS

5.1 Población estudiada

Las características clínicas de la población de estudio se muestran en la tabla 13

Tabla 13: Características clínicas de la población de estudio

	Sanos (n=37)	EPOC estables (n= 52)	EPOC exacerbados (n= 16)
Edad (años)	66.1 ± 6	65.1 ± 14	63.8 ± 8.4
Sexo (H/M)	27/10	35/17	12/4
Consumo tabaco (años-paquete)	0	35.2±6*	42.3 ± 13*
FEV ₁ , % pred	98 ± 3	53.2 ± 3*	38.0 ± 13*
FVC, % pred	96 ± 4	90.2 ± 6	89.5 ± 8
FEV ₁ /FVC %	98 ± 3	50.1 ± 6*	46.2 ± 9*
EPOC leve, nº pacientes	0	0	0
EPOC moderado nº pacientes (%)	0	36 (69.23)	3 (18.75)
EPOC grave, nº pacientes (%)	0	16 (30.77)	10 (62.5)
EPOC muy grave, nº pacientes (%)	0	0	3 (18.75)
Tratados con CI, nº	0	26	16
Tratados con teofilinas, nº	0	0	0
Tratados con LABA, nº	0	49	16
Tratados con LAMA, nº	0	41	13
Neutrófilos totales en sangre periférica	4.2 ± 0.3 x 10 ⁹ /L	8.2 ± 1.3 x 10 ⁹ /L*	9.9 ± 0.2 x 10 ⁹ /L*

Los datos son la media ± DE. * $p < 0.05$ relacionado con sujetos sanos.

5.2 Activación basal de los componentes del sistema colinérgico no neuronal en neutrófilos de pacientes con EPOC

El ARNm y la expresión proteica de los receptores muscarínicos M2 y M4 fueron los más expresados de forma basal en los neutrófilos, tanto de sangre periférica como de esputo, de los individuos sanos y de los pacientes con EPOC estable, siendo la expresión significativamente mayor en los pacientes EPOC estables respecto a los individuos sanos y además se sobre-expresaron de manera significativa en los neutrófilos de pacientes con EPOC

exacerbada, respecto a los otros dos grupos. La expresión de M3 y M5 fue débil en los 3 grupos pero sí que hubo diferencias sobre todo de M5 en los neutrófilos de sangre periférica predominando en los pacientes con EPOC exacerbada respecto a los otros dos grupos y en esputo respecto a los EPOC estable. La expresión de M1 estuvo prácticamente ausente en todos los grupos (Figura 36)

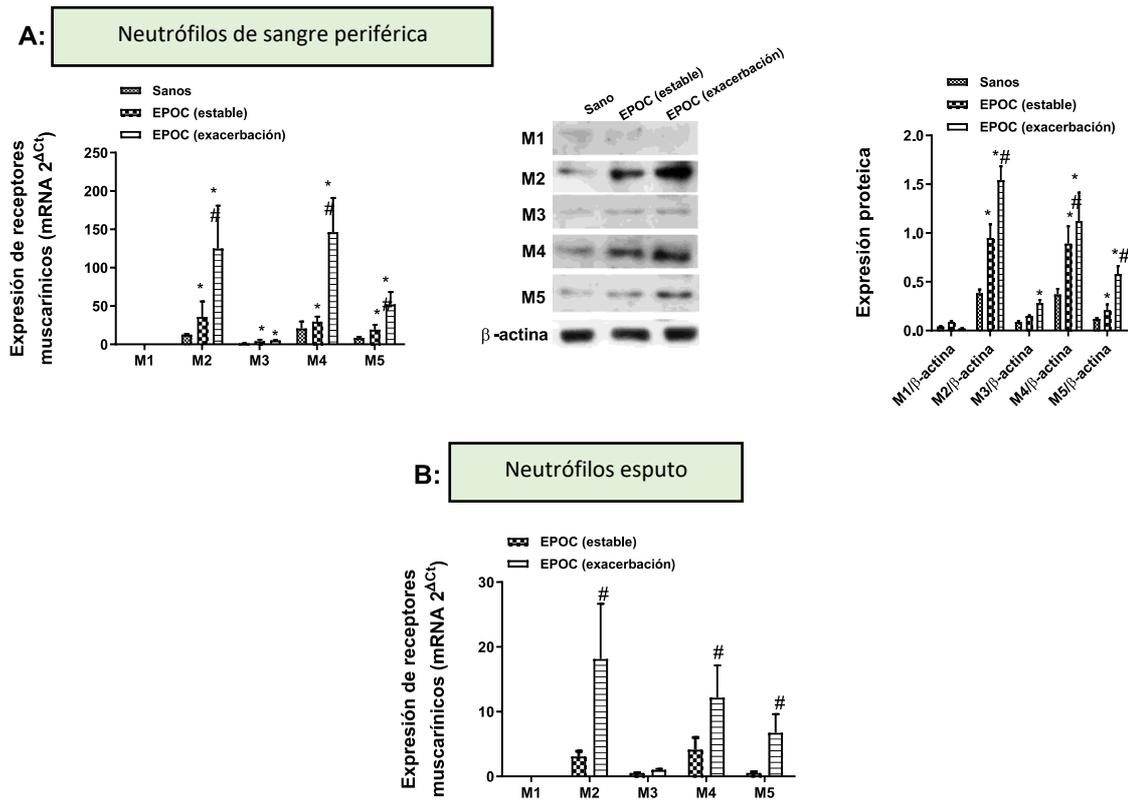


Figura 36. Expresión de receptores del sistema colinérgico no neuronal en neutrófilos de sangre periférica (A) y esputo (B) de voluntarios sanos, EPOC estable y EPOC exacerbada. La expresión de ARNm fue determinada por RT-PCR y cuantificada según el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ utilizando el GAPDH como control endógeno y la expresión proteica fue realizada mediante Western Blott y cuantificada basándose en la intensidad de la proteína en estudio respecto al control interno con β -actina. Los datos están presentados como medias \pm DE. ANOVA unidireccional seguida de test *post hoc* de Bonferroni. * $p < 0.05$ respecto a individuos sanos; # $p < 0.05$ respecto a EPOC estables.

La acetilcolintransferasa (ChAT), enzima responsable de la generación de acetilcolina intracelular y el transportador vesicular de acetilcolina (VAChT), responsable de cargar acetilcolina en orgánulos secretorios, fueron detectadas en los neutrófilos de sangre periférica de individuos sanos y aumentó significativamente en pacientes con EPOC sin diferencias entre estables y exacerbados, sin embargo sí que se observaron diferencias en la expresión de ambas en los neutrófilos del esputo entre EPOC estables y exacerbados (Figura 37). La OCT1

(proteína catiónica orgánica-1) que es la proteína transmembrana que transporta la acetilcolina, aunque se detectó en niveles bajos, aumentó en pacientes con EPOC respecto a los controles sanos, mientras que la OCT2, OCT3 y el ChT1 (transportador de acetilcolina de alta afinidad) no se detectaron en ningún grupo (Figura 37).

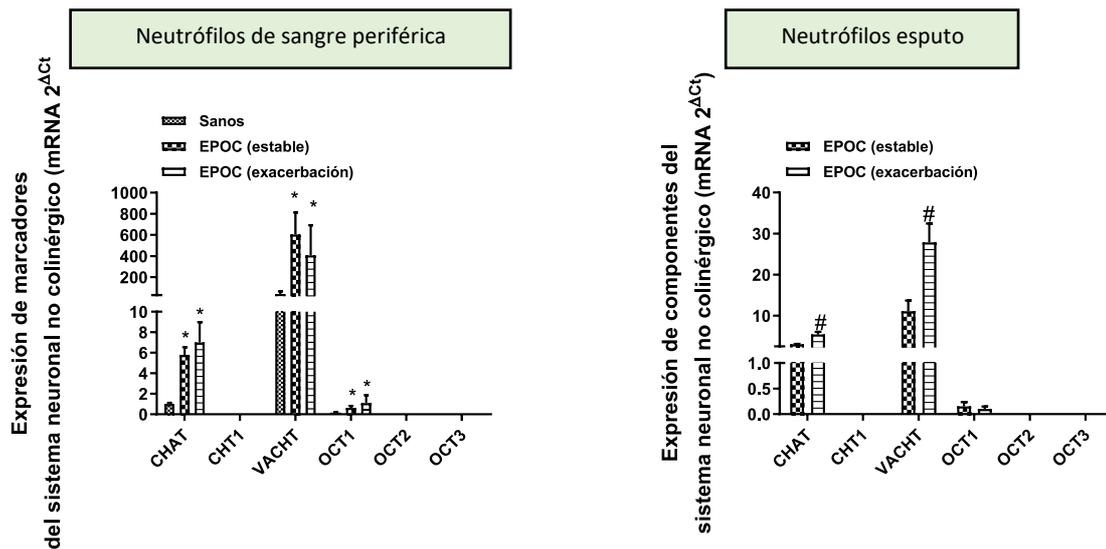


Figura 37. Expresión de componentes del sistema colinérgico no neuronal en neutrófilos de sangre periférica y esputo de voluntarios sanos, EPOC estable y EPOC exacerbada. La expresión de ARNm fue determinada por RT-PCR y cuantificada según el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ utilizando el GAPDH como control endógeno. Los datos están presentados como medias \pm DE. ANOVA unidireccional seguida de test *post hoc* de Bonferroni. * $p < 0.05$ respecto a individuos sanos; # $p < 0.05$ respecto a EPOC estables.

5.3 Expresión basal de otros receptores y MKP1

En condiciones basales el adrenorreceptor beta 2 (β_2 -ADR) se detectó en los neutrófilos de donantes sanos y se sobreexpresó en neutrófilos de pacientes con EPOC con diferencias entre estables y exacerbados, tanto en sangre periférica como en esputo, mientras que no hubo diferencia en la expresión de $GR\alpha$ entre los grupos. Por el contrario, MKP1 se reguló negativamente en los neutrófilos de pacientes con EPOC estable y exacerbada con respecto a los individuos sanos, lo que podría explicar la falta de sensibilidad a los corticoesteroides (Figura 38).

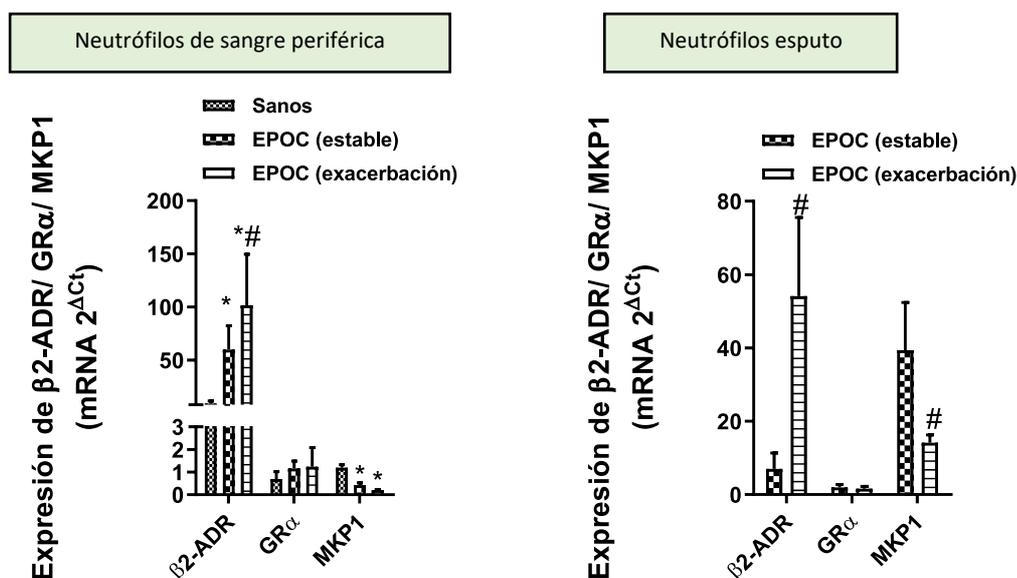


Figura 38. Expresión basal de β_2 -ADR, GR α y MKP-1 en neutrófilos de sangre periférica y esputo de voluntarios sanos, EPOC estable y EPOC exacerbada. La expresión de ARNm fue determinada por RT-PCR y cuantificada según el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ utilizando el GAPDH como control endógeno. Los datos están presentados como medias \pm DE. ANOVA unidireccional seguida de test *post hoc* de Bonferroni. * $p < 0.05$ respecto a individuos sanos; # $p < 0.05$ respecto a EPOC estables.

5.4 Análisis de la activación del sistema colinérgico no neuronal en los neutrófilos de pacientes EPOC

Para explorar la activación funcional del sistema muscarínico en los neutrófilos de los pacientes EPOC se utilizó el agonista del receptor muscarínico carbacol.

El carbacol (10 μ M; CCh, agonista de receptor muscarínico) indujo la liberación de IL-8 en los neutrófilos aislados de sangre periférica y de esputo de los pacientes con EPOC. Este efecto fue inhibido por el bromuro de aclidinio de forma concentración-dependiente, sin embargo no fue así tras la exposición a hexametonio (antagonista nicotínico) lo que descartó la participación de los receptores nicotínicos.

Para eliminar la posible contribución de la acetilcolina extracelular a la activación de los neutrófilos, se añadió acetilcolinesterasa 1 h antes y nuevamente durante la estimulación de los neutrófilos de sangre periférica con LPS, o con EHT los procedentes del esputo. La acetilcolinesterasa atenuó la liberación de IL-8 inducida por LPS en los neutrófilos de sangre periférica y por EHT en los neutrófilos de esputo de pacientes con EPOC, lo que sugiere un papel de la acetilcolina extracelular en la activación de neutrófilos de estos pacientes (Figura 39).

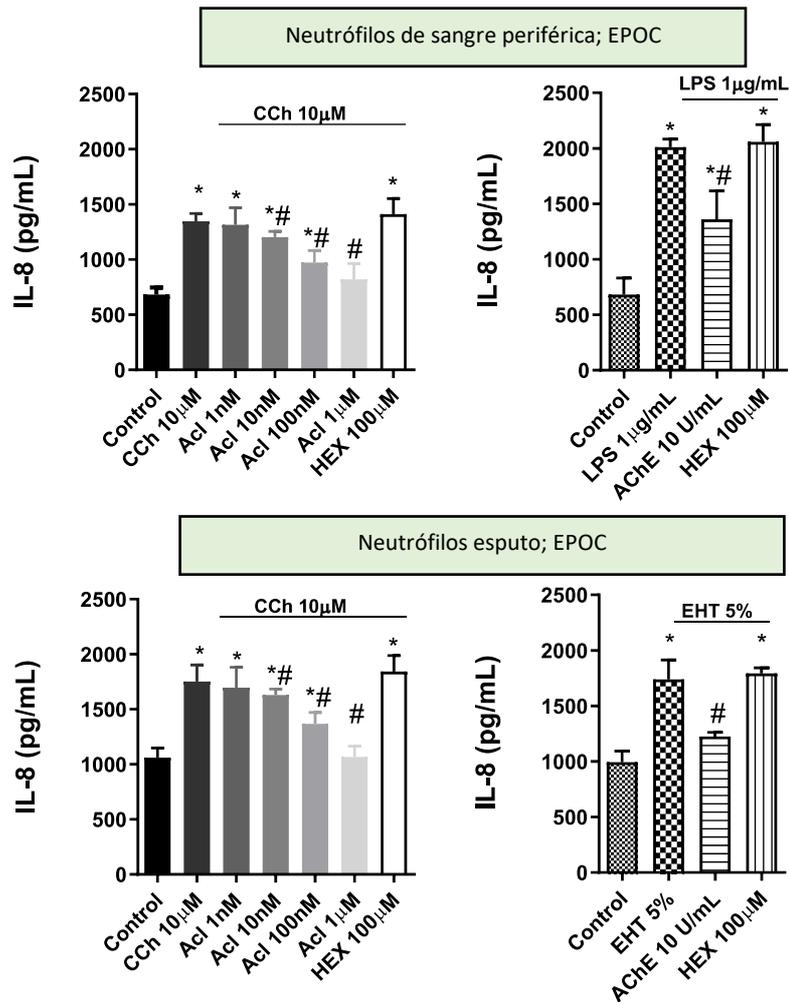


Figura 39. Activación de neutrófilos de pacientes EPOC por mediadores colinérgicos. Los neutrófilos de sangre periférica y de esputo de pacientes EPOC fueron incubados con bromuro de acilidinio (Acl) a diferentes concentraciones, hexametonio (HEX) o acetilcolinesterasa (AChE) durante 1 h y luego fueron estimulados con carbacol (CCh), o con LPS o EHT durante 6h. Los resultados están expresados como medias \pm DE de $n = 4$ (se utilizaron poblaciones celulares de 4 pacientes EPOC en experimentos independientes realizados por triplicado). ANOVA bidireccional seguida de test *post hoc* de Bonferroni. * $p < 0.05$ respecto control no estimulado; # $p < 0.05$ respecto a células estimuladas.

5.5 Inhibición de la respuesta inflamatoria en los neutrófilos por bromuro de acilidinio y propionato de fluticasona por separado

En los neutrófilos de sangre periférica de controles sanos, el propionato de fluticasona (0,1 nM – 1 μM) inhibió de manera dependiente la secreción de citocinas inducida por LPS (1 μg/ml), suprimiendo casi por completo la secreción de IL-8, MMP9, GM-CSF y en menor medida la secreción de IL-1β y CCL-5 (Figura 40, Tabla 14). Por el contrario, el efecto inhibitor del

propionato de fluticasona en los neutrófilos de los pacientes con EPOC se vio disminuido a menos de la mitad del % de efecto máximo observado en los neutrófilos de los controles sanos; a excepción de la quimiocina CCL-5 con la que no hubo diferencias (Figura 40 y Tabla 14). El bromuro de aclidinio fue menos efectivo que el propionato de fluticasona para inhibir la secreción de citocinas en neutrófilos de individuos sanos, logrando 72%, 50%, 46%, 39% y 33% de la inhibición máxima para IL-8, MMP9, IL-1 β , CCL-5 y GM-CSF, respectivamente; sin embargo, en los neutrófilos de pacientes con EPOC, mostró efectos inhibitorios similares al observado en los neutrófilos de individuos sanos.

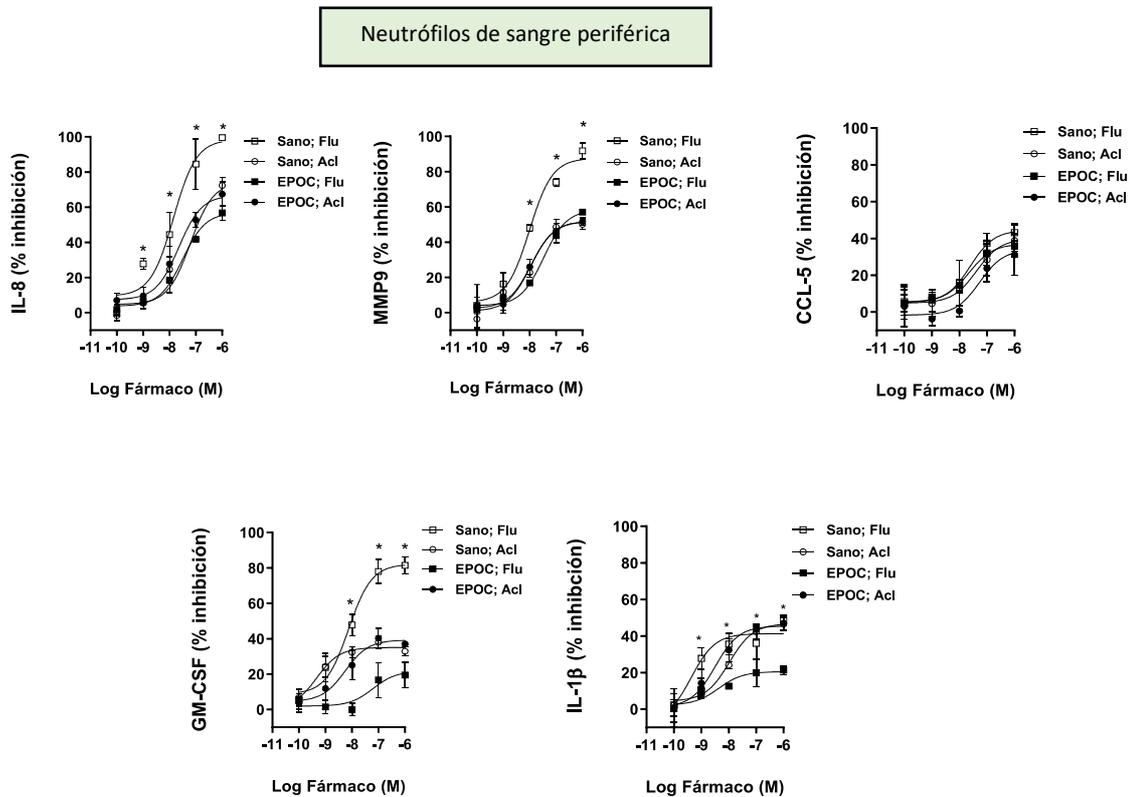


Figura 40. Efecto antiinflamatorio del bromuro de aclidinio y propionato de fluticasona en neutrófilos de sangre periférica de individuos sanos y pacientes EPOC. Se muestra el porcentaje de inhibición concentración dependiente de la liberación de IL-8, MMP9, CCL-5, GM-CSF e IL-1 β por los neutrófilos de sangre periférica de individuos sanos y pacientes EPOC por bromuro de aclidinio (Acl) y propionato de fluticasona (Flu) tras ser estimulados por LPS. Los neutrófilos fueron preincubados durante 1 hora con Acl (0.1nM-1 μ M) y Flu (0.1nM-1 μ M) y posteriormente estimulados con LPS (1 μ g/ml) durante 6h. Los resultados se expresan como medias \pm DE (n=4 por cada grupo, se utilizaron poblaciones celulares de 4 pacientes EPOC y de 4 individuos sanos en experimentos independientes realizados por triplicado) ANOVA bidireccional seguida de test *post hoc* de Bonferroni * p < 0.05 respecto neutrófilos de pacientes EPOC.

En los neutrófilos de esputo de pacientes con EPOC estimulados con EHT al 5%, el propionato de fluticasona logró menos del 40% de la inhibición máxima de IL-8 (Figura 41, Tabla 14), mientras que el bromuro de aclidinio inhibió la secreción de IL-8 inducida por EHT con potencia similar y alcanzando efectos máximos similares a los observados en los neutrófilos de sangre

periférica de los controles sanos y con EPOC. El bromuro de acclidinio también inhibió significativamente la secreción de IL-8 basal en células de esputo no estimuladas (Figura 41, Tabla 14).

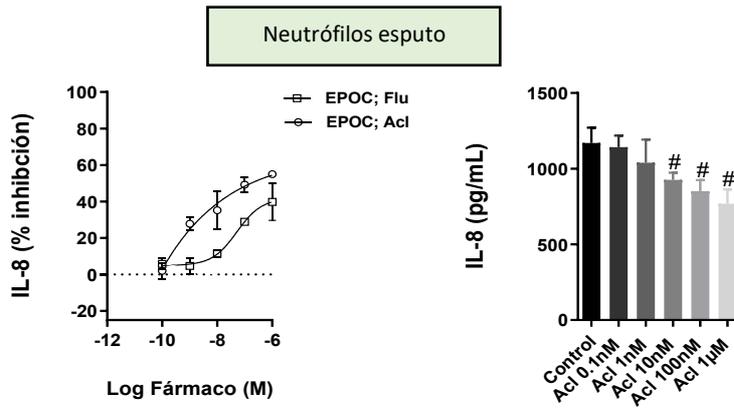


Figura 41. Efecto antiinflamatorio del bromuro de acclidinio y propionato de fluticasona en neutrófilos de esputo de pacientes EPOC. Se muestra el porcentaje de inhibición (concentración dependiente) de la liberación de IL-8 por los neutrófilos del esputo de pacientes EPOC por bromuro de acclidinio (Acl), propionato de fluticasona (Flut), salmeterol (Salm) y formoterol (Form) tras ser estimulados por EHT. Los neutrófilos fueron preincubados durante 1 hora con Acl (0.1nM-1 µM), Flu (0.1nM-1 µM), Salm (0.01-100 nM) y posteriormente estimulados con EHT 5% durante 6h. En la gráfica de la derecha se muestra la inhibición del Acl en células no estimuladas. Los resultados se expresan como medias ± DE (n=4, se utilizaron poblaciones celulares de 4 pacientes EPOC en experimentos independientes realizados por triplicado) ANOVA bidireccional seguida de test *post hoc* de Bonferroni # p < 0.05 respecto a valores basales

Tabla 14. Porcentaje máximo de inhibición de la liberación de IL-8, MMP-9, CCL-5, GM-CSF e IL-1β de neutrófilos de sujetos sanos y pacientes con EPOC

	Estímulo	Tratamiento	% Inhibición Máxima (neutrófilos sangre periférica)		% Inhibición Máxima (neutrófilos esputo)
			Sanos	EPOC	EPOC
IL-8	LPS	Acl	72.4 ± 8.4	67.4 ± 12.1	
		Flut	99.5 ± 1.9 [#]	56.7 ± 7.6 ^{**}	
MMP-9	LPS	Acl	50.2 ± 5.4	51.6 ± 3.35	
		Flut	91.8 ± 7.7 [#]	56.9 ± 9.9 [*]	
CCL-5	LPS	Acl	38.8 ± 14.8	31.15 ± 19.5	
		Flut	43.1 ± 8.1	35.8 ± 12.1	
GM-CSF	LPS	Acl	32.8 ± 4.8	37.1 ± 2.47	
		Flut	81.4 ± 20.4 [#]	19.4 ± 12.8 ^{**}	
IL-1β	LPS	Acl	46.6 ± 5.8	47.3 ± 6.9	
		Flut	49.3 ± 3.3 [#]	21.3 ± 4 ^{**}	
IL-8	EHT	Acl			54.9 ± 1.9
		Flut			39.7 ± 17.5 [#]

Los neutrófilos se incubaron con acclidinio (Acl; 0,1 nM-1 µM), fluticasona (Flut; 0,1 nM-1 µM) en respuesta a LPS (1 µg / ml) o extracto de humo de cigarrillo (EHT 5%). Se determinaron los niveles de diferentes citocinas en el sobrenadante celular y se calculó el % máximo de inhibición. Los valores son la media ± DE de 3 experimentos independientes realizados por triplicado. * p < 0.05 frente a valores en individuos sanos; #p < 0.05 frente a grupo Acl.

5.6 Efecto de la combinación de bromuro de acilidinio y propionato de fluticasona sobre la respuesta de los neutrófilos

Se analizó si los efectos antiinflamatorios del bromuro de acilidinio y el propionato de fluticasona son aditivos utilizando concentraciones subóptimas de ambos fármacos en función de sus curvas inhibitoras concentración-dependiente.

En los neutrófilos de sangre periférica, la combinación de propionato de fluticasona (1 nM) y bromuro de acilidinio (10 nM) mostró efectos aditivos, lo que resultó en una inhibición de casi el 50% de IL-8, CCL-5, GM-CSF e IL-1 β inducidas por LPS, pero este efecto aditivo no se observó con la MMP9 (Figura 42). Las concentraciones subóptimas de propionato de fluticasona en combinación con 100 nM del inhibidor de M2 metocramina reprodujeron los efectos aditivos observados con el bromuro de acilidinio, mientras que este no fue el caso con el inhibidor de M3 pFHHSid (Figura 42). Se obtuvieron resultados similares en los neutrófilos de esputo de pacientes con EPOC.

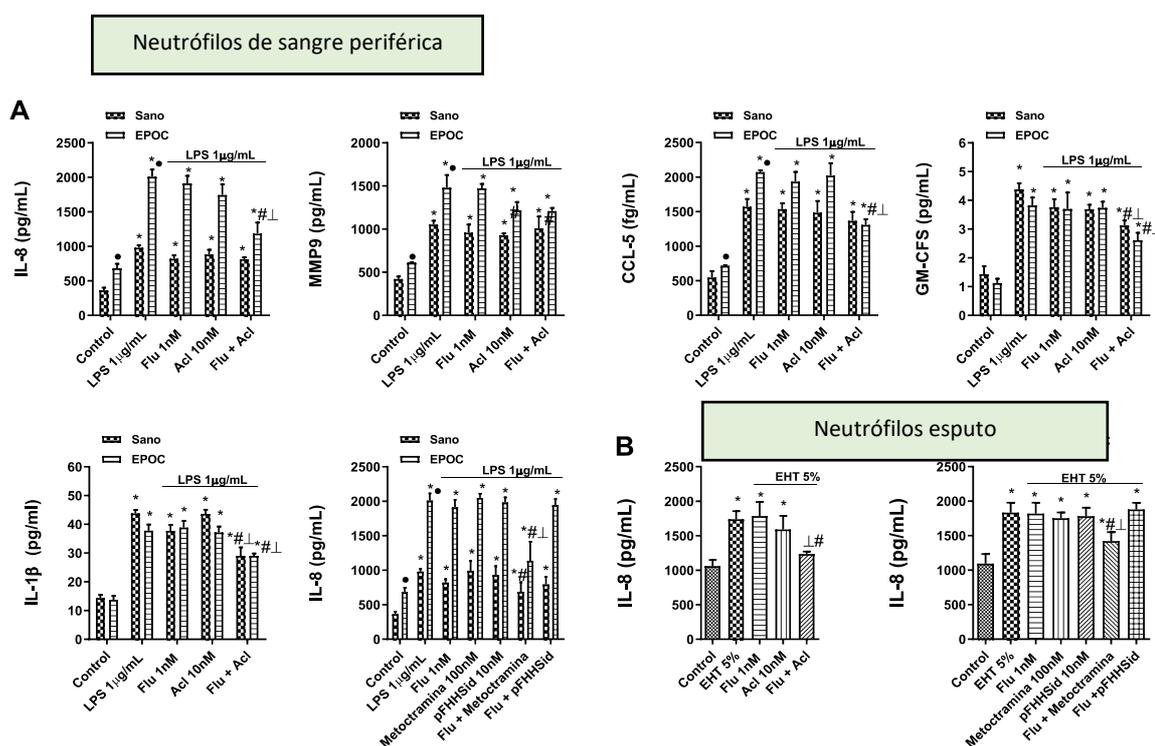


Figura 42. Efectos de la combinación de acilidinio y fluticasona en la liberación de citoquinas sobre los neutrófilos de voluntarios sanos y pacientes EPOC. **A** Neutrófilos de sangre periférica y **B** de esputo. Los neutrófilos fueron incubados durante 1 h con Acl (10nM), Flut (1nM) o ambos y después estimulados durante 6h con LPS (1 μ g/ml) los de sangre periférica y con EHT 5% los del esputo. Las citoquinas se midieron en el sobrenadante. Los resultados se expresan como medias \pm DE (n=4 por cada grupo, se utilizaron poblaciones celulares de 4 pacientes EPOC y de 4 individuos sanos en experimentos independientes realizados por triplicado). ANOVA bidireccional seguida de test *post hoc* de Bonferroni *p < 0.05 frente a células no estimuladas; #p < 0.05 frente a células estimuladas; \perp p < 0.05 frente a monoterapia

5.7 Mecanismos implicados en la mejora del efecto antiinflamatorio (efecto aditivo) de la combinación de propionato de fluticasona con bromuro de acclidinio en los neutrófilos de pacientes EPOC

Para analizar cuáles son los mecanismos implicados en el efecto aditivo antiinflamatorio de la combinación de bromuro de acclidinio con propionato de fluticasona, y que consiguen atenuar la insensibilidad a los esteroides, se analizaron las moléculas implicadas en los procesos de corticorresistencia mediante la determinación de la expresión de ARNm de MIF, HDAC2, GR α , MKP-1, CRISPLD2 y GILZ en los neutrófilos de sangre periférica de pacientes EPOC e individuos sanos. Para ello los neutrófilos fueron incubados con bromuro de acclidinio, propionato de fluticasona y la combinación de ambos fármacos y posteriormente estimulados con LPS y se compararon los resultados obtenidos frente a los obtenidos de los neutrófilos no estimulados y frente a monoterapia con propionato de fluticasona.

De esta manera, en los neutrófilos de sangre periférica de pacientes con EPOC, la combinación de propionato de fluticasona y bromuro de acclidinio no afectó la expresión MIF, HDAC2 ni GR α (Figura 43).

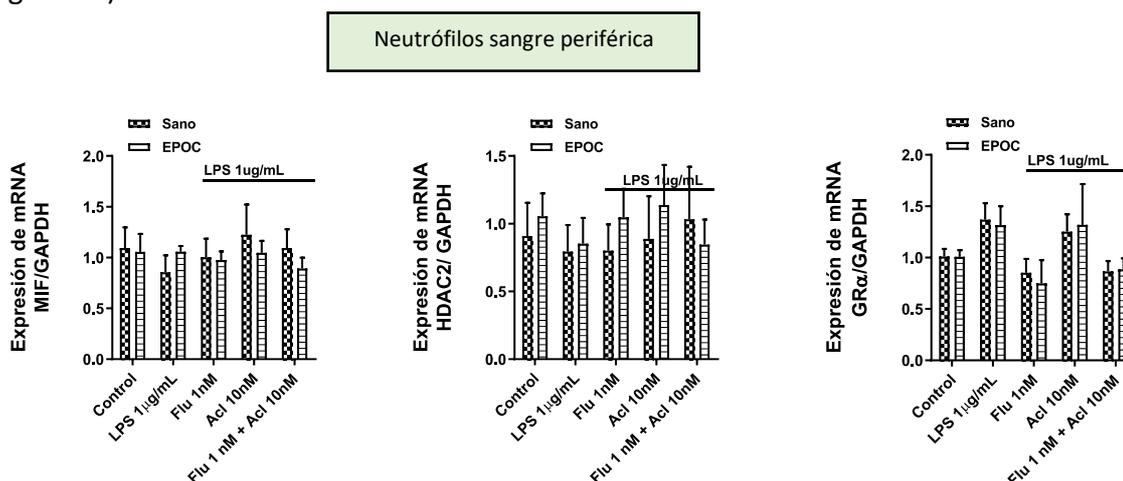


Figura 43. Efectos de la bromuro de acclidinio (Acl) y propionato fluticasona (Flu) en monoterapia y combinados en la expresión de MIF, HDAC2, GR α en los neutrófilos de sangre periférica de EPOC e individuos sanos. Los neutrófilos de sangre periférica aislados de pacientes con EPOC se sembraron en placas de 24 pocillos, se incubaron con Acl, Flut o una combinación de los mismos durante 1 h, y se estimularon con LPS durante 6 h. Los moduladores de la eficacia de los corticosteroides se cuantificaron mediante RT-PCR utilizando el método $2^{-\Delta C_t}$, con la expresión del gen GAPDH como control interno. Los resultados se expresan como la media \pm DE (n=4 por cada grupo, se utilizaron poblaciones celulares de 4 pacientes EPOC y de 4 individuos sanos en experimentos independientes realizados por triplicado). ANOVA bidireccional seguida de test *post hoc* de Bonferroni * p < 0.05 frente a células no estimuladas; #p < 0.05 frente a monoterapia con Fluticasona

Sin embargo sí que se observó un efecto aditivo de ambos fármacos en la expresión de los genes inducibles por corticosteroides MKP-1, CRISPLD2 y GILZ, ya que su expresión fue mayor que la alcanzada con monoterapia con propionato de fluticasona (Figura 44).

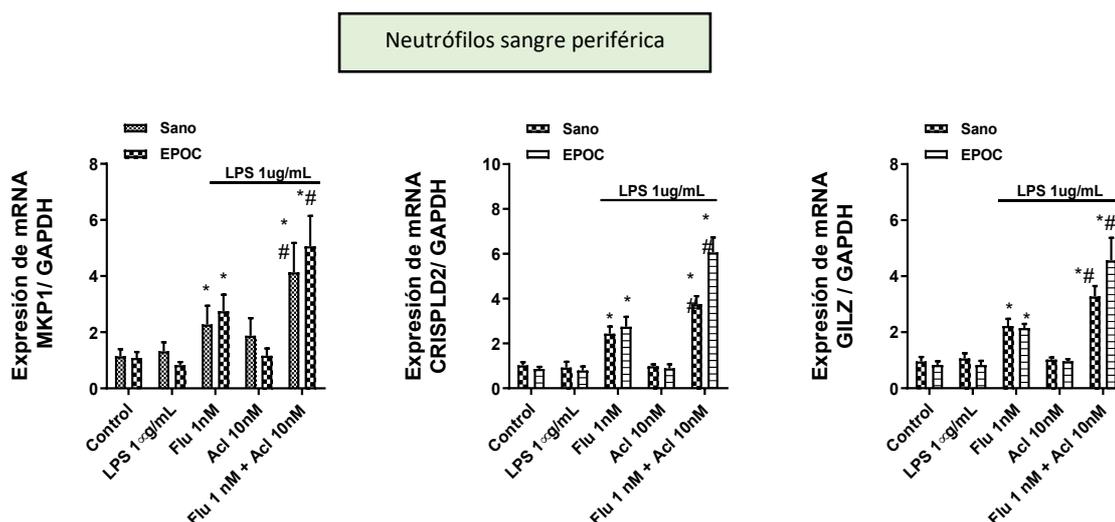


Figura 44. Efectos del bromuro de aclicidinio (Acl) y propionato fluticasona (Flu) en monoterapia y combinados en la expresión de MKP-1 CRISPLD2, GILZ en los neutrófilos de sangre periférica de EPOC e individuos sanos. Los neutrófilos de sangre periférica aislados de pacientes con EPOC se sembraron en placas de 24 pocillos, se incubaron con Acl, Flut o una combinación de los mismos durante 1h, y se estimularon con LPS durante 6 h. Los moduladores de la eficacia de los corticosteroides se cuantificaron mediante RT-PCR utilizando el método $2^{-\Delta Ct}$, con la expresión del gen GAPDH como control interno. Los resultados se expresan como la media \pm DE (n=4 por cada grupo, se utilizaron poblaciones celulares de 4 pacientes EPOC y de 4 individuos sanos en experimentos independientes realizados por triplicado). ANOVA bidireccional seguida de test *post hoc* de Bonferroni. * $p < 0.05$ frente a células no estimuladas; # $p < 0.05$ frente a monoterapia con Fluticasona

Para explicar este efecto aditivo entre aclicidinio y fluticasona, exploramos el efecto de esta combinación en la activación del gen del elemento de respuesta a los glucocorticoides (GRE), ya que los glucocorticoides ejercen su efecto antiinflamatorio al unirse mediante su receptor (GR-GC) a la región GRE e induciendo así la transcripción de genes antiinflamatorios como MKP-1, GILZ, CRISPLD2...

Para explorar este aumento en la actividad del gen de GRE se transfectaron células epiteliales bronquiales Beas2B con un constructo reportero GRE. El tratamiento de estas células reporteras 2xGRE-Beas2B con fluticasona (0,1 nM – 1 μ M) durante 6 h indujo un aumento en la transcripción de GRE de una manera dependiente de la concentración de corticoide (Figura 45A). Ni el bromuro de aclicidinio ni la atropina en monoterapia modificaron la señal GRE (Figura

45A), mientras que la señal se incrementó significativamente con combinaciones de concentraciones crecientes de bromuro de acilidinio, atropina o el inhibidor de PI3K (LY294002) combinadas con una concentración fija (1 nM) de propionato de fluticasona (Figura 45C). Se obtuvieron resultados similares con combinaciones de concentraciones fijas de bromuro de acilidinio (10 nM) o LY294002 (1 nM) con concentraciones crecientes de propionato de fluticasona (Figura 45B).

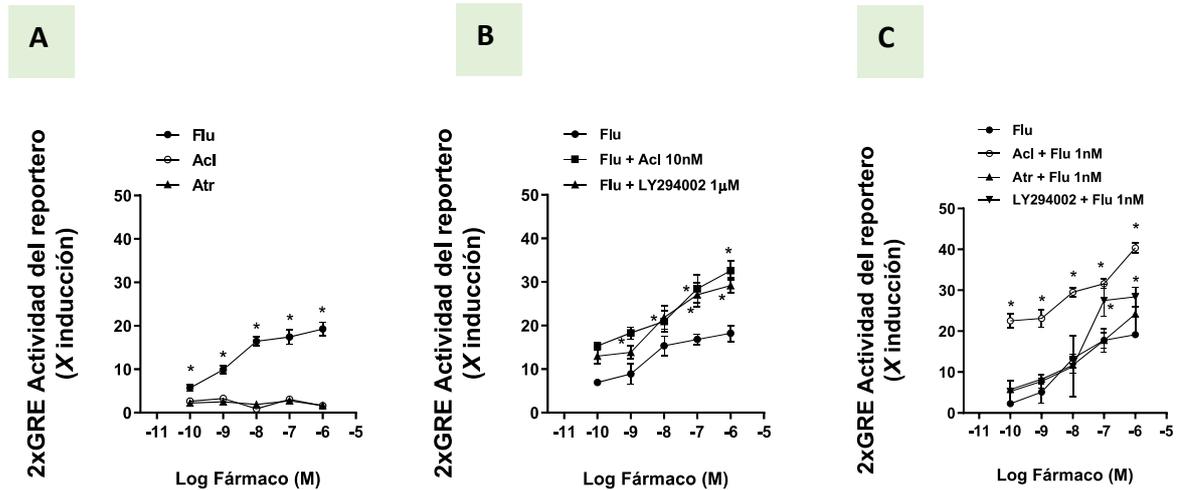


Figura 45. Efectos del bromuro de acilidinio (Acl), propionato de fluticasona, atropina (ATR), LY294002 (inhibidor de PI3K) y sus combinaciones con fluticasona en la señal del GRE. Los resultados se expresan como las medias \pm DE de 3 experimentos independientes repetidos por triplicado. ANOVA unidireccional seguida de test *post hoc* de Bonferroni * $p < 0.05$ frente a monoterapia con fluticasona en figura B y C y frente a acilidinio y atropina en figura A

Con el objetivo de analizar que receptor muscarínico funcional es el más implicado en la respuesta inflamatoria, se empleó el método de siRNA (mecanismo de silenciamiento post-transcripcional de genes específicos) para M2 y M3.

De este modo, se observó que en las células siRNA-M2 (con el receptor M2 silenciado), la activación de GRE inducida por propionato de fluticasona fue mayor que en las células siRNA-M3 o siRNA de control (-), lo que sugiere la participación de los receptores M2 (Figura 46B) en la generación de corticorresistencia.

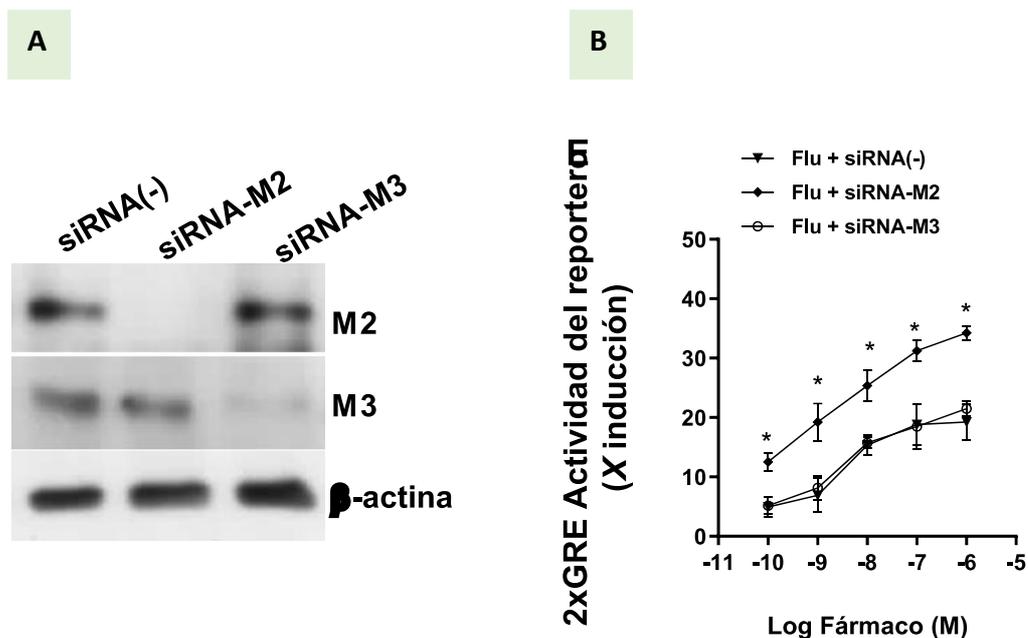


Figura 46. Efecto del propionato de fluticasona en la señal del GRE en función del receptor muscarínico silenciado. A. Las células bronquiales Beas2b fueron transfectadas con siARN-M2, siARN-M3 y siARN control negativo y se verificó el silenciamiento del gen específico mediante análisis de Western Blot. **B.** Las células Beas2b transfectadas con el gen indicador GRE y sometidas a siARN de los genes que codifican los receptores muscarínicos M2 y M3 se estimularon con Flut. Los resultados se expresan como la media \pm DE de tres experimentos independientes realizados por triplicado. ANOVA unidireccional seguida de test *post hoc* de Bonferroni. * $p < 0.05$ frente a M2 no silenciado

El bromuro de aclidinio, atropina, metoctramina (antagonista selectivo M2) y LY294002 (inhibidor de PI3K), pero no pFHHSid (antagonista selectivo M3), inhibieron la actividad de PI3K δ inducida por LPS en los neutrófilos de sangre periférica de los pacientes con EPOC (Figura 47) lo que demuestra que la activación de la vía PI3K δ en los neutrófilos de estos pacientes puede estar mediada por el estímulo de los receptores M2.

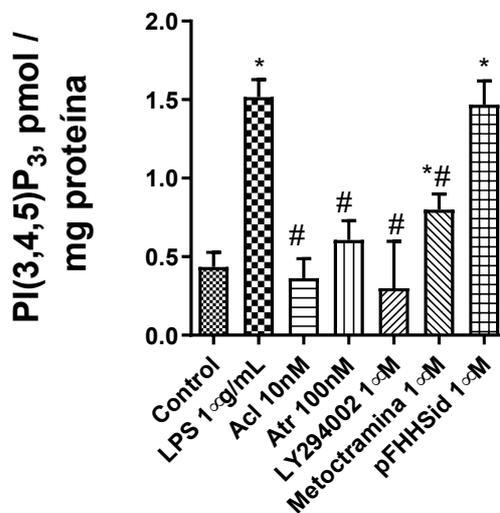


Figura 47. Actividad de PI3Kδ en neutrófilos de sangre periférica de pacientes EPOC tras estimularlos con LPS e incubarlos con aclidinio, atropina, LY294002 (inhibidor PI3K), metoctramina (antagonista selectivo M2) y pFHHSid (antagonista selectivo M3) Los resultados se expresan como la media ± DE (n = 4, se utilizaron poblaciones celulares de 4 pacientes EPOC en experimentos independientes realizados por triplicado). ANOVA bidireccional seguida de test *post hoc* de Bonferroni. * p < 0.05 frente a células no estimuladas; #p < 0.05 frente a células estimuladas por LPS.

Y finalmente se demostró un efecto aditivo antiinflamatorio de la combinación de propionato de fluticasona y bromuro de aclidinio en los neutrófilos de sangre periférica de pacientes con EPOC estimulados con LPS ya que la combinación de ambos fármacos:

- potenció la inhibición de p-ERK1/2, p-p38 (que son vías de transcripción pro-inflamatorias) y de GRser226 (fosforilación del receptor de glucocorticoides alfa (GRα) en la serina 226 (Ser226) que disminuye la capacidad de translocación nuclear de GRα),
- y aumentó la expresión de MKP1 (que es la protein-quinasa encargada de controlar el proceso inflamatorio en la vía aérea mediante *feed-back* negativo sobre el resto de vías de señalización MAKPs pro-inflamatorias (ERK, JNK y p38 MAPK)) por encima del nivel alcanzado con cualquiera de los fármacos por separado (Figura 48).

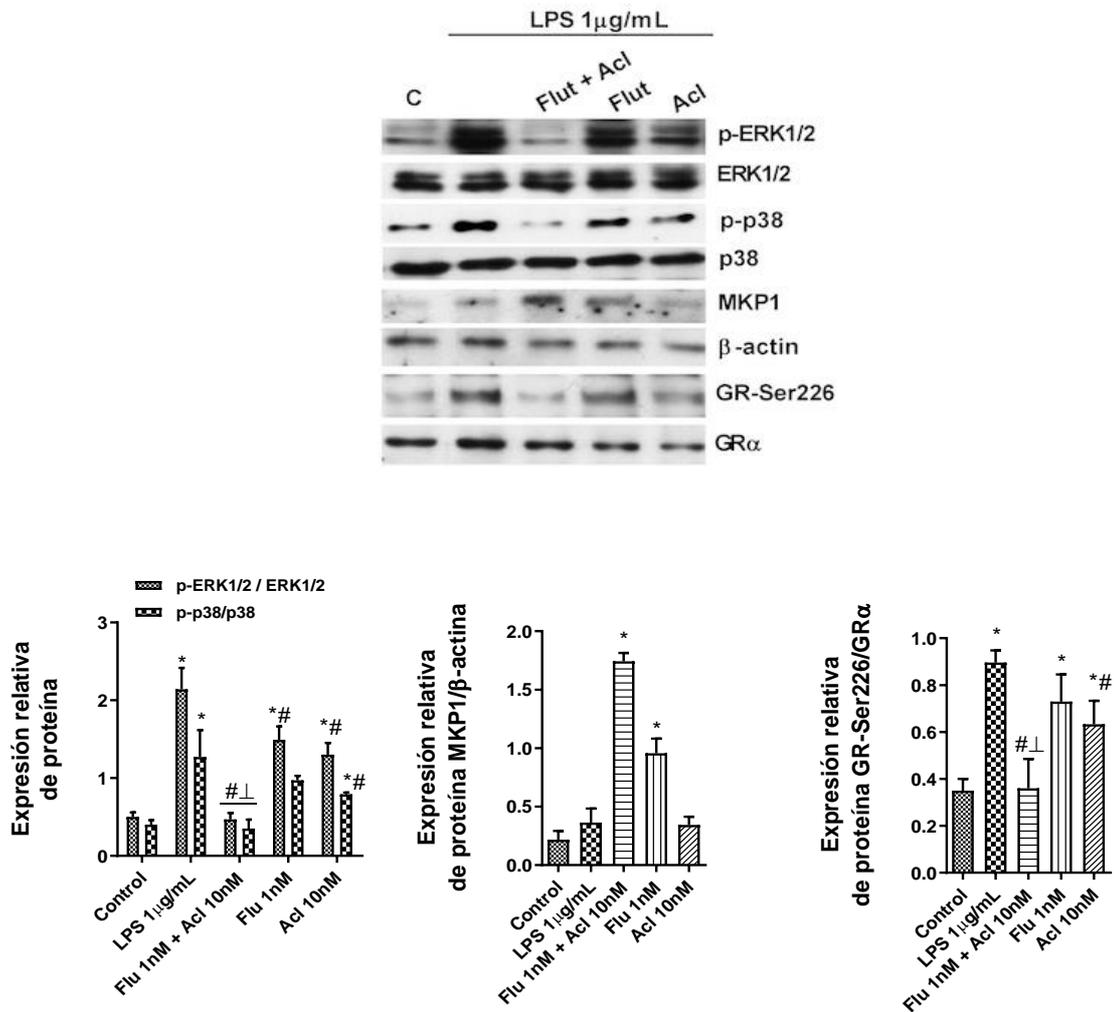


Figura 48. Efecto aditivo antiinflamatorio de la combinación del bromuro de acilidinio (Acl) y propionato de fluticasona (Flu). Los neutrófilos de sangre periférica de pacientes EPOC fueron incubados durante 1h con Acl, Flut o una combinación de ambos y luego estimulados con LPS durante 30 min. El análisis de proteínas totales se realizó por western blott y la expresión de p-ERK1/2, p-p38 y p-GRser226 se determinó como la ratio de sus respectivas formas no fosforiladas y la expresión de MKP1 vs a la de β -actina. Los resultados se expresan como la media \pm DE (n = 4, se utilizaron poblaciones celulares de 4 pacientes EPOC en experimentos independientes realizados por triplicado). ANOVA bidireccional seguida de test *post hoc* de Bonferroni. * p < 0.05 frente al control; #p < 0.05 frente células estimuladas por LPS; \perp p < 0.05 frente a células tratadas con monoterapia.

6 DISCUSIÓN

A pesar de la evidente patogenia inflamatoria de la EPOC, el posicionamiento de los CI en el tratamiento en fase estable de estos pacientes sigue siendo posiblemente uno de los temas más controvertidos de los últimos 10 años, ya que a pesar de que se ha demostrado en estudios *in vitro* que la inflamación neutrofílica característica de esta enfermedad es corticorresistente (156) (Barnes PJ. 2013), en la práctica clínica los CI siguen siendo utilizados y recomendados (siempre asociados a un LABA o LAMA/LABA) con el objetivo principal de disminuir las exacerbaciones, en pacientes de alto riesgo agudizadores y con un perfil de inflamación eosinofílica (> 300 eosinófilos/mm³ en sangre periférica en fase estable) (1,3) (GOLD 2021, Miravittles M. 2022) porque se ha demostrado su papel y eficacia en este perfil de pacientes.

De lo que no hay duda es que nunca deben usarse en monoterapia porque no modifican la progresión de la enfermedad ni la mortalidad de los pacientes con EPOC y asocian frecuentes efectos adversos (candidiasis oral, disfonía y neumonía) (123) (Yang IA. 2013).

Sin embargo cuando se administran asociados al tratamiento broncodilatador con un LABA (LABA/CI), en el paciente EPOC exacerbador y eosinofílico y evitando altas dosis, se ha observado que producen un indiscutible beneficio clínico mejorando su calidad de vida, reduciendo los síntomas y el número de exacerbaciones con un buen perfil de seguridad (95,127) (Calverley PM. 2007, Pavord ID. 2016). Analizando *in vitro* el beneficio del uso de esta combinación LABA/CI se ha observado que los LABA aumentan la capacidad de respuesta a los corticosteroides al revertir la fosforilación del receptor de glucocorticoides alfa (GR α) en la serina 226 (Ser226) y promover la translocación nuclear de GR α (156) (Barnes PJ. 2013) y además atenúan el estrés oxidativo e inhiben la fosfoinositol 3-quinasa delta (PI3K δ), permitiendo así la acción eficiente de la histona desacetilasa-2 (HDAC2) y GR α (195) (Rossios C. 2012). Estos mecanismos podrían explicar los beneficios clínicos de la terapia combinada LABA/CI ya que al revertir su insensibilidad, mejoran los efectos antiinflamatorios de los corticosteroides en la EPOC.

En lo que respecta a los LAMA, los efectos de los CI asociados a un LAMA (LAMA/CI) en terapia dual no han sido analizados hasta la fecha ni en estudios preclínicos ni en ensayos clínicos y la mayor evidencia clínica existente se sustenta en estudios que han evaluado su eficacia clínica

siempre asociados a un LABA también, en la llamada triple terapia (LAMA/LABA/CI). Los estudios clínicos con triple terapia han demostrado mayor eficacia que las combinaciones LABA/CI y/o LAMA/LABA en mejoría funcional, disminución de los síntomas y una mayor reducción del riesgo de exacerbaciones en los EPOC agudizadores y en especial en aquellos con mayor concentración de eosinófilos en sangre (138,139,200) (Lipson DA. 2018, Rabe KF. 2020, Papi A. 2018), y es importante señalar que en el estudio de Rabe KF *et al* donde se comparó la triple terapia con LABA/CI y LAMA/LABA, la reducción de exacerbaciones graves de la triple terapia frente a LABA/CI no fue estadísticamente significativa, datos que refuerzan de manera consistente el papel de los CI en la disminución de exacerbaciones, especialmente las más graves.

Paralelamente, dado que se ha demostrado que existe participación del sistema colinérgico no neuronal en la respuesta inflamatoria neutrofílica en la vía aérea de los pacientes con EPOC activado por el estrés oxidativo (73,76,83,84,140,201) (Koarai A. 2018, Profita M. 2005, Gosens R. 2009, Covantes Rosales CE. 2019, Calzetta L. 2021) y que la estimulación de estos receptores muscarínicos funcionales activan a su vez la vía intracelular de la PI3K δ , produciendo disminución de la actividad y de la expresión de la HDAC2 que es el mecanismo de corticorresistencia más estudiado y demostrado en la EPOC (49,62,78,174) (Ito K. 2007, Gosens R. 2006, Thomas MJ. 2005, Ito K. 2004), se plantea la hipótesis que fármacos antimuscarínicos como el bromuro de aclidinio podrían revertir la corticorresistencia en estos pacientes potenciando su efecto antiinflamatorio al administrarlos en terapia dual junto CI.

Por tanto dada la ausencia de estudios clínicos y preclínicos que analicen los posibles beneficios de la combinación LAMA/CI en terapia dual se planteó como objetivo principal de este estudio evaluar *in vitro* el posible efecto antiinflamatorio del bromuro de aclidinio (LAMA) sobre los neutrófilos de los pacientes con EPOC y si es capaz de atenuar la corticorresistencia característica de estos pacientes por su efecto aditivo antiinflamatorio al combinarlo con corticoesteroides inhalados, buscando así nuevas combinaciones terapéuticas que podrían ayudar a mejorar el pronóstico de estos pacientes.

En este estudio *in vitro* se demuestran por primera vez las propiedades antiinflamatorias aditivas del bromuro de aclidinio y el propionato de fluticasona en los neutrófilos de pacientes con EPOC.

Los principales resultados obtenidos demuestran:

1. La activación del sistema colinérgico no neuronal en los neutrófilos de sangre periférica y del esputo de los pacientes con EPOC (figuras 36, 37 y 39).
2. El tratamiento con un potente LAMA como el bromuro de aclidinio produce una reducción eficaz de la liberación de citocinas y metaloproteinasas en los neutrófilos de pacientes con EPOC, poniendo en valor su efecto antiinflamatorio (figuras 40, 41 y tabla 14).
3. Efecto aditivo antiinflamatorio de la combinación de bromuro de aclidinio y propionato de fluticasona en los neutrófilos de pacientes EPOC (figura 42).
4. La combinación de bromuro de aclidinio y propionato de fluticasona revierte la demostrada corticorresistencia en estos pacientes al aumentar las propiedades antiinflamatorias dañadas de este último fármaco mediante:
 - a. el aumento de la activación de GRE mediada por propionato de fluticasona (figura 45) a través del bloqueo del receptor M2 (figura 46),
 - b. inhibiendo la actividad de la PI3K δ (figura 47),
 - c. aumentando la expresión de genes antiinflamatorios dependientes de corticosteroides como MKP1, CRISPLD2 y GILZ (figuras 44 y 48), y
 - d. la inhibición de la fosforilación de GR α en Ser-226 (figura 48).

6.1 Activación del sistema colinérgico no neuronal en neutrófilos de sangre periférica y del esputo de los pacientes con EPOC

Estudios previos realizados *in vitro* ya han demostrado la presencia y activación de un sistema colinérgico no neuronal en los macrófagos alveolares y en los neutrófilos de pacientes con EPOC, y esta activación provocada por el humo del tabaco parece estar implicada en la patogenia de la enfermedad (76,79) (Profita M. 2005, Koarai A. 2012) (Figura 15). Profita M *et al* (76) demostraron la activación de los receptores M1, M2 y M3 en los neutrófilos del esputo

de pacientes con EPOC mediante la exposición a acetilcolina exógena. Y gracias a métodos de inmunocitoquímica demostró que en los neutrófilos de los pacientes EPOC el patrón expresado mostraba una reducción de receptores M2 y un aumento en la expresión de M3 en comparación con la de los neutrófilos sanos (76). En el presente trabajo, al caracterizar completamente el sistema colinérgico no neuronal en los neutrófilos de sangre periférica y de esputo de controles sanos y de pacientes con EPOC estable y exacerbada, encontramos que los receptores que más se expresaron en los pacientes EPOC con respecto a los controles sanos fueron los M2 (en ambas muestras) y esta diferencia fue aún mayor en aquellos con enfermedad exacerbada. Se obtuvieron resultados similares para M4, en menor medida para M5 y muy levemente para M3. La discrepancia de estos resultados con respecto a la expresión de M2 con los publicados por Profita M *et al* (76) podría explicarse por las diferentes técnicas y anticuerpos utilizados. Sin embargo, en nuestro trabajo también se determinó la expresión de estos receptores por técnicas de RT-PCR y Western Blot obteniendo resultados similares, lo que da potencia a los resultados que hemos obtenido (Figura 36).

Al analizar la expresión del resto de componentes del sistema colinérgico no neuronal, también observamos que en los neutrófilos de pacientes con EPOC estable y exacerbada existía una sobreexpresión de ChAT, VAChT y OCT1 en comparación con las muestras de los controles sanos (Figura 37). Estos hallazgos sugieren que los neutrófilos de los pacientes con EPOC sintetizan acetilcolina intracelular, mediada por ChAT, que se carga en orgánulos secretorios por VAChT, lo que hace que la acetilcolina esté disponible para la secreción a través de los canales de la membrana OCT1 cuando los receptores muscarínicos de los neutrófilos son activados por estímulos inflamatorios como el humo de cigarrillo. Para demostrar esta hipótesis se estimularon los neutrófilos de sangre periférica y de esputo de los pacientes EPOC con carbacol, un análogo estable de la acetilcolina, y se observó que activaba la liberación de IL-8 por estas células en ambas muestras y que esta liberación de IL-8 fue inhibida por el bromuro de aclidinio de una manera concentración-dependiente pero no fue así tras la exposición a hexametonio (antagonista nicotínico) lo que parece confirmar el papel de los receptores muscarínicos funcionales en la respuesta inflamatoria de estas células y descarta la participación de receptores nicotínicos (Figura 39). El estímulo de los neutrófilos de sangre periférica con LPS y de los neutrófilos del esputo con EHT (utilizados como estímulos pro-inflamatorios) también demostró la activación de estas células mediante el aumento en la

liberación de IL-8. Para eliminar la posible contribución de la acetilcolina extracelular en la activación de estos neutrófilos se añadió acetilcolinesterasa exógena 1h antes y de nuevo durante el estímulo con LPS o EHT y se observó una disminución en la liberación de IL-8 en ambas muestras lo que sugiere que la infección bacteriana y el humo del cigarrillo activan la liberación de acetilcolina de los neutrófilos, lo que a su vez promueve la liberación de las citocinas y metaloproteinasas inducidas por ambos estímulos (LPS o EHT) (Figura 39). Sin embargo, no detectamos acetilcolina en el medio de cultivo de neutrófilos humanos, probablemente debido a la baja sensibilidad del kit comercial utilizado en este estudio o la rápida degradación por acetilcolinesterasas (datos no mostrados).

Se han obtenido resultados similares en otro estudio realizado en macrófagos alveolares estimulados con carbacol, en los que se describió la liberación de leucotrieno B4 a través de la activación del receptor M3 (79) (Koarai, A. 2012). En nuestro trabajo, el efecto inhibitor del bromuro de aclidinio sobre la liberación de IL-8 por los neutrófilos parece estar mediado por el bloqueo de M2, ya que el antagonista de M2, metoctramina inhibió la liberación de citocinas, pero el pFHHSid, un antagonista de M3, no lo hizo (Figura 42).

6.2 Efecto antiinflamatorio del bromuro de aclidinio y propionato de fluticasona por separado en los neutrófilos de pacientes EPOC

Una de las principales aportaciones de este trabajo es que por primera vez se demuestra *in vitro* que el bromuro de aclidinio tiene propiedades antiinflamatorias en los neutrófilos de sangre periférica y de esputo tanto de pacientes de EPOC como en sujetos sanos sin diferencias entre ambos grupos.

Para ello preincubamos durante 1h los neutrófilos de sangre periférica de pacientes EPOC y de individuos sanos y los neutrófilos de esputo de pacientes EPOC con bromuro de aclidinio y propionato de fluticasona y posteriormente tras estimularlos durante 6h con LPS (los de sangre periférica) y con EHT (los del esputo) determinamos el porcentaje de inhibición concentración dependiente de la liberación de las principales citoquinas pro-inflamatorias (IL-8, MMP9, IL-1 β , CCL-5 y GM-CSF). El bromuro de aclidinio, aunque fue menos efectivo que el

propionato de fluticasona para inhibir la secreción de citocinas en neutrófilos de sangre periférica de individuos sanos tras ser estimulados con LPS, pero aun así observamos que conseguía un 72%, 50%, 46%, 39% y 33% respectivamente de la inhibición máxima para las citoquinas estudiadas (IL-8, MMP9, IL-1 β , CCL- 5 y GM-CSF); y además este efecto antiinflamatorio se confirmó también en los neutrófilos de pacientes con EPOC con unos porcentajes de inhibición máxima muy similares a los observados en los neutrófilos de individuos sanos. Y en los neutrófilos de esputo de los pacientes EPOC tras ser estimulados con EHT se confirmó el papel antiinflamatorio del bromuro de aclidinio que mostró una inhibición de la secreción de IL-8 similar a la observada en los neutrófilos de sangre periférica e incluso en neutrófilos de esputo no estimulados se observó una inhibición de IL-8 concentración-dependiente (Figuras 40 y 41, Tabla 14). Hasta la fecha el único trabajo publicado en lo que respecta al papel antiinflamatorio del aclidinio en pacientes EPOC fue realizado también *in vitro* sobre células epiteliales bronquiales estimuladas con humo de cigarrillo y no consiguió demostrar que el aclidinio contrarreste la sobre-expresión del IL-8 ni que mejore la expresión nuclear reducida de HDAC2 (153) (Ferraro M. 2019).

Al analizar los resultados con el propionato de fluticasona, en este estudio se demostró de nuevo que los pacientes EPOC muestran una insensibilidad al efecto antiinflamatorio de los corticoesteroides, como ya se ha descrito y publicado previamente en estudios *in vitro* (134,176) (Milara J. 2014, Culpitt S. 2003), lo que confirma la corticorresistencia en estos pacientes.

Los neutrófilos aislados de nuestros pacientes con EPOC fueron mucho menos sensibles a los efectos antiinflamatorios del propionato de fluticasona que los neutrófilos de controles sanos: observamos una disminución de alrededor del 50% del efecto inhibitor máximo del propionato de fluticasona en la secreción de las citoquinas inflamatorias (IL-8, MMP9, GM-CSF, IL-1 β) en los neutrófilos de sangre periférica de los pacientes EPOC respecto al observado en los controles sanos (Figura 40 y Tabla 14). A este respecto ya han sido publicados previamente resultados similares, Culpitt S *et al* (176) observaron que en los macrófagos alveolares de pacientes EPOC la dexametasona no inhibió la secreción de IL-8 basal ni tras estímulo con EHT y en otro estudio más reciente (134) (Milara J. 2014), realizado también con dexametasona pero esta vez, al igual que nosotros, sobre neutrófilos de pacientes EPOC se describió una importante reducción del efecto inhibitor de la dexametasona en la secreción

de IL-8 y MMP9 por los neutrófilos de los pacientes EPOC respecto a la inhibición de la respuesta inflamatoria conseguida sobre los neutrófilos de controles sanos.

Por tanto, en vista de nuestros resultados, se confirma de nuevo la corticorresistencia de los neutrófilos de los pacientes EPOC y se vislumbra un posible papel antiinflamatorio del bromuro de aclidinio que quizá administrado conjuntamente con el CI pueda revertir dicha insensibilidad al ejercer un efecto aditivo antiinflamatorio, principal hipótesis de nuestro trabajo.

6.3 Efecto aditivo antiinflamatorio de la combinación de bromuro de aclidinio y propionato de fluticasona en los neutrófilos de pacientes EPOC

Al analizar la secreción de las mismas citoquinas pro-inflamatorias ya mencionadas tras ser incubados los neutrófilos con la combinación de propionato de fluticasona y bromuro de aclidinio se confirmó nuestra hipótesis planteada, ya que observamos efectos antiinflamatorios aditivos en ambas muestras, en los neutrófilos de sangre periférica y del esputo de los pacientes con EPOC (Figura 42). Estos resultados están en consonancia con los publicados por Pahl A *et al* (202), donde se observó un aumento de los efectos antiinflamatorios de la budesonida combinada con el antimuscarínico R, R-glicopirrolato en monocitos humanos estimulados con LPS.

Los efectos aditivos logrados en nuestro trabajo con la combinación del bromuro de aclidinio y el propionato de fluticasona se pueden atribuir al antagonismo del receptor M2, ya que observamos los mismos resultados antiinflamatorios aditivos al combinar el CI con metoctramina (antagonista M2), pero no al combinarlo con pFHHSid (antagonista M3). Sin embargo, nuestros datos no pueden descartar la participación de M4 y M5. (Figura 42)

6.4 Mecanismos implicados en el efecto aditivo de la combinación de propionato de fluticasona y bromuro de aclidinio en los neutrófilos de pacientes EPOC

Para profundizar en los posibles mecanismos implicados en el efecto aditivo antiinflamatorio de la combinación de bromuro de aclidinio con propionato de fluticasona nos planteamos analizar los efectos *in vitro* de esta combinación en algunas vías moleculares implicadas en la corticorresistencia y que pudieran demostrar que el bromuro de aclidinio es capaz de revertirla.

6.4.1 Activación del gen del elemento de respuesta a glucocorticoides (GRE)

El efecto antiinflamatorio de los corticosteroides está mediado, en parte, por la promoción de la translocación nuclear de su receptor GR α (tras unirse a él, formando el complejo GR-GC) y de la unión a regiones GRE nucleares, donde ejercerán sus efectos moleculares activando la expresión de genes antiinflamatorios (Figura 22) (157) (Barnes PJ. 2010). En este trabajo, demostramos en cultivos celulares de células bronquiales, un aumento de la señal GRE mediada por propionato de fluticasona (concentración dependiente) y que esta señal se incrementó significativamente tras añadir a la fluticasona dosis crecientes de bromuro de aclidinio, atropina y LY294002 (inhibidor de PI3K) (Figura 45) lo que parece demostrar la posible implicación del sistema colinérgico no neuronal en la disminución de la sensibilidad a los corticosteroides de los pacientes EPOC, probablemente en parte, a través de la activación de la vía PI3K.

Y por otro lado y con el objetivo de analizar el bloqueo de qué receptor muscarínico funcional es el más implicado en la amplificación de esta respuesta antiinflamatoria que hemos visto con la combinación LAMA/CI, utilizamos el método de silenciamiento post-transcripcional de genes específicos para los receptores M2 y M3 y observamos que el receptor responsable fue el M2, ya que la activación del GRE inducida por fluticasona fue mayor (es decir consiguió mayor efecto antiinflamatorio) en las células con el receptor M2 silenciado (Figura 46). Por tanto el bloqueo del receptor muscarínico M2 al combinar LAMA/CI aumenta el efecto antiinflamatorio de los corticoesteroides.

6.4.2 Inhibición de la actividad de la vía PI3K δ

Recordemos el mecanismo de acción de los distintos receptores muscarínicos en función de su unión a distintos subtipos de la subunidad α de la proteína G (Figura 13) para entender su posible implicación de la corticorresistencia: los receptores M1, M3 y M5 están acoplados a la proteína Gq y median la contracción bronquial activando la fosfolipasa C (PLC), que conduce a la producción de inositol 1,4,5-trifosfato (IP3); este último es necesario para activar la liberación de los depósitos de calcio intracelular. Los receptores M2 y M4 están acoplados a la proteína Gi y median la activación de la vía PI3K y la inhibición de la adenilato ciclasa y por tanto su activación contribuye a la inhibición de la formación de monofosfato de adenosina cíclico (AMPc) (60,62) (Wettschureck N. 2005; Gosens R. 2006).

La PI3K δ , activada por el estímulo de los receptores M2 y M4, es una vía de señalización intracelular crucial en la expresión y activación de mediadores inflamatorios y además mediante fosforilación e inactivación de la HDAC2 se la ha involucrado en la corticorresistencia de los pacientes EPOC (49,50) (Ito K. 2007, To Y. 2010). La actividad de la vía PI3K δ aumenta en neutrófilos (134) (Milara J. 2014) y macrófagos (175) (Marwick JA. 2010) de pacientes con EPOC y media su insensibilidad a los corticosteroides. Marwick JA *et al* (175) demostraron la participación de la PI3K δ en la corticorresistencia al observar un aumento de la expresión y señalización de la vía PI3K δ en los macrófagos pulmonares de pacientes EPOC respecto a sujetos sanos y que la inhibición selectiva de la PI3K δ (pero no de la vía PI3K γ) restauraba el efecto antiinflamatorio de los corticoesteroides en los monocitos de sangre periférica de los pacientes EPOC igualándolo al observado en sujetos sanos.

En este trabajo demostramos que tanto el bromuro de aclidinio como la metoctramina (antagonista M2) suprimieron la actividad de PI3K δ inducida por LPS en los neutrófilos de sangre periférica de los pacientes EPOC (Figura 47) sin embargo este efecto no se observó con el antagonista de M3, lo que de nuevo pone en relieve el papel del bromuro de aclidinio como antiinflamatorio a través del bloqueo del receptor M2 e inhibiendo la vía PI3K δ .

Por lo tanto, la inhibición de la actividad de PI3K δ por el bromuro de aclidinio a través del bloqueo del receptor M2 puede explicar, al menos parcialmente, la mejoría del efecto antiinflamatorio al administrarlo junto al corticoesteroide propionato de fluticasona.

6.4.3 Aumento de la expresión de genes antiinflamatorios dependientes de corticosteroides como MKP1, CRISPLD2 y GILZ

Como ya se ha comentado, el efecto antiinflamatorio de los corticosteroides está mediado, en parte, por la promoción de la translocación nuclear de su receptor GR α a las regiones GRE nucleares donde ejercerán sus efectos moleculares activando la expresión de genes antiinflamatorios.

En este trabajo observamos un incremento de la señal GRE mediada por la combinación de propionato de fluticasona y dosis crecientes de bromuro de aclidinio (figura 45) lo que resultó en efectos aditivos sobre la estimulación de genes inducibles por corticosteroides como MKP1, CRISPLD2 y GILZ (figura 44), moléculas todas ellas implicadas en la modulación de la respuesta antiinflamatoria de los corticosteroides.

- La MKP1 (inhibidor endógeno de las vías p38 MAPK, ERK y JNK) desfosforila e inactiva diferentes quinasas activadas por mitógenos (MAPK) como ERK1/2 y p38 como parte de los efectos antiinflamatorios de los corticosteroides. Uno de los mecanismos descritos que interviene en la insensibilidad a los corticoides en pacientes asmáticos resistentes a GC es la inhibición de GR α a través de la fosforilación del residuo de serina 226 de dicho receptor (GR-Ser226) por p38, ERK1/2 o JNK1 lo que se traduce en una disminución de la afinidad GR-GC e inhibición de la translocación nuclear de GR α (163,203,204) (Bhavsar P. 2010, Kobayashi Y. 2011, Mercado N. 2012). En este sentido nosotros analizamos en los neutrófilos de sangre periférica de los pacientes EPOC el efecto de la combinación de bromuro de aclidinio y propionato de fluticasona en la expresión de MKP1, p-ERK1/2 y p-p38 y de GR-Ser226 con respecto a la monoterapia con ambos fármacos y observamos (figura 48):
 - que la combinación LAMA/CI potenció la inhibición de p-ERK1/2 y p-p38 (que son vías de transcripción pro-inflamatorias) y por tanto disminuyó la fosforilación del GR-Ser226 mejorando la afinidad GR-GC, y
 - que la combinación también aumentó la expresión de MKP1 por encima del nivel alcanzado con cualquiera de los fármacos por separado (figuras 44 y 48).

Resultados todos ellos que confirman el efecto aditivo antiinflamatorio de la combinación de bromuro de aclidinio y propionato de fluticasona al interferir en reconocidos mecanismos de corticorresistencia.

- CRISPLD2 es un gen inducible por corticoesteroides que codifica una proteína de secreción con efectos antiinflamatorios en respuesta al estímulo por el LPS de la pared de la bacterias gramnegativas tras su infección en humanos. El aumento en la expresión de CRISPLD2 (que es uno de los mecanismos antiinflamatorios de los CI) por efeto de los corticoesteroides inhibe las respuestas pro-inflamatorias desencadenadas tras la unión del LPS con el receptor tipo toll 4 (TLR4), reduciendo así quizás las exacerbaciones de los pacientes EPOC producidas por infecciones con bacterias gramnegativas (194) (Wang ZQ. 2009). En este trabajo, tras el estímulo de los neutrófilos de sangre periférica de pacientes EPOC con LPS bacteriano previamente incubados con bromuro de aclidinio, propionato de fluticasona o la combinación de ambos observamos un aumento de CRISPLD2 mucho mayor con la combinación de bromuro de aclidinio y propionato de fluticasona que con los fármacos en monoterapia, lo que puede explicar también, el efecto aditivo antiinflamatorio de la combinación de ambos fármacos (figura 44).
- El gen inducible por corticosteroides GILZ inhibe la actividad transcripcional de NF- κ B y AP-1, que son los principales factores de transcripción pro-inflamatorios (193) (Mittelstadt PR. 2001). Con respecto a la respuesta en la expresión de GILZ en los neutrófilos de sangre periférica de los pacientes EPOC, de nuevo observamos que la combinación de bromuro de aclidinio y propionato de fluticasona aumenta su expresión, con diferencias respecto a los fármacos por separado (figura 44).

En resumen, los resultados presentados en este trabajo demuestran por primera vez que el bromuro de aclidinio tiene efecto antiinflamatorio en los neutrófilos de los pacientes EPOC y que consigue un efecto aditivo cuando se combina con propionato de fluticasona atenuando la corticorresistencia de la inflamación neutrofílica característica de estos pacientes como queda resumido gráficamente en la figuras 49 y 50.

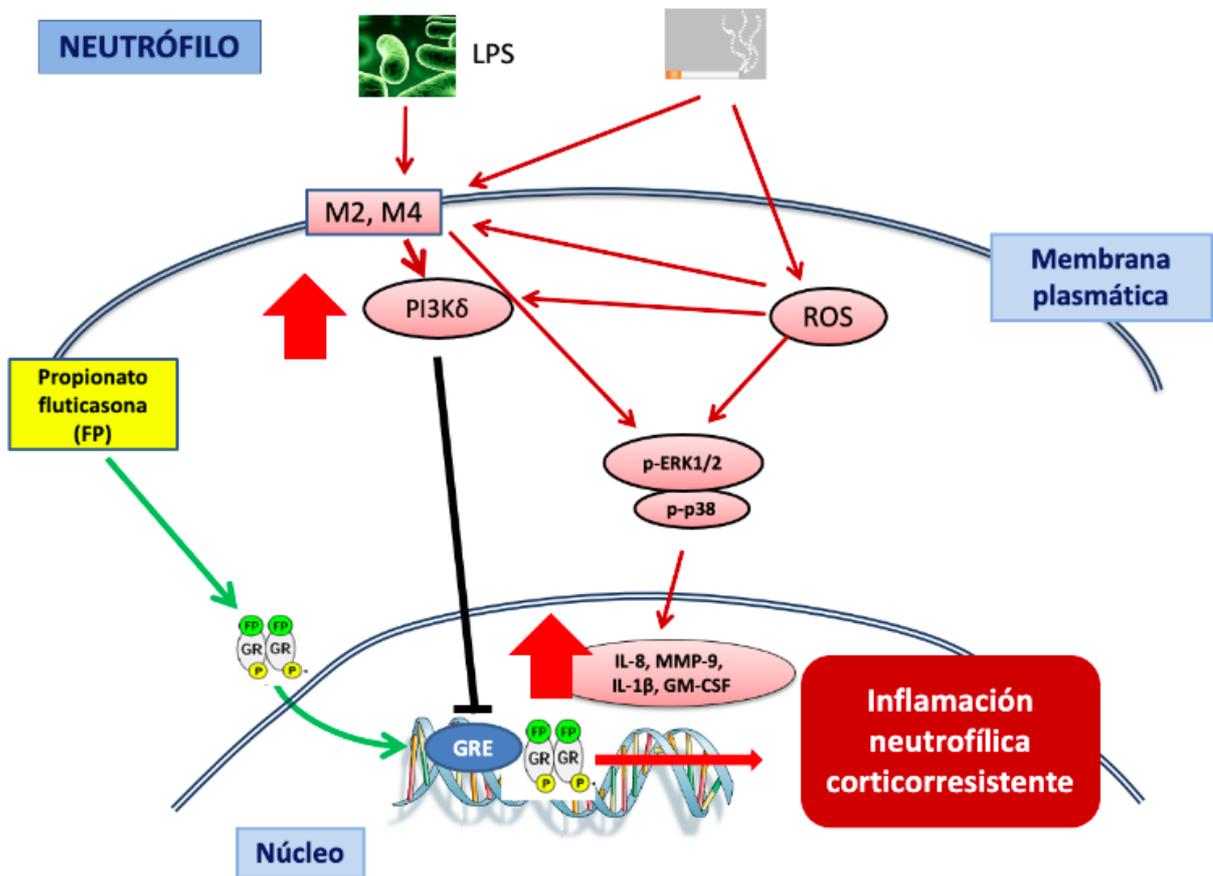


Figura 49. Resumen de la patología de la inflamación neutrofílica corticorresistente en la EPOC. El estrés oxidativo causado por la exposición al humo de tabaco parece ser uno de los principales desencadenantes tanto:

- de la respuesta inflamatoria en los neutrófilos de los pacientes EPOC por la activación de vías de señalización pro-inflamatorias como la ERK1/2 y p38 que activan genes que codifican mediadores inflamatorios como IL-8, MMP-9, IL-1β, GM-CSF,
- como de la corticorresistencia en estos pacientes al activar la vía de señalización intracelular de la PI3Kδ.

Y paralelamente el humo de tabaco y el estímulo con LPS, a través del estrés oxidativo, se ha visto que son estímulos tras los cuales las células inflamatorias como los neutrófilos en los pacientes EPOC expresan receptores muscarínicos funcionales (M2-M4) que a su vez participan también en la respuesta inflamatoria y activan la vía de la PI3Kδ contribuyendo también en la corticorresistencia.

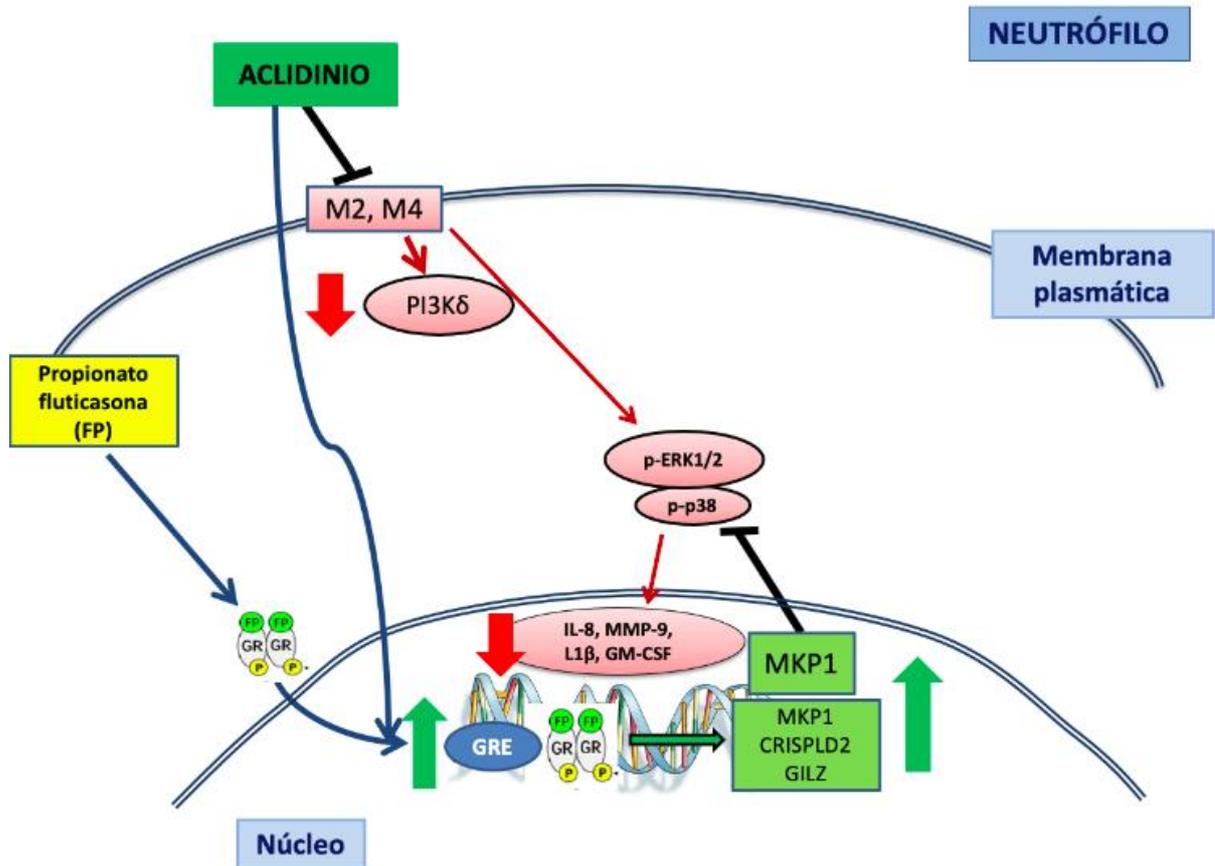


Figura 50. Resumen gráfico de los resultados obtenidos. La combinación aclidinio – fluticasona tiene efecto antiinflamatorio aditivo produciendo un reducción más eficaz de la liberación de citoquinas que ambos fármacos en monoterapia y revierte la corticorresistencia al bloquear al receptor M2 consiguiendo así:

- la inhibición de la activación de la vía PI3Kδ,
- aumentando la expresión de GRE y
- aumentando la expresión de genes antiinflamatorios dependientes de corticosteroides como MKP1, CRISPLD2 y GILZ.

Por lo tanto, en vista de los resultados obtenidos, podría establecerse una justificación científica para la futura investigación clínica con combinaciones de LAMA/CI en la EPOC, ya que este trabajo se ha limitado a un análisis *in vitro* de los posibles beneficios de esta combinación y estos resultados requieren confirmación clínica.

7 CONCLUSIONES

- En los neutrófilos de sangre periférica y esputo de los pacientes EPOC existe una activación del sistema colinérgico no neuronal que participa en la respuesta inflamatoria neutrofílica.
- El bromuro de aclidinio, potente antimuscarínico de acción prolongada (LAMA), produce *in vitro* una reducción eficaz de la liberación de citocinas y metaloproteinasas en los neutrófilos de pacientes con EPOC, poniendo en valor su efecto antiinflamatorio.
- La combinación de bromuro de aclidinio y propionato de fluticasona muestra *in vitro* un efecto aditivo antiinflamatorio en los neutrófilos de los pacientes EPOC.
- La combinación de bromuro de aclidinio y propionato de fluticasona revierte la demostrada corticorresistencia en estos pacientes al aumentar las propiedades antiinflamatorias dañadas de este último fármaco y modulando algunas vías moleculares implicadas en la corticorresistencia, mediante:
 - a. el aumento de la activación de GRE mediada por propionato de fluticasona a través del bloqueo del receptor M2,
 - b. inhibiendo la actividad de la PI3K δ ,
 - c. aumentando la expresión de genes antiinflamatorios dependientes de corticosteroides como MKP1, CRISPLD2 y GILZ, e
 - d. inhibiendo la fosforilación de GR α en Ser-226.

8 BIBLIOGRAFÍA

1. GOLD Science Committee: Members, Vogelmeier C, Agusti A, Anzueto A, Barnes PJ, Bourbeau J, et al. Global strategy for diagnosis, management and prevention of COPD.2021 UPDATE. 2021.
2. Sutherland E, Cherniak R. Management of chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med*. 2004;350:2689–97.
3. Miravittles M, Calle M, Molina J, Almagro P, Gómez JT, Trigueros JA, et al. Actualización 2021 de la Guía Española de la EPOC (GesEPOC). Tratamiento farmacológico de la EPOC estable. *Arch Bronconeumol*. 2022 Jan 1;58(1):69–81.
4. Miravittles M, Soler-Cataluña JJ, Calle M, Molina J, Almagro P, Quintano JA, et al. Guía española de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (GesEPOC) 2017. Tratamiento farmacológico en fase estable. *Arch Bronconeumol*. 2017 Jun;53(6):324–35.
5. Soriano JB, Alfageme I, Miravittles M, de Lucas P, Soler-Cataluña JJ, García-Río F, et al. Prevalence and Determinants of COPD in Spain: EPISCAN II. *Arch Bronconeumol*. 2021;57(1):61–9.
6. Miravittles M, Soriano JB, García-Río F, Muñoz L, Duran-Tauleria E, Sanchez G, et al. Prevalence of COPD in Spain: Impact of undiagnosed COPD on quality of life and daily life activities. *Thorax*. 2009;64(10):863–8.
7. Lamprecht B, Soriano JB, Studnicka M, Kaiser B, Vanfleteren LE, Gnatiuc L, et al. Determinants of underdiagnosis of COPD in national and international surveys. *Chest*. 2015 Oct 1;148(4):971–85.
8. Encuesta Nacional de Salud. España 2017. Ministerio de Sanidad, Consumo y Bien estar social. 2017.
9. Soriano JB, Rojas-Rueda D, Alonso J, Antó JM, Cardona PPJ, Fernández E, et al. The burden of disease in Spain: Results from the Global Burden of Disease 2016. *Med Clin (Barc)*. 2018 Sep 14;151(5):171–90.
10. Mathers CD, Loncar D. New projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030 Protocol S1. Technical Appendix Major cause regressions. *PLoS Med*. 2006;3(1):1–23.
11. GBD 2015 Chronic Respiratory Disease Collaborators. Global, regional, and national deaths, prevalence, disability-adjusted life years, and years lived with disability for

- chronic obstructive pulmonary disease and asthma, 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet Respir Med.* 2017;5(9):691–706.
12. Parker CM, Voduc N, Aaron SD, Webb KA, O'Donnell DE. Physiological changes during symptom recovery from moderate exacerbations of COPD. *Eur Respir J.* 2005 Sep;26(3):420–8.
 13. Decramer M, Janssens W, Miravitlles M. Chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet.* 2012;379(9823):1341–51.
 14. Barnes PJ, Celli BR. Systemic manifestations and comorbidities of COPD. *Eur Respir J.* 2009;33(5):1165–85.
 15. Sinn D, Anthonisen NR, Soriano JB, Agusti A. Mortality in COPD: role of comorbidities. *Eur Respir J.* 2006;28(6):1245–57.
 16. Fabbri LM, Luppi F, Beghé B, Rabe KF. Complex chronic comorbidities of COPD. *Eur Respir J.* 2008 Jan;31(1):204–12.
 17. Institute for Health Metrics and Evaluation (IHME). GBD Foresight. Seattle, IHME, University of Washington [Internet]. 2015. Available from: <http://ihmeuw.org/4xre>
 18. World Health Organization. Projections of mortality and causes of death, 2016 and 2060 [Internet]. 2020. Available from: http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/projections/en.
 19. Carvounis CP, Nikas N, Panitti E. Epidemiological survey in primary care patients with chronic obstructive pulmonary disease in Greece; the EPIPTOSI study. *Pneumon.* 2012 Dec;25(4):386–94.
 20. Izquierdo J. The Burden of COPD in Spain: results from the confronting COPD survey. *Respir med.* 2003;97(C):S61-69.
 21. Ministerio de Sanidad y Política Social. Estrategia en EPOC del Sistema Nacional de Salud. Sanidad 2009. [Internet]. p. Fecha de consulta 9/5/2021. Available from: <https://www.mscbs.gob.es/organizacion/sns/planCalidadSNS/docs/EstrategiaEPOCSN S.pdf>
 22. Barnes PJ, Hansel TTT. Prospects for new drugs for chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet* 2004. *Lancet.* 2004 Sep 11;364(9438):985–96.
 23. Roche N, Marthan R, Berger P, Chambellan A, Chanez P, Aguilaniu B. Beyond corticosteroids: future prospects in the management of inflammation in COPD. *Eur Respir Rev.* 2011;20:175–82.

24. Boardman C, Chachi L, Gavrila A, Keenan CR, Perry MM, Xia YC, et al. Mechanisms of glucocorticoid action and insensitivity in airways disease. *Pulm Pharmacol Ther.* 2014;29(2):129–43.
25. Hogg J, Macklen P, Thurlbeck W. Site and nature of airway obstruction in chronic obstructive lung disease. *N Engl J Med.* 1968;278:1355–60.
26. Blundell R, Harrison D, Wallace W. Emphysema: the challenge of the remodelled lung. *J Pathol.* 2004;202:141–4.
27. Cosío BG. De la biología a la clínica. EPOC. *Arch Bronconeumol.* 2007;43(Supl 2):15–23.
28. Barnes PJ, Shapiro SD, Pauwels RA. Chronic obstructive pulmonary disease: Molecular and cellular mechanisms. *Eur Respir J.* 2003;22(4):672–88.
29. Hogg J, Chu F, Utokaparch S, Woods T, Elliot W, Buzatu L. The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med.* 2004;350:2645–53.
30. Di Stefano A, Capelli A, Lusuardi M, Balbo P, Vecchio C, Maestrelli P. Severity of airflow limitation is associated with severity of airway inflammation in smokers. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998;158:1277–85.
31. MacNee W, Wiggs B, Beizberg A, Hogg J. The effect of cigarette smoking on neutrophil kinetics in human lungs. *N Engl J Med.* 1998;321:924–8.
32. Wright J, Christman J. The role of nuclear factor $\kappa\beta$ in the pathogenesis of pulmonary diseases: implications for therapy. *Am J Respir Med.* 2003;2:211–9.
33. Blobel G, Schiemann W, Lodish H. Role of transforming growth factor beta in human disease. *N Engl J Med.* 2000;342:1350–8.
34. Suki B, Lutchen K, Ingenito E. On the progressive nature of emphysema. Roles of proteasas, inflammation and mechanical forces. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003;168:516–21.
35. T B, Nishimura M, Takeyabu K. Neutrophil granule proteins in bronchoalveolar lavage fluid from subjects with subclinical emphysema. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999;159:1985–91.
36. Russell REK, Culpitt S V., DeMatos C, Donnelly L, Smith M, Wiggins J, et al. Release and activity of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 by alveolar macrophages from patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J*

- Respir Cell Mol Biol. 2002;26(5):602–9.
37. Carrel R, Lomas D. Alpha1-antitrypsin deficiency - a model for conformational diseases. *N Engl J Med*. 2002;346:45–53.
 38. Lomas D, Mahadeva R. Alpha 1-antitrypsin polymerization and the serpinopathies: pathology and prospects for therapy. *J Clin Invest*. 2002;110:1585–90.
 39. Carp H, Janoff A. Possible mechanisms of emphysema in smokers. In vitro suppression of serum elastase-inhibitory capacity by fresh cigarette smoke and its prevention by antioxidants. *Am Rev Respir Dis*. 1978;118(3):617–21.
 40. MacNee W. Oxidative stress and lung inflammation in airways disease. Vol. 429, *European Journal of Pharmacology*. 2001. p. 195–207.
 41. Núñez-Naveira L, Montero-Martínez C, Ramos-Barbón D. Oxidación, inflamación y modificaciones estructurales. Curso EPOC. Unidad 1. Aspectos básicos. *Arch Bronconeumol*. 2007;43(Suplemento 1):18–29.
 42. Beckman J, Koppenol W. Nitric oxide, superoxide and peroxynitrite: the good, the bad and the ugly. *Am J Physiol*. 1996;271:C1432–7.
 43. Taggart C, Cervantes-Laurean D, Kim G, McElvaney NG, Wehr N, Moss J, et al. Oxidation of either methionine 351 or methionine 358 in α 1-antitrypsin causes loss of anti-neutrophil elastase activity. *J Biol Chem*. 2000 Sep 1;275(35):27258–65.
 44. Barnes PJ, Karin M. Nuclear Factor- κ B - A pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med*. 1997;10:1066–71.
 45. Di Stefano A, Caramori G, Oates T, Capelli A, Lusuardi M, Gnemmi I, et al. Increased expression of nuclear factor- κ B in bronchial biopsies from smokers and patients with COPD. *Eur Respir J*. 2002 Sep;20(3):556–63.
 46. Janssen L. Isoprostanes: an overview and putative roles in pulmonary pathophysiology. *AM J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2001;280:L1067–82.
 47. Ito K, Lim SC, Caramori G, Chung KF, Barnes P, Adcock IM. Cigarette smoking reduces histone deacetylase 2 expression, enhances cytokine expression, and inhibits glucocorticoid actions in alveolar macrophages. *FASEB J*. 2001;15:1110–2.
 48. Barnes PJ, Ito K, Adcock IM. A mechanism of corticosteroid resistance in COPD: inactivation of histone deacetylase. *Lancet*. 2004;363:731–3.
 49. Ito K, Caramori G, Adcock IM. Therapeutic potential of phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors in inflammatory respiratory disease. *J Pharmacol Exp Ther*. 2007;321(1):1–8.

50. To Y, Ito K, Kizawa Y, Failla M, Ito M, Kusama T, et al. Targeting phosphoinositide-3-kinase- δ with theophylline reverses corticosteroid insensitivity in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010 Oct 1;182(7):897–904.
51. Sapey E, Stockley JA, Greenwood H, Ahmad A, Bayley D, Lord JM, Insall RH SR. Behavioral and structural differences in migrating peripheral neutrophils from patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011;183:1176–86.
52. Milic-Emili J. Expiratory flow limitation. *Chest*. 2000;117:219S-223S.
53. Thurlbeck W. Pathology of chronic airflow obstruction. Cherniak N, editor. Philadelphia: W.B Saunders Company; 1991. 3–20 p.
54. Cosio M, Guerassimov A. A Chronic obstructive pulmonary disease. Inflammation of small airways and lung parenchyma. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;169:S21–5.
55. Calverley PMA, Koulouris N. Flow limitation and dynamic hyperinflation: key concepts in modern respiratory physiology. *Eur Respir J*. 2005;25:186–99.
56. Agostoni E, Mead J. Statics of the respiratory system. Macklem P, Mead J, editors. Bethesda, Maryland: Handbook of Physiology. Section 3. vol I. The respiratory system: Mechanics of Breathing. American Physiology Society; 1964. 387–409 p.
57. Rochester D. The diaphragm in COPD. Better than expected, but not good enough. *N Engl J Med*. 1991;325:961–2.
58. Elbehairy A, Ciavaglia C, Webb K. Pulmonary Gas Exchange Abnormalities in Mild Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Implications for Dyspnea and Exercise Intolerance. *Am J Respir Crit Care Med*. 2015;191(12):1384–94.
59. Barnes PJ. Cholinergic control of airway smooth muscle. *Am Rev Respi Dis*. 1987;136(4 II SUPPL.):S42-5.
60. Wettschureck N, Offermanns S. Mammalian G proteins and their cell type specific functions. *Physiol Rev*. 2005;(85):1159.1204.
61. Barnes PJ. Muscarinic receptor subtypes in airways. *Life Sci*. 1993;52:521–7.
62. Gosens R, Zaagsma J, Meurs H, Halayko AJ. Muscarinic receptor signaling in the pathophysiology of asthma and COPD. *Respir Res*. 2006;7:1–15.
63. Brussaco V. Reducing cholinergic constriction: the major reversible mechanism in COPD. *Eur Respir Rev*. 2006;15:32–6.
64. Barnes PJ, Belvisi MG, Mak JCW, Haddad EB, O'Connor B. Tiotropium bromide (Ba 679

- BR), a novel long-acting muscarinic antagonist for the treatment of obstructive airways disease. *Life Sci.* 1995 Feb 10;56(11–12):853–9.
65. Barnes PJ. The pharmacological properties of tiotropium. *Chest.* 2000;117(Supl 2):63S.
 66. Undem BJ, Kollarik M. The role of vagal afferent nerves in chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc.* 2005;2(4):355–60.
 67. Gross NJ, Co E, Skorodin MSM. Cholinergic bronchomotor tone in COPD: estimates of its amount in comparison to normal. *Chest.* 1989;96(5):984–7.
 68. Wessler I, Kirkpatrick C, Racké K. Non-neuronal acetylcholine, a locally acting molecule, widely distributed in biological systems: expression and function in humans. *Pharmacol Ther.* 1998;77(1):59–70.
 69. Wessler I, Kirkpatrick C. The non-neuronal cholinergic system: An emerging drug target in the airways. *Pulm Pharmacol Ther.* 2001;14:423–34.
 70. Wessler I, Kirkpatrick CJC. Acetylcholine beyond neurons: The non-neuronal cholinergic system in humans. *Br J Pharmacol.* 2008 Aug 26;154(8):1558–71.
 71. Racke K, Matthiesen S. The airway cholinergic system: Physiology and pharmacology. *Pulm Pharmacol Ther.* 2004;17:181–98.
 72. Fuji T, Mashimo M, Moriwaki Y, Misawa H, Ono S, Horiguchi K. Expression and Function of the Cholinergic System in Immune Cells. *Front Immunol.* 2017;8:1085.
 73. Koarai A, Ichinose M. Possible involvement of acetylcholine-mediated inflammation in airway diseases. *Allergol Int.* 2018 Oct 1;67(4):460–6.
 74. Dulis B, Gordon M, Wilson I. Identification of muscarinic binding sites in human neutrophils by direct binding. *Mol Pharmacol.* 1979;15(1):28–34.
 75. Bany U, Gajewski M, Ksiezopolska-Pietrzak K. Expression of mRNA encoding muscarinic receptor subtypes in neutrophils of patients with rheumatoid arthritis. *Ann N Y Acad Sci.* 1999;876:301–4.
 76. Profita M, Di Giorgi R, Sala A, Bonanno A, Riccobono L, Mirabella F, et al. Muscarinic receptors, leukotriene B4 production and neutrophilic inflammation in COPD patients. *Giorgi, RD Sala, A Bonanno, A Riccobono, L Mirabella, F Gjomarkaj, M.* 2005 Nov;60(11):1361–9.
 77. Sato E, Koyama S, Okubo Y, Kubo K, Sekiguchi M. Acetylcholine stimulates alveolar macrophages to release inflammatory cell chemotactic activity. *Am J Physiol.*

- 1998;274:L970-979.
78. Thomas MJ, Smith A, Head DH, Milne L, Nicholls A, Pearce W, et al. Airway inflammation: Chemokine-induced neutrophilia and the class I phosphoinositide 3-kinases. *Eur J Immunol.* 2005;35(4):1283–91.
 79. Koarai A, Traves S, Fenwick P, Brown S, Chana K, Rusell R. Expression of muscarinic receptors by human macrophages. *Eur Respir J.* 2012;39:698–704.
 80. Koyama S, Rennard S, Robbins R. Acetylcholine stimulates bronchial epithelial cells to release neutrophil and monocyte chemotactic activity. *Am J Physiol.* 1992;262:L466-471.
 81. Klapproch H, Racke K, Wessler I. Acetylcholine and nicotine stimulate the release of granulocyte-macrophage colony stimulating factor from cultured human bronchial epithelial cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1998;357:472–5.
 82. Cortijo J, Mata M, Milara J, Donet E, Gavalda A, Miralpeix M, et al. Aclidinium inhibits cholinergic and tobacco smoke-induced muc5ac in human airways. *Eur Respir J.* 2011;37:244–54.
 83. Gosens R, Rieks D, Meurs H, Ninaber D, Rabe KF, Nanninga J. Muscarinic M3 receptor stimulation increases cigarette smoke-induced il-8 secretion by human airway smooth muscle cells. *Eur Respir J.* 2009;34:1436–43.
 84. Covantes Rosales CE, Toledo Ibarra GA, Díaz Resendiz KJG, Ventura Ramón GH, Girón Pérez MI, Pavón I. Modulation of the extraneuronal cholinergic system on main innate response leukocytes. *J Neuroimmunol.* 2019;327(Feb 15):22–35.
 85. Viegi G, Pedrschi M, Pistelli F, Di Pede F, Baldacci S, Carozzi L. Prevalence of airways obstruction in a general population: European Respiratory Society vs American Thoracic Society definition. *Chest.* 2000;117(5 suppl 2):339S-345S.
 86. Fletcher C, Peto R. The natural history of chronic airflow obstruction. *Br Med.* 1977;1(2):1645–8.
 87. Cabrera C, Casanova C, Marin Trigo J, De Torres Tajés J, Sicilia Torres R, González J. Validación pronóstica según los criterios de la GesEPOC 2017. *Arch Bronconeumol.* 2019;55:409–13.
 88. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease - 2023 Global Strategy for Prevention, Diagnosis and Management of COPD Report. [Internet]. [cited 2022 Nov 27]. Available from: <https://goldcopd.org/2023-gold-report-2/>

89. Jones PWP, Harding G, Berry P, Wiklund I, Chen WHW, Kline Leidy N. Development and first validation of the COPD Assessment Test. *Eur Respir J*. 2009 Sep;34(3):648–54.
90. Hurst J, Vestbo J, Anzueto A. Evaluation of COPD Longitudinally to Identify Predictive Surrogate Endpoints (ECLIPSE) Investigators. Susceptibility to exacerbation in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med*. 2010;363(12):1128–38.
91. Soler JJ, Sánchez L, Latorre M, Alamar J, Román P, Perpiñá M. The impact of COPD on hospital resources: the specific burden of COPD patients with high rates of hospitalization. *Arch Bronconeumol*. 2001;37(9):375–81.
92. Soler-Cataluña JJ, Martínez-García MÁA, Román P, Salcedo E, Navarro M, Ochando R, et al. Severe acute exacerbations and mortality in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax*. 2005 Nov;60(11):925–31.
93. Soler-Cataluña JJ, Martínez-García MÁ, Sánchez L, Perpiñá M, Román P. Severe exacerbations and BODE index: two independent risk factors for death in male COPD patients. *Respir Med*. 2009;103:692–9.
94. Tashkin D, Celli B, Senn S, Burkhart D, Kesten S, Menjoge S, et al. A 4-year trial of tiotropium in chronic obstructive pulmonary disease (UPLIFT trial). *Rev Port Pneumol*. 2009;15(1):137–40.
95. Peter M.A. Calverley, M.D., Julie A. Anderson, M.A., Bartolome Celli, M.D., Gary T. Ferguson, M.D., Christine Jenkins, M.D., Paul W. Jones, M.D., Julie C. Yates, B.S., and Jørgen Vestbo MD for the T investigators. Salmeterol and Fluticasone Propionate and Survival in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *N Engl J Med*. 2007;356:775–89.
96. van Eerd E, van der Meer R, van Schayck O, Kotz D. Smoking cessation for people with chronic obstructive pulmonary disease. *Cochrane Database Syst Rev*. 2016;8:CD010744.
97. Puhan MMA, Bachmann LLM, Kleijnen J, ter Riet G, Kessels AGA. Inhaled drugs to reduce exacerbations in patients with chronic obstructive pulmonary disease: a network meta-analysis. *BMC Med*. 2009 Jan 14;7:2.
98. Anzueto A, Miravittles M. The role of fixed-dose dual bronchodilator therapy in treating COPD. *Am J Med*. 2018;131:608–22.
99. Calverley P. Breathlessness during exercise in COPD: How do the drugs work? *Thorax*. 2004;59:455–7.
100. Kew K, Mavergames C, Walters J. Long acting beta2-agonists for chronic obstructive

- pulmonary disease. *Cochrane Database Syst Rev.* 2013;10(10):CD010177.
101. Celli B, Decramer M, Kesten S, Liu D, Mehra S, Tashkin D. Mortality in the 4 year trial of Tiotropium (UPLIFT) in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2009;180:948–55.
 102. Vogelmeier C, Hederer B, Glaab T, Schmidt H, Rutten van Molken M, Beeh K. Tiotropium versus salmeterol for the prevention of exacerbations of COPD. *N Engl J Med.* 2011;365:1093–103.
 103. Decramer M, Chapman K, Dahl R, Frith P, Devouassoux G, Fritscher C. INVIGORATE investigators Once-daily indacaterol versus tiotropium for patients with severe chronic obstructive pulmonary disease (INVIGORATE): a randomised, blinded, parallel-group study. *Lancet Respir Med.* 2013;1:524–33.
 104. Han J, Dai L, Zhong N. Indacaterol on dyspnea in chronic obstructive pulmonary disease: a systematic review and meta-analysis of randomized placebo-controlled trials. *BMC Pulm Med.* 2013;13:26.
 105. Geake J, Dabscheck E, Wood-Baker R, Cates C. Indacaterol, a once-daily beta2-agonist, versus twice-daily beta(2)-agonists or placebo for chronic obstructive pulmonary disease. *Cochrane Database Syst Rev.* 2015;1:CD010139.
 106. Koch A, Pizzichini E, Hamilton A. Lung function efficacy and symptomatic benefit of olodaterol once daily delivered via Respimat(R) versus placebo and formoterol twice daily in patients with GOLD 2-4 COPD: results from two replicate 48-week studies. *Int J Chron Obs Pulmon Dis.* 2014;9:697–714.
 107. Kemsford R, Norris V, Siederer S. Vilanterol trifenate, a novel inhaled long-acting beta2 adrenoceptor agonist, is well tolerated in healthy subjects and demonstrates prolonged bronchodilation in subjects with asthma and COPD. *Pulm Pharmacol Ther.* 2013;26(2):256–64.
 108. Di Marco F, Milic-Emili J, Boveri B. Effect of inhaled bronchodilators on inspiratory capacity and dyspnoea at rest in COPD. *Eur Respir J.* 2003;21:86–84.
 109. Johnson M, Rennard S. Alternative mechanisms for long-acting β 2-adrenergic agonists in COPD. *Chest.* 2001;120(1):258–70.
 110. Johnson M. Effects of β 2-agonists on resident and infiltrating inflammatory cells. *J Allergy Clin Immunol.* 2002 Dec 1;110(6 SUPPL.):S282–90.
 111. Melani A. Long-acting muscarinic antagonists. *Expert Rev Clin Pharmacol.*

- 2015;8(4):479–501.
112. Jones PW, Singh D, Bateman ED, Agusti A, Lamarca R, De Miquel G, et al. Efficacy and safety of twice-daily aclidinium bromide in COPD patients: The ATTAIN study. *Eur Respir J*. 2012 Oct 1;40(4):830–6.
 113. Gavaldà A, Miralpeix M, Ramos I, Otal R, Carreño C, Viñals M, et al. Characterization of aclidinium bromide, a novel inhaled muscarinic antagonist, with long duration of action and a favorable pharmacological profile. *J Pharmacol Exp Ther*. 2009;331(2):740–51.
 114. Kerwin E, D'Urzo A, Gelb A, Lakkis H, Garcia Gil E, CF C. Efficacy and safety of a 12-week treatment with twice-daily aclidinium bromide in COPD patients (ACCORD COPD I). *COPD*. 2012;9(2):90–101.
 115. Wise RA, Chapman KR, Scirica BM, Bhatt DL, Daoud SZ, Zetterstrand S, et al. Effect of Aclidinium Bromide on Major Cardiovascular Events and Exacerbations in High-Risk Patients With Chronic Obstructive Pulmonary Disease: The ASCENT-COPD Randomized Clinical Trial. *JAMA*. 2019;321(17):1693–701.
 116. Gelb A, Tashkin D, Make B, Zhong X, Garcia Gil E, CF C. Long-term safety and efficacy of twice-daily aclidinium bromide in patients with COPD. *Respir Med*. 2013;107(12):1957–65.
 117. Gavaldà A, Ramos I, Carcasona C, Calama E, Otal R, Montero JL, et al. The in vitro and in vivo profile of aclidinium bromide in comparison with glycopyrronium bromide. *Pulm Pharmacol Ther*. 2014;28(2):114–21.
 118. Milara J, Serrano A, Peiró T. Aclidinium inhibits human lung fibroblast to myofibroblast transition. *Thorax*. 2012;67(3):229–37.
 119. Ram F, Jones P, Castro A. Oral theophylline for chronic obstructive pulmonary disease. *Cochrane Database Syst Rev*. 2002;4:CD003902.
 120. Ram F, Jardim JRB, Atallah A. Efficacy of theophylline in people with stable chronic obstructive pulmonary disease: a systematic review and meta-analysis. *Respir Med*. 2005;99:135–44.
 121. Barnes PJ. New anti-inflammatory targets for chronic obstructive pulmonary disease. *Nat Rev Drug Discov*. 2013;12(7):543–59.
 122. Halpin DMG, Dransfield MT, Han MK. The effect of exacerbation history on outcomes in the IMPACT trial. *Eur Respir J*. 2020;55:1901921.

123. Yang I, Clarke M, Sim E, Fong K. Inhaled corticosteroids for stable chronic obstructive pulmonary disease. *Cochrane Database Syst Rev.* 2012;7(7):CD002991.
124. Agustí A, Fabbri L, Singh D. Inhaled corticosteroids in COPD: friend or foe? *Eur Respir J.* 2018;52:1801219.
125. Bafadhel M, Peterson S, De Blas M. Predictors of exacerbation risk and response to budesonide in patients with chronic obstructive pulmonary disease: a post-hoc analysis of three randomised trials. *Lancet Respir Med.* 2018;6(2):117–26.
126. Pascoe S, Barnes N, Brusselle G. Blood eosinophils and treatment response with triple and dual combination therapy in chronic obstructive pulmonary disease: analysis of the IMPACT trial. *Lancet Respir Med.* 2019;7:745–56.
127. Pavord IID, Lettis S, Locantore N, Pascoe S, Jones PPW, Wedzicha JA, et al. Blood eosinophils and inhaled corticosteroid/long-acting β -2 agonist efficacy in COPD. *Thorax.* 2016 Feb 1;71(2):118–25.
128. Suissa S, Dell’Aniello S, Ernst P. Comparative effectiveness of LABA-ICS versus LAMA as initial treatment in COPD targeted by blood eosinophils: a population based cohort study. *Lancet Respir Med.* 2018;6:855–62.
129. Nannini L, Poole P, Milan S, Kesterton A. Combined corticosteroid and long-acting beta(2)-agonist in one inhaler versus inhaled corticosteroids alone for chronic obstructive pulmonary disease. *Cochrane Database Syst Rev.* 2013;8(8):CD006826.
130. Vestbo J, Anderson J, Brook R. Fluticasone furoate and vilanterol and survival in chronic obstructive pulmonary disease with heightened cardiovascular risk (SUMMIT): a double-blind randomised controlled trial. *Lancet.* 2016;387(10030):1817–26.
131. Stolz D, Miravittles M. The right treatment for the right patient with COPD: lessons from the IMPACT trial. *Eur Respir J.* 2020;55(5):2000881.
132. Fabbri L, Calverley PMA, Izquierdo-Alonso J. Roflumilast in moderate-to-severe chronic obstructive pulmonary disease treated with long acting bronchodilators: two randomised clinical trials. *Lancet.* 2009;374(9691):695–703.
133. Martinez FJ, Calverley PMA, Goehring UM, Brose M, Fabbri LM, Rabe KF. Effect of roflumilast on exacerbations in patients with severe chronic obstructive pulmonary disease uncontrolled by combination therapy (REACT): A multicentre randomised controlled trial. *Lancet.* 2015 Mar 7;385(9971):857–66.
134. Milara J, Lluch J, Almudever P, Freire J, Xiaozhong Q, Cortijo J. Roflumilast N-oxide

- reverses corticosteroid resistance in neutrophils from patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;134(2).
135. Rennard SI, Calverley PMMA, Goehring UM, Bredenbröker D, Martinez FJ. Reduction of exacerbations by the PDE4 inhibitor roflumilast: the importance of defining different subsets of patients with COPD. *Respir Res*. 2011 Jan 27;12:18.
 136. Calzetta L, Rogliani P, Matera MG, Cazzola M. A Systematic Review With Meta-Analysis of Dual Bronchodilation With LAMA/LABA for the Treatment of Stable COPD. *Chest*. 2016;149:1181–96.
 137. Nici L, Mammen M, Charbek E, Alexander P, Au D, Boyd C. Pharmacologic Management of Chronic Obstructive Pulmonary Disease An Official American Thoracic Society Clinical Practice Guideline. *Am J Respir Crit Care Med*. 2020;201:e56-69.
 138. Lipson DA, Barnhart F, Brealey N, Brooks J, Criner GJ, Day N. Once-Daily Single-Inhaler Triple versus Dual Therapy in Patients with COPD. *N Engl J Med*. 2018;378:1671–80.
 139. Rabe KF, Martinez FJ, Ferguson G, Wang C, Singh D, Wedzicha JA. Triple Inhaled Therapy at Two Glucocorticoid Doses in Moderate-to-Very-Severe COPD. *N Engl J Med*. 2020;383:35–48.
 140. Calzetta L, Coppola A, Ritondo BL, Matino M, Chetta A, Rogliani P. The impact of muscarinic receptor antagonists on airway inflammation: A systematic review. *Int J COPD*. 2021;16:257–79.
 141. Anzalone G, Gagliardo R, Bucchieri F, Albano GD, Siena L, Montalbano AM, et al. IL-17A induces chromatin remodeling promoting IL-8 release in bronchial epithelial cells: Effect of Tiotropium. *Life Sci*. 2016 May 1;152:107–16.
 142. Yamaya M, Nishimura H, Hatachi Y, Yasuda H, Deng X, Sasaki T, et al. Inhibitory effects of tiotropium on rhinovirus infection in human airway epithelial cells. *Eur Respir J*. 2012 Jul 1;40(1):122–32.
 143. Vacca G, Randerath WJ, Gillissen A. Inhibition of granulocyte migration by tiotropium bromide. *Respir Res*. 2011;12:24.
 144. Bucher H, Duechs MJ, Tilp C, Jung B, Erb KJ. Tiotropium attenuates virus-induced pulmonary inflammation in cigarette smoke-exposed mice. *J Pharmacol Exp Ther*. 2016 Jun 1;357(3):606–18.
 145. Wollin L, Pieper MP. Tiotropium bromide exerts anti-inflammatory activity in a cigarette smoke mouse model of COPD. *Pulm Pharmacol Ther*. 2010;23(4):345–54.

146. Kolahian S, Shahbazfar AA, Tayefi-Nasrabadi H, Keyhanmanesh R, Ansarin K, Ghasemi H, et al. Tiotropium effects on airway inflammatory events in the cat as an animal model for acute cigarette smoke-induced lung inflammation. *Exp Lung Res*. 2014;40(6):272–87.
147. Santus P, Buccellati C, Centanni S, Fumagalli F, Busatto P, Blasi F, et al. Bronchodilators modulate inflammation in chronic obstructive pulmonary disease subjects. *Pharmacol Res*. 2012;66(4):343–8.
148. Özol D, Karamanli H, Uysal S, Yiğitoğlu MR, Yildirim Z. Airway inflammation and tiotropium treatment in stable COPD patients. *Turkish J Med Sci*. 2014 Jan 1;44(5):804–8.
149. Holownia A, Mroz RM, Skopinski T, Kielek A, Kolodziejczyk A, Chyczewska E, et al. Tiotropium increases cytosolic muscarinic M3 receptors and acetylated H3 histone proteins in induced sputum cells of COPD patients. *Eur J Med Res*. 2010;15(2):64–7.
150. Perng DW, Tao CW, Su KC, Tsai CC, Liu LY, Lee YC. Anti-inflammatory effects of salmeterol/fluticasone, tiotropium/fluticasone or tiotropium in COPD. *Eur Respir J*. 2009 Apr 1;33(4):778–84.
151. Lin YH, Liao XN, Fan LL, Qu YJ, Cheng DY, Shi YH. Long-term treatment with budesonide/formoterol attenuates circulating CRP levels in chronic obstructive pulmonary disease patients of group D. *PLoS One*. 2017 Aug 1;12(8):1–16.
152. Powrie DJ, Wilkinson TMA, Donaldson GC, Jones P, Scrine K, Viel K, et al. Effect of tiotropium on sputum and serum inflammatory markers and exacerbations in COPD. *Eur Respir J*. 2007;30(3):472–8.
153. Ferraro M, Di Vincenzo S, Dino P, Bucchieri S, Cipollina C, Gjomarkaj M, et al. Budesonide, Aclidinium and Formoterol in combination limit inflammaging processes in bronchial epithelial cells exposed to cigarette smoke. *Exp Gerontol*. 2019;118(June 2018):78–87.
154. Damera G, Jiang M, Zhao H, Fogle HW, Jester WF, Freire J, et al. Aclidinium bromide abrogates allergen-induced hyperresponsiveness and reduces eosinophilia in murine model of airway inflammation. *Eur J Pharmacol*. 2010 Dec 15;649(1–3):349–53.
155. Domínguez-Fandos D, Ferrer E, Puig-Pey R, Carreño C, Prats N, Aparici M, et al. Effects of aclidinium bromide in a cigarette smoke-exposed guinea pig model of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2014 Feb 1;50(2):337–46.

156. Barnes PJ. Corticosteroid resistance in patients with asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;131(3):636–45.
157. Barnes PJ. Mechanisms and resistance in glucocorticoid control of inflammation. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2010;120(2–3):76–85.
158. Lewis-Tuffin L, Cidlowski J. The physiology of human glucocorticoid receptor beta (hGRbeta) and glucocorticoid resistance. *Ann N Y Acad Sci*. 2006;1069:1–9.
159. Marwick JA, Adcock IM, Chung KF. Overcoming reduced glucocorticoid sensitivity in airway disease: Molecular mechanisms and therapeutic approaches. *Drugs*. 2010;70:929–48.
160. Ito K, Yamamura S, Essif-Quaye S, Cosio B, Ito M, Barnes PJ. Histone deacetylase 2-mediated deacetylation of the glucocorticoid receptor enables NF-kappaB suppression. *J Exp Med*. 2006;203((1)):7–13.
161. Lamberts S. Hereditary glucocorticoid resistance. *Ann Endocrinol*. 2001;62:164–7.
162. Lane S, Arm J, Staynov D, Lee T. Chemical mutational analysis of the human glucocorticoid receptor cDNA in glucocorticoid-resistant bronchial asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1994;11:42–8.
163. Bhavsar P, Khorasani N, Hew M, Johnson M, Chung KF. Effect of p38 MAPK inhibition on corticosteroid suppression of cytokine release in severe asthma. *Eur Respir J*. 2010;35:750–6.
164. Ismaili N, Garabedian MJ. Modulation of glucocorticoid receptor function via phosphorylation. *Ann N Y Acad Sci*. 2004;1024:86–101.
165. Bhavsar P, Hew M, Khorasani N, Torrego A, Barnes P, Adcock I, et al. Relative corticosteroid insensitivity of alveolar macrophages in severe asthma compared with non-severe asthma. *Thorax*. 2008;63:784–90.
166. Li L, Goleva E, Hall C, Ou L, Leung D. Superantigen-induced corticosteroid resistance of human T cells occurs through activation of the mitogen-activated protein kinase kinase/extracellular signal-regulated kinase (MEK-ERK) pathway. *J Allergy Clin Immunol*. 2004;114:1059–69.
167. Wallace A, Cidlowski J. Proteasome-mediated glucocorticoid receptor degradation restricts transcriptional signaling by glucocorticoids. *J Biol Chem*. 2001;276:42714–21.
168. Pujols L, Mullol J, Picado C. Alpha and beta glucocorticoid receptors: relevance in airway diseases. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2007;7:93–9.

169. Adcock I., Lane S, Brown C, Lee T, Barnes PJ. Abnormal glucocorticoid receptor/AP-1 interaction in steroid resistant asthma. *J Exp Med.* 1995;182:1951–8.
170. Matthews J, Ito K, Barnes PJ, Adcock IM. Defective glucocorticoid receptor nuclear translocation and altered histone acetylation patterns in glucocorticoid-resistant patients. *J Allergy Clin Immunol.* 2004;113:1100–8.
171. Ito K, Ito M, Elliot W, Cosio B, Caramori G, Kon O. Decreased histone deacetylase activity in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med.* 2005;352:1967–76.
172. Murahidy A, Ito M, Adcock I., Barnes PJ, Ito K. Reduction in histone deacetylase expression and activity in smoking asthmatics: a mechanism of steroid resistance. *Proc Am Thorac Soc.* 2005;2:A889.
173. Barnes P. Reduced histone deacetylase in COPD: clinical implications. *Chest.* 2006;129:151–5.
174. Ito K, Tomita T, Barnes PJ, Adcock IM. Oxidative stress reduces histone deacetylase (HDAC)2 activity and enhances IL-8 gene expression: role of tyrosine nitration. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;315:240–5.
175. Marwick JA, Caramori G, Casolari P, Mazzone F, Kirkham PA, Adcock IM, et al. A role for phosphoinositide 3-kinase δ in the impairment of glucocorticoid responsiveness in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;125(5):1146–53.
176. Culpitt S, Rogers D, Shah P, De Matos C, Russell R, Donnelly L, et al. Impaired inhibition by dexamethasone of cytokine release by alveolar macrophages from patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003;167:24–31.
177. Irusen E, Matthews J, Takahashi A, Barnes P, Chung KF, Adcock IM. p38 mitogen-activated protein kinase-induced glucocorticoid receptor phosphorylation reduces its activity: Role in steroid-insensitive asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2002;109:649–57.
178. Kent L, Smyth L, Plumb J, Clayton C, Fox S, Ray DW. Inhibition of lipopolysaccharide-stimulated chronic obstructive pulmonary disease macrophage inflammatory gene expression by dexamethasone and the p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor n-cyano-n'-(2-[[8-(2,6-difluorophenyl)-4-(4-fluoro-2-methylph. *J Pharmacol Exp Ther.* 2009;458–468.
179. Marwick JA, Wallis G, Meja K, Kuster B, Bouwmeester T, Chakravarty P, et al. Oxidative stress modulates theophylline effects on steroid responsiveness. *Biochem Biophys Res*

- Commun. 2008;377:797–802.
180. Mortaz E, Rad M, Johnson M, Raats D, Nijkam F, Folkerts G. Salmeterol with fluticasone enhances the suppression of il-8 release and increases the translocation of glucocorticoid receptor by human neutrophils stimulated with cigarette smoke. *J Mol Med.* 2008;86:1945–1056.
 181. To M, Ito K, Kizawa Y, Failla M, Ito M, Kusama T, et al. Targeting phosphoinositide-3-kinase- δ with theophylline reverses corticosteroid insensitivity COPD. *Am J Respir Crit Care Med.* 2010;182(7):897–904.
 182. Barnes P. Development of new drugs for COPD. *Curr Med Chem.* 2013;20(12):1531–40.
 183. Hammaker D, Firestein G. ‘Go upstream, young man’’: lessons learned from the p38 saga. *Ann Rheum Dis.* 2010;69(suppl 1):i77-82.
 184. Pehrson R, Hegelund-Myrbäck T, Cunoosamy D, Asimus S, Jansson P, Patel N, et al. AZD7624, an inhaled p38 inhibitor, demonstrates local lung inhibition of LPS-induced TNFa with minimal systemic exposure. *J Pharmacol Exp Ther.* 2018;365(3):567–72.
 185. Gupta S, Sundaram C, Reuter S, Aggarwal B. Inhibiting NF-kappaB activation by small molecules as a therapeutic strategy. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1799:775–87.
 186. Cosio B, Tsaprouni L, Ito K, Jazrawi E, Adcock IM, Barnes P. Theophylline restores histone deacetylase activity and steroid responses in COPD macrophages. *J Exp Med.* 2004;200:689–95.
 187. Ford P, Durham A, Rusell R, Gordon F, Adcock I., Barnes P. Treatment effects of low dose theophylline combined with an inhaled corticosteroid in COPD. *Chest.* 2010;137:1338–44.
 188. Mercado N, TO Y, Ito K, Barnes P. Nortriptyline reverses corticosteroid insensitivity by inhibition of PI3K-d. *J Pharmacol Exp Ther.* 2011;337:465–70.
 189. Sadiq MW, Asimus S, Belvisi MG, Brailsford W, Fransson R, Fuhr R, et al. Characterisation of pharmacokinetics, safety and tolerability in a first-in-human study for AZD8154, a novel inhaled selective PI3K $\gamma\delta$ dual inhibitor targeting airway inflammatory disease. *Br J Clin Pharmacol.* 2021;7.
 190. Mercado N, Thimmulappa R, Thomas C, Fenwick P, Chana K, Donnelly L. Decreased histone deacetylase 2 impairs Nrf2 activation by oxidative stress. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011;406:292–8.

191. Malhotra D, Thimmulappa R, Mercado N, Ito K, Kombairaju P, Kumar S. Denitrosylation of HDAC2 by targeting Nrf2 restores glucocorticosteroid sensitivity in macrophages from COPD patients. *J Clin Invest*. 2011;121:4289–302.
192. Moodley T, Wilson S, Joshi T, Rider C, Sharma P, Yan D, et al. Phosphodiesterase 4 Inhibitors Augment the Ability of Formoterol to Enhance Glucocorticoid-Dependent Gene Transcription in Human Airway Epithelial Cells: A Novel Mechanism for the Clinical Efficacy of Roflumilast in Severe Chronic Obstructive Pulmonary Di. *Mol Pharmacol*. 2013;83:894–906.
193. Mittelstadt PR, Ashwell JD. Inhibition of AP-1 by the glucocorticoid-inducible protein GILZ. *J Biol Chem*. 2001 Aug 3;276(31):29603–10.
194. Wang Z-Q, Xing W-M, Fan H-H, Wang K-S, Zhang H-K, Wang Q-W, et al. The Novel Lipopolysaccharide-Binding Protein CRISPLD2 Is a Critical Serum Protein to Regulate Endotoxin Function. *J Immunol*. 2009;183(10):6646–56.
195. Rossios C, To Y, Osoata G, Ito M, Barnes PJ. Corticosteroid insensitivity is reversed by formoterol via phosphoinositide-3-kinase inhibition. *Br J Pharmacol*. 2012 Oct;167(4):775–86.
196. Milara J, Ortiz J, Juan G, Guijarro R, Almudever P, Martorell M. Cigarette smoke exposure up-regulates endothelin receptor B in human pulmonary artery endothelial cells: molecular and functional consequences. *Br J Pharmacol*. 2010;161:1599–615.
197. Su Y, Han W, Giraldo C, De Li Y, Block E. Effect of cigarette smoke extract on nitric oxide synthase in pulmonary artery endothelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1998;19:819–25.
198. Plumb J, Gaffey K, Kane B, Malia-Milanes B, Shah R, Bentley A. Reduced glucocorticoid receptor expression and function in airway neutrophils. *Int Immunopharmacol*. 2012;12:26–33.
199. Milara J, Armengot M, Bañuls P, Tenor H, Beume R, Artigues E. Roflumilast N-oxide, a PDE4 inhibitor, improves cilia motility and ciliated human bronchial epithelial cells compromised by cigarette smoke in vitro. *Br J Pharmacol*. 2012;166:2243–62.
200. Papi A, Vestbo J, Fabbri L, Corradi M, Prunier H, Cohuet G, et al. Extrafine inhaled triple therapy versus dual bronchodilator therapy in chronic obstructive pulmonary disease (TRIBUTE): a double-blind, parallel group, randomised controlled trial. *Lancet (London, England)*. 2018 Mar 17;391(10125):1076–84.

201. Thomas MJ, Smith A, Head DH, Milne L, Nicholls A, Pearce W, et al. Airway inflammation: Chemokine-induced neutrophilia and the class I phosphoinositide 3-kinases. *Eur J Immunol*. 2005 Apr;35(4):1283–91.
202. Pahl A, Bauhofer A, Petzold U, Cnota PJ, Maus J, Brune K, et al. Synergistic effects of the anti-cholinergic R,R-glycopyrrolate with anti-inflammatory drugs. *Biochem Pharmacol*. 2006 Dec;72(12):1690–6.
203. Kobayashi Y, Mercado N, Barnes PJ, Ito K. Defects of Protein Phosphatase 2A Causes Corticosteroid Insensitivity in Severe Asthma. *PLoS One*. 2011 Dec 19;6(12):e27627.
204. Mercado N, Hakim A, Kobayashi Y, Meah S, Usmani OS, Chung KF, et al. Restoration of Corticosteroid Sensitivity by p38 Mitogen Activated Protein Kinase Inhibition in Peripheral Blood Mononuclear Cells from Severe Asthma. *PLoS One*. 2012 Jul 23;7(7):e41582.

9 ANEXOS

ANEXO 1. HOJA DE RECOGIDA DE DATOS

Nombre _____ NHC _____
Sexo: H M Edad _____ Peso (Kg): _____ Talla (m): _____ IMC (Kg/m²): _____
Tabaquismo > 10 a/p/d: SI NO Fumador actual: SI _____ a/p/d
NO _____ Años exfumador: _____

Fecha de diagnóstico EPOC: _____ Fecha toma de muestra estudio: _____

Espirometría: _____ Fecha _____
FVC (% pred)
FEV₁ (% pred)
FEV₁/FVC
FEV₁ postBD - FEV₁ preBD ≤ 200 ml: SI NO

DLco (%) _____ Fecha _____
Volúmenes pulmonares estáticos: Fecha _____
TLC (% pred)
RV (% pred)
RV/TLC

Estadio GOLD

Gasometría arterial: _____ Fecha _____
PaCO₂ (mmHg) PaO₂ (mmHg) paO₂/FiO₂

Nº agudizaciones/año en el último año: _____

Tratamiento EPOC:
LABA SI NO Cuál _____ LAMA SI NO Cuál _____
Corticoides inhalados Cuál _____ Dosis _____
Inhibidores FD4 SI NO _____ Teofilina SI NO _____

FENOTIPO:

Grado de Disnea (mMRC): _____

CAT:

Escala modificada del Medical Research Council (MMRC)

- | |
|--|
| 0: disnea sólo ante actividad física muy intensa
1: disnea al andar muy rápido o al subir un cuesta poco pronunciada
2: incapacidad de andar al mismo paso que otras personas de la misma edad
3: disnea que obliga a parar antes de los 100 m, a pesar de caminar a su paso y en terreno llano
4: disnea al realizar mínimos esfuerzos de la actividad diaria como vestirse o que impiden al paciente salir de su domicilio |
|--|

Calidad de vida: Cuestionario CAT (COPD Assessment Test)

Ejemplo: Estoy muy contento 0 1 2 3 4 5 Estoy muy triste

		PUNTUACIÓN					
Nunca toso	<input type="radio"/> 0 <input type="radio"/> 1 <input type="radio"/> 2 <input type="radio"/> 3 <input type="radio"/> 4 <input type="radio"/> 5	Siempre estoy tosiendo				<input type="text"/>	
No tengo flema (mucosidad) en el pecho	<input type="radio"/> 0 <input type="radio"/> 1 <input type="radio"/> 2 <input type="radio"/> 3 <input type="radio"/> 4 <input type="radio"/> 5	Tengo el pecho completamente lleno de flema (mucosidad)				<input type="text"/>	
No siento ninguna opresión en el pecho	<input type="radio"/> 0 <input type="radio"/> 1 <input type="radio"/> 2 <input type="radio"/> 3 <input type="radio"/> 4 <input type="radio"/> 5	Siento mucha opresión en el pecho				<input type="text"/>	
Cuando subo una pendiente o un tramo de escaleras, no me falta el aire	<input type="radio"/> 0 <input type="radio"/> 1 <input type="radio"/> 2 <input type="radio"/> 3 <input type="radio"/> 4 <input type="radio"/> 5	Cuando subo una pendiente o un tramo de escaleras, me falta mucho el aire				<input type="text"/>	
No me siento limitado para realizar actividades domésticas	<input type="radio"/> 0 <input type="radio"/> 1 <input type="radio"/> 2 <input type="radio"/> 3 <input type="radio"/> 4 <input type="radio"/> 5	Me siento muy limitado para realizar actividades domésticas				<input type="text"/>	
Me siento seguro al salir de casa a pesar de la afección pulmonar que padezco	<input type="radio"/> 0 <input type="radio"/> 1 <input type="radio"/> 2 <input type="radio"/> 3 <input type="radio"/> 4 <input type="radio"/> 5	No me siento nada seguro al salir de casa debido a la afección pulmonar que padezco				<input type="text"/>	
Duermo sin problemas	<input type="radio"/> 0 <input type="radio"/> 1 <input type="radio"/> 2 <input type="radio"/> 3 <input type="radio"/> 4 <input type="radio"/> 5	Tengo problemas para dormir debido a la afección pulmonar que padezco				<input type="text"/>	
Tengo mucha energía	<input type="radio"/> 0 <input type="radio"/> 1 <input type="radio"/> 2 <input type="radio"/> 3 <input type="radio"/> 4 <input type="radio"/> 5	No tengo ninguna energía				<input type="text"/>	
					PUNTUACIÓN TOTAL <input type="text"/>		

El cuestionario de evaluación de la EPOC CAT y su logotipo es una marca registrada del grupo de compañías GlaxoSmithKline.
 © 2009 Grupo de compañías GlaxoSmithKline. Reservados todos los derechos.
 Last Updated: February 26, 2012

ANEXO 2. CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA EL PACIENTE

TÍTULO DEL ESTUDIO: Análisis de los efectos antiinflamatorios del bromuro de aclidinio sobre los neutrófilos de pacientes con EPOC: una aproximación a los mecanismos de corticorresistencia

INVESTIGADOR PRINCIPAL: Ángela Cervera Juan

CENTRO: Fundación de Investigación Hospital General Universitario de Valencia

INTRODUCCIÓN. Nos dirigimos a Ud. para informarle sobre un estudio de investigación, aprobado por el Comité Ético del Hospital General Universitario en el que se le invita a participar. Nuestra intención es tan sólo que Ud. reciba la información correcta y suficiente para que pueda evaluar y juzgar, si quiere o no participar en este estudio. Para ello le ruego lea esta hoja informativa con atención, pudiendo consultar con las personas que considere oportuno, y nosotros le aclararemos las dudas que le puedan surgir.

PARTICIPACIÓN VOLUNTARIA

Debe saber que su participación en este estudio es voluntaria, y que puede decidir no participar, o cambiar su decisión y retirar su consentimiento en cualquier momento, sin que por ello se altere la relación con su médico ni produzca perjuicio alguno en su tratamiento.

DESCRIPCIÓN GENERAL DEL ESTUDIO

- ¿En qué consiste? ¿Qué objetivo persigue? El estudio consiste en analizar el efecto antiinflamatorio de la medicación bajo investigación y que está aprobada para utilizarse en su enfermedad en células sanguíneas.
- La metodología ¿en que consisten las técnicas a las que se someterá al paciente, como por ejemplo extracciones de sangre, biopsias, electrocardiograma...?¿con qué frecuencia se realizarán? Personal cualificado le extraerá 10 ml de sangre en una sola ocasión, mediante un pinchazo en una vena del brazo.
- ¿Cuántas visitas y pruebas complementarias necesitará? ¿Cuales se van a hacer de forma extraordinaria por su participación en el estudio? Una única visita. No será necesaria ninguna visita complementaria a su médico
- ¿Cuántos pacientes se van a incluir? Se incluirá el mayor número de pacientes posibles

BENEFICIOS Y RIESGOS DERIVADOS DE SU PARTICIPACIÓN EN EL ESTUDIO.

Los inconvenientes y riesgos derivados del estudio, podrían ser, hematoma (moratón), en la zona del pinchazo.

El beneficio que podrá obtener usted y otros pacientes es un tratamiento más eficaz que el actual para su enfermedad.

CONFIDENCIALIDAD Y TRATAMIENTO DE DATOS

El tratamiento, la comunicación y la cesión de los datos de carácter personal de todos los sujetos participantes se ajustará a lo dispuesto en la Ley Orgánica 15/99 de 13 de diciembre de protección de datos de carácter personal. De acuerdo a lo que establece la legislación mencionada, usted puede ejercer los derechos de acceso, modificación, oposición y cancelación de datos, para lo cual se deberá dirigir a su médico del estudio.

Los datos recogidos para el estudio estarán identificados mediante un código y sólo su médico del estudio / colaboradores podrán relacionar dichos datos con Usted y con su historia clínica. Por lo tanto, su identidad no será revelada a persona alguna.

El acceso a su información personal quedará restringido al equipo investigador del estudio / colaboradores, autoridades sanitarias (Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios), al Comité Ético de Investigación Clínica y personal autorizado por el promotor, cuando lo precisen para comprobar los datos y procedimientos del estudio, pero siempre manteniendo la confidencialidad de los mismos de acuerdo a la legislación vigente en nuestro país. Los datos estarán protegidos por la Ley 15/99 de Protección de Datos de Carácter Personal.

La muestras de sangre que nos aporta, será centrifugada para extraer el plasma, será este plasma el que se utilizará para el estudio. El propietario de esta muestra es el investigador principal y se custodiará en la Fundación de Investigación del Hospital General de Valencia, durante un mínimo de 3 años. Únicamente se utilizará la muestra para este estudio.

La responsable del estudio, Angela Cervera Juan del servicio de Neumología del Hospital General Universitario de Valencia (TF XXXXXXXXX) estará a su disposición para cualquier duda que tenga sobre la naturaleza del estudio y destino de las muestras.

Yo,.....,

He leído la hoja de información que se me ha entregado. He podido hacer preguntas sobre el estudio. He recibido suficiente información sobre el estudio.

He hablado con:.....

Comprendo que mi participación es voluntaria.

Comprendo que puedo retirarme del estudio: Cuando quiera. Sin tener que dar explicaciones.

Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio.

Fecha:

Firma del participante:

ANEXO 3. APROBACIÓN DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN



Consorcio Hospital General Universitario de Valencia
Comité Ético de Investigación Clínica

APROBACIÓN PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN - ANEXO 11 -

Este CEIC tras evaluar en su reunión de 27 de Noviembre de 2014 el Proyecto de Investigación:

Título:	New anti-inflammatory drugs for those situations of corticoid-resistance on in vitro models relevant to COPD and ASTHMA		
I.P.:	Dr. Julio Cortijo Gimeno	Servicio/Unidad	Fundación HGUUV

Acuerda respecto a esta documentación:

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

Los miembros que evaluaron esta documentación:

		Presente	Ausente	Disculpa
Presidente	Dr. Severiano Marín Bertolin			X
	D. Ernesto Bataller Alonso	X		
	D. Alejandro Moner González			X
Miembros Lego	Dña. M ^a Teresa Jareño Roglan		X	
	Dña. Encarna Domingo Cebrián	X		
	D. Jaime Alapont Pérez	X		
	Dña. Carmen Sarmiento Cabañes	X		
	D. Antonio Baltasar Olivas Nevado		X	
	Dr. D. José Manuel Irazo Miguélez		X	
	Dr. D. Miguel Armengot Carceller	X		
Vocales	Dr. D. Julio Cortijo Gimeno	X		
	Dra. Dña. Elena Rubio Gomis	X		
	Dr. D. Gustavo Juan Samper	X		
	Dra. Pilar Blasco Segura	X		
	Dra. M ^a José Safont Aguilera	X		
	Dra. Ana Blasco Cordellat	X		



Consorcio Hospital General Universitario de Valencia

Comité Ético de Investigación Clínica

Dr. Antonio Martorell Aragonés
Dr. Aurelio Quesada Dorador
Dr. Pedro Polo Martín
Dra. Inmaculada Sáez Ferrer
Dr. Alberto Berenguer Jofresa
Dra. Goitzane Marcaida Benito
Dr. Javier Milara Payá
Secretario Dra. Ana Minguez Martí

Presente	Ausente	Disculpa
X		
X		
x		
x		
x		
		x
		x
X		

En dicha reunión se cumplieron los requisitos establecidos en la legislación vigente- Real Decreto 223/2004- para que la decisión del citado CEIC sea válida. El CEIC en su composición, como en los PNT cumple con las normas de BPC (CPMP/CH/135/95).

Lo que comunico a efectos oportunos:

Valencia a 04 de diciembre de 2014

Fdo. Dra Elena Rubio Gomis
(Presidenta en funciones CEIC CHGUV)

ANEXO 4. PUBLICACIÓN DERIVADA DE ESTA INVESTIGACIÓN

Milars *et al Respiratory Research* (2016) 17:145
DOI 10.1186/s12931-016-0467-8

Respiratory Research

RESEARCH

Open Access



Non-neuronal cholinergic system contributes to corticosteroid resistance in chronic obstructive pulmonary disease patients

Javier Milars^{1,2,3,10*}, Angela Cervera^{4†}, Alfredo de Diego⁵, Cella Sanz^{1,6}, Gustavo Juan⁴, Amadeu Gavalda⁷, Montserrat Miralpeix⁷, Esteban Mordillo^{3,6,8} and Julio Cortijo^{3,6,9}

Abstract

Background: Inhaled corticosteroid (ICS) with long-acting beta-2 agonists is a well-documented combination therapy for chronic obstructive pulmonary disease (COPD) based on its additive anti-inflammatory properties. By contrast, the recommendation of ICS in combination with long-acting muscarinic antagonist (LAMA) is not evidence-based. In this study, neutrophils obtained from COPD patients were used to compare the anti-inflammatory effects of acclidinium bromide (a long-acting muscarinic antagonist) with corticosteroids and their potential additive effect.

Methods: Human sputum and blood neutrophils were isolated from healthy individuals ($n = 37$), patients with stable COPD ($n = 52$) and those with exacerbated COPD ($n = 16$). The cells were incubated with corticosteroid fluticasone propionate (0.1 nM–1 μ M), acclidinium bromide (0.1 nM–1 μ M) or a combination thereof and stimulated with 1 μ g of lipopolysaccharide/ml or 5 % cigarette smoke extract. Levels of the pro-inflammatory mediators interleukin-8, matrix metalloproteinase-9, CCL-5, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-1 β were measured and the mechanisms of corticosteroid resistance evaluated at the end of the incubation.

Results: The non-neuronal cholinergic system was over-expressed in neutrophils from COPD patients, as evidenced by increases in the expression of muscarinic receptors (M2, M4 and M5), choline acetyltransferase and vesicular acetylcholine transporter. Acclidinium bromide demonstrated anti-inflammatory effects on neutrophils from COPD patients, reversing their resistance to corticosteroids. Additive effects of combined acclidinium bromide and fluticasone propionate in blocking M2 receptor levels, inhibiting phosphoinositide 3-kinase- δ and enhancing the glucocorticoid response element transcription factor were demonstrated and were accompanied by an increase in the corticosteroid-induced expression of anti-inflammatory-related genes.

Conclusions: LAMAs potentiate the anti-inflammatory effects of corticosteroids in neutrophils from COPD patients *in vitro*, thus providing a scientific rationale for their use in combination with corticosteroids in the treatment of COPD.

Keywords: Neutrophils, COPD, Corticosteroid resistance, Acclidinium bromide, Non-neuronal cholinergic system

* Correspondence: jmilars@hotmail.com

†Equal contributors

¹Department of pharmacology, faculty of medicine, Jaume I University, Castellón, Spain

²Pharmacy Unit, University General Hospital Consortium, Valencia, Spain
Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2016 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

Background

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is characterised by airway and systemic inflammation leading to airway remodelling and obstruction that are not completely reversible. The current first-line maintenance treatment for COPD involves the use of bronchodilators, including long-acting muscarinic antagonists (LAMAs) and long-acting beta agonists (LABAs). Inhaled corticosteroids (ICS), despite their good activity in asthma, are much less effective in improving lung function and have little or no effect in controlling the underlying chronic inflammation in COPD [1]. Combined therapies, consisting of ICS + LABAs, LABA + LAMA, as well as LAMA monotherapy are common options for COPD patients at increased risk of an exacerbation of moderate symptoms [2–4]. Triple therapy based on ICS in combination with LABAs and LAMAs is indicated in patients with severe COPD who are at risk of disease exacerbation [5]. In the latter patients, the effective agents include the phosphodiesterase 4 (PDE4) inhibitor roflumilast, an anti-inflammatory agent used to reduce exacerbations of chronic bronchitis [6].

The rationale for drug combinations to achieve additive or synergistic effects in the treatment of COPD comes from clinical randomised studies and can be explained by pharmacologic molecular interactions. Thus, for example, LABAs increase corticosteroid responsiveness by reversing glucocorticoid receptor alpha (GR α) phosphorylation at serine 226 (Ser226) and promoting GR α nuclear translocation [7, 8]. Recent evidence indicates that LABAs reverse corticosteroid insensitivity by attenuating oxidative stress and inhibiting phosphoinositide-3-kinase delta (PI3K δ), thus allowing the efficient action of histone deacetylase-2 (HDAC2) and GR α [9]. These mechanisms, which are shared with theophylline [7] and, as shown recently, roflumilast [10], explain the clinical benefits of combination therapy to improve corticosteroid anti-inflammatory effects in COPD. However, the use of LABAs + ICS is thus far not evidence-based, although its potential efficacy is suggested by the current Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD 2015) guidelines.

COPD is associated with increased pulmonary vagal activity [11]. Muscarinic antagonists are effective drugs for the treatment of COPD because their anticholinergic effect results in the relaxation of airway smooth muscle [12]. In addition, a non-neuronal cholinergic system has been demonstrated in human airway epithelial cells [13], lung fibroblasts [14], alveolar macrophages [15] and sputum neutrophils [16] and represents a previously unappreciated regulatory pathway in pulmonary inflammation and remodelling. Because dysfunction of the non-neuronal cholinergic system appears to be involved in the pathophysiology of COPD [17], the potential anti-inflammatory

and anti-remodelling effects of muscarinic antagonists, shown in preclinical models [18], may be of added value to their established bronchodilation in the management of chronic respiratory diseases. The persistent activation of neutrophils, as the primary effector cell involved in the inflammatory process of COPD, contributes to its pathogenesis [19]. Current anti-inflammatory therapies based on corticosteroids poorly regulate neutrophil activation, which has limited their clinical effectiveness [10, 20]. The aim of this study was to provide scientific evidence of the anti-inflammatory effects of the anticholinergic agent acridinium bromide in the corticosteroid-insensitive neutrophils from COPD patients. Our results provide support for the scientific rationale regarding the use of combined LABAs and ICS therapy in patients with COPD.

Methods

All reagents were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) unless otherwise stated.

Patients

Sputum neutrophils, peripheral blood neutrophils and whole blood were obtained from COPD patients who were smokers and from healthy non-smoking controls. The study population consisted of 52 patients with stable COPD, defined according to the 2013 GOLD guidelines, 16 patients with severe exacerbated COPD and 37 age-matched non-smoking healthy controls with normal lung function. Neutrophils from patients with stable COPD were used in the mechanistic experiments, and those from patients with exacerbated COPD to measure the basal expression of non-neuronal cholinergic components in neutrophils. All patients with exacerbated disease were hospitalised because of airway bacterial infections, confirmed by bacteriological analysis of blood and sputum. Cell samples from patients with exacerbated COPD were collected before starting treatment with oral corticosteroids. The minimum washout period in stable COPD patients for sampling sputum or blood was 4 days, which avoided effects of chronic medication on the results. All COPD patients were current smokers and had bronchitis. In the patients with stable COPD, there were no disease exacerbations within 2 weeks prior to sample collection. Routine lung function tests were performed to evaluate forced vital capacity (FVC), forced expiratory volume in one second (FEV1) and FEV1/FVC ratio using a Vitalograph[®] α III spirometer (Vitalograph, Maids Moreton, UK). The clinical features of the study population are summarised in Table 1. This project was approved by the local Ethics Committee of the University General Hospital of Valencia, Spain. Written informed consent was obtained from each patient or volunteer before starting sputum/blood sampling and lung function testing.

Table 1 Clinical features. COPD: chronic obstructive pulmonary disease; FEV1: forced expiratory volume in one second; FVC: forced vital capacity; Pack-yr = 1 year smoking 20 cigarettes-day. Data are mean \pm SD. * $P < 0.05$ related to Healthy subjects

	Healthy (n = 37)	Stable COPD (n = 52)	Exacerbated COPD (n = 16)
Age, yr	66.1 \pm 6	65.1 \pm 14	63.8 \pm 8.4
Sex (M/F)	27/10	35/17	12/4
Tobacco consumption, pack-yr	0	35.2 \pm 6*	42.3 \pm 13*
FEV1, % pred	98 \pm 3	53.2 \pm 3*	38.0 \pm 13*
FVC, % pred	96 \pm 4	90.2 \pm 6	89.5 \pm 8
FEV1/FVC %	98 \pm 3	50.1 \pm 6*	46.2 \pm 9*
GOLD 1 (mild) patients, no.	0	0	0
GOLD 2 (moderate) patients, no.	0	36	3
GOLD 3 (severe) patients, no.	0	16	10
GOLD 4 (very severe) patients, no.	0	0	3
Receiving inhaled steroids, no.	0	26	16
Receiving theophyllines, no.	0	0	0
Receiving long-acting β_2 -agonist, no.	0	49	16
Receiving anticholinergics, no.	0	41	13
Total peripheral blood neutrophils	4.2 \pm 0.3 $\times 10^9/L$	8.2 \pm 1.3 $\times 10^9/L$ *	9.9 \pm 0.2 $\times 10^9/L$ *

Human neutrophil isolation

Neutrophils were isolated from peripheral venous blood and cultured as previously outlined [21], using 3 % dextran 500 (in 0.9 % saline) together with Ficoll-Paque Histopaque 1077 (Amersham Pharmacia Biotech, Barcelona, Spain) at a ratio of 2:1. The neutrophil preparations were >97 % pure as assessed by Giemsa staining and had viability of >99 % as measured by trypan blue exclusion. Neutrophils from spontaneous sputum (~2 ml) were collected from patients with stable and exacerbated COPD and processed with dithiothreitol using established methods [22]. Sputum cell pellets were resuspended in RPMI 1640 supplemented with 10 % foetal calf serum, 1 % penicillin-streptomycin and 1 mmol/L-glutamine/L at a concentration of 1×10^6 cells/ml. An aliquot containing 4×10^5 cells was incubated on a 24-well plate for 1 h at 37 °C in humidified 5 % CO₂. Preparations containing < 95 % neutrophils were discarded. Neither the purity nor the viability of the cell preparations was affected by the different experimental conditions of the study.

Preparation of cigarette smoke extract solutions

Cigarette smoke extract (CSE) was prepared as previously outlined [23]. Briefly, the smoke of a research cigarette (2R4F; Tobacco Health Research, University of Kentucky, Lexington, KY, USA) was generated by a respiratory pump (Rodent Respirator 680; Harvard Apparatus, March-Hugstetten, Germany) through a puffing mechanism mimicking the human smoking pattern (3 puffs/min; 1 puff 35 ml; each puff of 2 s duration,

0.5 cm above the filter) and was bubbled into a flask containing 25 ml of pre-warmed (37 °C) RPMI 1640 culture medium. The resulting CSE solution was considered as 100 % CSE and used for experiments within 30 min of preparation. CSE 10 % corresponded approximately to the exposure associated with smoking two packs of cigarettes per day [24]. To test for cytotoxicity/apoptosis induced by CSE, isolated neutrophils were treated with CSE concentrations of up to 5 % for 6 h. No significant difference in the lactate dehydrogenase level (lactate dehydrogenase cytotoxicity assay; Cayman Chemical, Madrid, Spain) or annexin V-FITC was observed between the CSE and control groups (data not shown).

Cell stimulations and cytokine assays

Sputum and peripheral blood neutrophils were adjusted to 500×10^3 cells per well in 24-well plates and incubated in RPMI 1640 for 1 h at 37 °C, 5 % CO₂. The cells were then left untreated or treated with long-acting muscarinic antagonist acclidinium bromide (0.1 nM–1 μ M; Almirall Laboratories, Barcelona, Spain), muscarinic antagonist atropine (0.1 nM–1 μ M), corticosteroid fluticasone propionate (0.1 nM–1 μ M), long-acting beta 2 agonist formoterol (0.01 nM–100 nM), long-acting beta 2 agonist salmeterol (0.1 nM–1 μ M), the muscarinic receptor type 3 (M3) inhibitor p-fluoro-hexahydroindolifenidol (pFHHSid; 10 nM, 1 μ M), the M2 inhibitor methoctramine (100 nM, 1 μ M), the PI3K inhibitor LY294002 (1 μ M) or the nicotinic receptor antagonist hexamethonium (100 μ M) for 1 h before they were stimulated with 1 μ g of lipopolysaccharide (LPS)/ml, CSE 5 % or 10 μ M carbachol. In other

experiments, 10 U of acetylcholinesterase (AChE)/ml was added 1 h before the stimulus to remove extracellular acetylcholine and during the 6-h period of LPS or CSE stimulation. CSE 5 % was selected as a stimulus in sputum neutrophils because LPS alone did not increase interleukin (IL)-8 levels over basal values, as previously reported [25].

The stimuli and drugs were incubated together with the cells for 6 h. Supernatants were collected and centrifuged at $120 \times g$ for 5 min. The cell-free supernatant was used to measure IL-8, metalloproteinase-9 (MMP9), CCL-5, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and IL-1 β . Cellular extracts were used to measure mRNA expression after 6 h of cell stimulation. IL-8 levels were measured using a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay kit for IL-8 (R&D Systems, Nottingham, UK) according to the manufacturer's protocol. MMP9, CCL-5, GM-CSF and IL-1 β were measured using LUMINEX technology, in accordance with the manufacturer's protocol.

Real-time RT-PCR and siRNA experiments

Total RNA was isolated from sputum or peripheral blood neutrophils using the TriPure[®] isolation reagent (Roche, Indianapolis, IN, USA). The integrity of the extracted RNA was confirmed with Bioanalyzer (Agilent, Palo Alto, CA, USA). Reverse transcription was performed using 300 ng of total RNA with a TaqMan reverse transcription kit (Applied Biosystems, Perkin-Elmer Corporation, CA, USA). cDNA was amplified using specific primers together with probes pre-designed by Applied Biosystems for organic transporter cation 1 (OTC1; cat. no. Hs00222691_m1), OTC2 (cat. no. Hs01010726_m1), OTC3 (cat. no. Hs00427552_m1), choline acetyltransferase (CHAT; cat. no. Hs00252848_m1), high-affinity choline transporter (ChT1; cat. no. Hs00222367_m1), M1 (cat. no. Hs00265195_s1), M2 (cat. no. Hs00265208_s1), M3 (cat. no. Hs00265216_s1), M4 (cat. no. Hs00265219_s1), M5 (cat. no. Hs00255278_s1), β 2 adrenergic receptor (β 2ADR; cat. no. Hs00240532_s1), vesicular acetylcholine transporter (cat. no. VACHT; Hs00268179_s1), macrophage migration inhibitory factor (MIF; cat. no. Hs00236988), mitogen-activated protein kinase phosphatase 1 (MKP-1; cat. no. Hs00610256), PI3K- δ (cat. no. Hs00192399), HDAC2 (cat. no. Hs00231032), GR α (cat. no. Hs00353740_m1), cysteine-rich secretory protein LCCL domain-containing 2 (CRISPLD2; cat. no. Hs00230322_m1) and glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ; cat. no. Hs00608272_m1) genes in a 7900HT Fast Real-Time PCR system (Applied Biosystems) using Universal Master Mix (Applied Biosystems).

Expression of the target gene was reported as the fold increase or decrease relative to the expression of GAPDH as an endogenous control (Applied Biosystems; 4310884E).

The mean value of the replicates for each sample was calculated and expressed as the cycle threshold (Ct). The level of gene expression was then calculated as the difference (Δ Ct) between the Ct value of the target gene and the Ct value of GAPDH. The fold changes in the target gene mRNA levels were expressed as $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

Small interfering RNA (siRNA), including the scrambled siRNA control, was purchased from Ambion (Huntingdon, Cambridge, UK). Cultured human bronchial epithelial cells Beas2B were transfected with 50 nM of a commercial siRNA against the M2 (PN 4392421; Ambion, Austin TX, USA) or M3 (PN 4390815; Ambion, Austin TX, USA) gene or with 50 nM of the siRNA control (Ambion, Huntingdon, Cambridge, UK) in serum-free and antibiotic-free medium. After 6 h, the medium was aspirated and replaced with medium containing serum for a further 48 h. Lipofectamine-2000 (Invitrogen, Paisley, UK), at a final concentration of 2 μ g/mL, was used as the transfection reagent.

Glucocorticoid response element transfection assay

Beas2B epithelial cells were seeded (40,000 cells/well) and cultured for 24 h under a 5 % CO₂/air atmosphere at 37 °C in 96-well plates containing Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM). The Signal GRE reporter assay kit (Qiagen, cat. no. 336841) was used to monitor the activity of glucocorticoid receptor-induced signal transduction pathways in cultured cells, following the manufacturer's indications. First, the cells were transfected with M2- or M3-gene-targeted siRNA or the scrambled siRNA control as described above. After 24 h, the cells were transfected with Signal reporter (100 ng), the Signal negative control (100 ng) and the Signal positive control (100 ng) in Opti-MEM serum-free culture medium using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) as the transfection reagent. Subsequently, the cells were incubated with the transfection reagents at 37 °C in a 5 % CO₂ incubator for 16 h and then pre-incubated for another 6 h with different fluticasone propionate and drug combinations at different concentrations in DMEM.

After the second 6-h incubation, the luciferase assay was developed using the Dual-Luciferase Reporter Assay system (Promega, cat. no. 1910) following the manufacturer's protocol. In brief, the growth medium was removed from the cultured cells, which were then washed gently with phosphate-buffered saline (PBS). After complete removal of the rinse solution, passive lysis buffer 1 \times was added. The culture plate was then placed on an orbital shaker for gentle shaking at room temperature for 15 min. The luciferase assay reagent II (LAR II) was prepared by resuspending the provided lyophilised luciferase assay substrate in 10 mL of the supplied luciferase assay buffer II. One hundred microliters of LAR II was dispensed into the appropriate number

of wells of a white 96-well plate, followed by 20 μ l of cell lysate and mixing by pipetting two or three times. The assay plate was placed in a luminometer (Victor Luminometer, Perkin-Elmer, Madrid, Spain) and firefly luciferase activity was measured. Just before use, the Stop & Glo reagent was prepared by diluting 1 volume of the Stop & Glo substrate with 50 volumes of Stop & Glo buffer. After the measurement of luciferase activity, 100 μ l of Stop & Glo reagent was dispensed in the corresponding wells and a second luminometer reading was initiated, recording *Renilla* luciferase activity. The data are expressed as 2 \times the GRE-reporter fold induction of luciferase relative to that of unstimulated cells.

Western blot

Western blot analysis was used to detect changes in p-ERK1/2, p-p38, MKP1 and phospho-serine 226-GR. Neutrophils incubated in RPMI 1640 were treated with fluticasone propionate, acridinium bromide or a combination thereof for 1 h and stimulated with LPS for 30 min. The cells were then centrifuged and total protein was extracted as previously outlined [26].

Electrophoresis was carried out using 20 μ g of protein (denatured) and a molecular mass protein marker (Bio-Rad Kaleidoscope marker; Bio-Rad Laboratories Ltd.) loaded onto an acrylamide gel consisting of a 5% acrylamide stacking gel and a 10% acrylamide resolving gel. After electrophoresis at 100 V for 1 h, the proteins were transferred from the gel to a polyvinylidene difluoride membrane using a wet blotting method. The membrane was blocked with 5% Marvel in PBS containing 0.1% Tween20 (PBS-T), probed with a rabbit anti-human p-ERK1/2 (1:1000) antibody (monoclonal antibody; Cell Signaling, Boston, MA, USA; cat. no. 43765) and normalised to total rabbit anti-human ERK1/2 (1:1000) antibody (monoclonal antibody; Cell Signaling; cat. no. 4695); rabbit anti-human phospho-p38 (1:1000) antibody (monoclonal antibody; Cell Signaling; cat. no. 4631) normalised to total rabbit anti-human p38 (1:1000) antibody (monoclonal antibody; Cell Signaling; cat. no. 9212); rabbit anti-human polyclonal MKP1 (1:1000) antibody (Assay Biotech; cat. no. B1099) normalised to total mouse anti-human β -actin (1:10,000) antibody (monoclonal antibody; cat. no. A1978; Sigma); or rabbit anti-human polyclonal phospho-GR-Ser226 (1:1000) antibody (Novus Biologicals, Littleton, CO, USA; cat. no. NB100-92540), rabbit anti-human polyclonal M1 (1:1000) antibody (Sigma; cat. no. M9808), rabbit anti-human polyclonal M2 (1:1000) antibody (Sigma; cat. no. M9558), rabbit anti-human polyclonal M3 (1:1000) antibody (Sigma; cat. no. M0194), mouse anti-human monoclonal M4 (1:1000) antibody (Merck Millipore, Madrid, Spain; cat. no. MAB1576), or rabbit anti-human polyclonal M5 (1:1000) antibody (Novus Biologicals; cat. no. NBP1-00907) normalised to mouse anti-human monoclonal GR α (1:1000) antibody (BD

Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA; cat. no. 611227). The enhanced chemiluminescence method of protein detection (ECL Plus; Amersham GE Healthcare, Little Chalfont, UK) was used to detect labeled proteins. Protein expression was quantified by densitometry relative to normalised antibody expression using the software GeneSnap version 6.08. The results are expressed as ratios of the endogenous controls as appropriate.

PI3K δ activity

To measure PI3K δ activity, neutrophils from COPD patients were isolated and then incubated with acridinium bromide (10 nM), atropine (100 nM), LY294002 (1 μ M), methoctramine (1 μ M) or pFHHSid (1 μ M) for 1 h. The cells were stimulated with LPS for 30 min and then centrifuged. Total protein was extracted and the amount measured using the Bio-Rad assay (Bio-Rad Laboratories Ltd., Hemel Hempstead, UK) to ensure equal amounts (500 μ g) in the immunoprecipitation reaction with anti-PI3-kinase δ antibody (p110 δ ; ab32401; Abcam, Cambridge, UK). PI3K activity was measured using the PI3-kinase activity ELISA (cat. no. k-1000s; Echelon Bioscience, Salt Lake City, UT, USA), in accordance with the manufacturer's protocol. In brief, PI3-K reactions were run with the class I PI3-K physiological substrate PI [4, 5] P₂ (PIP₂). The enzyme reactions, PIP₃ standards and controls were then mixed and incubated with PIP₃ binding protein, which is highly specific and sensitive to PIP₃. This mixture was transferred to a PIP₃-coated microplate for competitive binding and the amount of PIP₃ produced by PI3-K was then detected, using a peroxidase-linked secondary detector and colourimetric detection, comparing the enzyme reactions with a PIP₃ standard curve. The results are expressed as pmol PI [3-5] P₃ per mg of protein.

Data analysis

The data were subjected to a parametric analysis, with $p < 0.05$ considered indicative of statistical significance. Parametric data are expressed as the mean \pm SD of n experiments using a Student's t -test and one-way or two-way analysis of variance (ANOVA) followed by a Bonferroni post hoc test. The concentration of acridinium bromide, fluticasone propionate, formoterol or salbutamol producing 50% inhibition (IC₅₀) was calculated from the concentration-response curves by nonlinear regression in neutrophils from healthy individuals and COPD patients.

Results

Basal activation of non-neuronal cholinergic system components in neutrophils from COPD patients

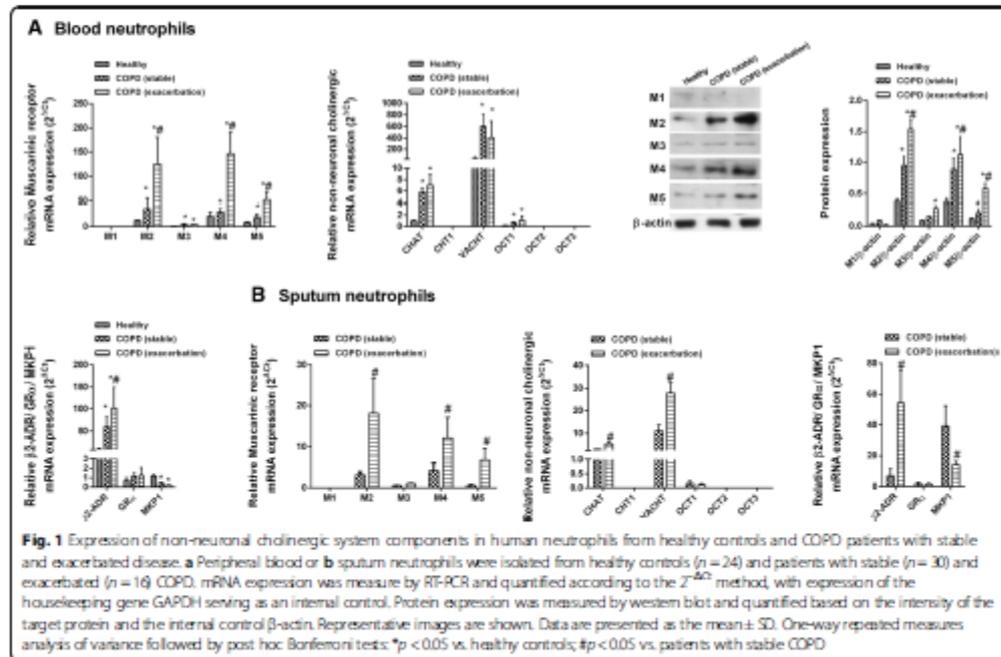
Basal levels of the mRNA and protein of muscarinic receptor subtypes M2 and M4 were expressed in neutrophils from healthy individuals and from patients with

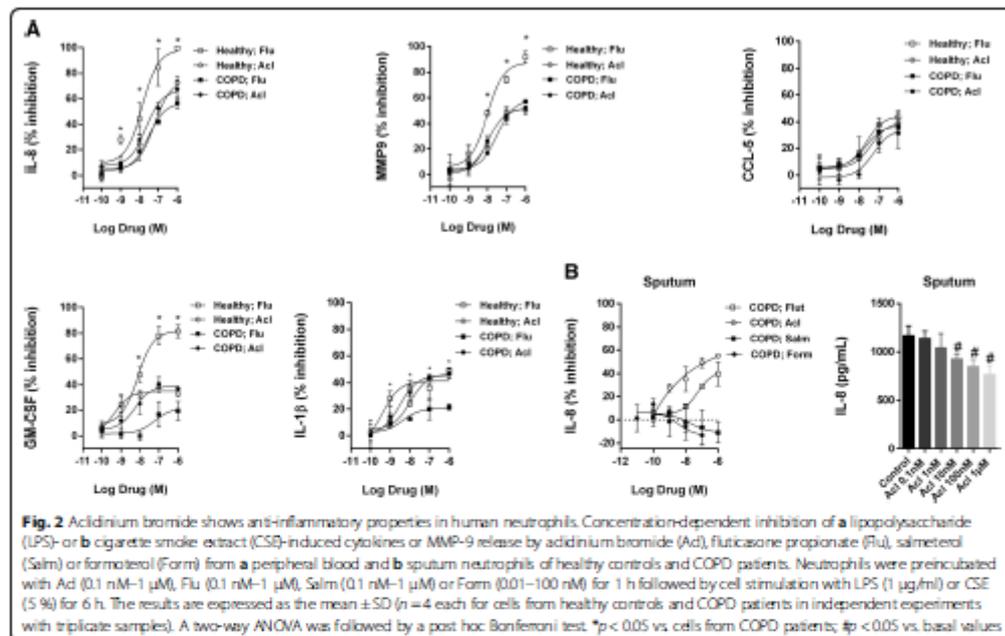
stable COPD and induced in neutrophils from patients with exacerbated disease, in both peripheral blood and sputum (Fig. 1). M3 and M5 were detected at low levels but induced in neutrophils from patients with exacerbated COPD, while M1 expression was virtually absent. ChAT, the enzyme responsible for the generation of intracellular acetylcholine, was detected in blood and sputum neutrophils from healthy individuals and increased in COPD patients (Fig. 1). VACHT, responsible for loading acetylcholine into secretory organelles, was over-expressed in neutrophils from COPD patients (Fig. 1). OCT1, the transmembrane protein that transports acetylcholine, was detected at low levels but increased in COPD patients, while OCT2 and OCT3 were not detected (Fig. 1), nor was the high-affinity choline transporter ChT1. Beta 2 adrenoceptor ($\beta 2$ -ADR) was detected in neutrophils from healthy donors and over-expressed in neutrophils from COPD patients, while there was no difference in $GR\alpha$ expression between groups. By contrast, MKP1 was down-regulated in neutrophils from patients with stable and exacerbated COPD (Fig. 1).

Inhibition of neutrophil response by acridinium bromide and fluticasone propionate

In peripheral blood neutrophils from healthy controls, fluticasone propionate (0.1 nM–1 μ M) concentration-

dependently inhibited the cytokine secretion induced by LPS (1 μ g/ml), nearly completely suppressing IL-8, MMP9, GM-CSF and to a lesser extent IL-1 β and CCL-5 secretion (Fig. 2a, Additional file 1: Table SE1). By contrast, the inhibitory effect of fluticasone propionate was impaired in neutrophils from COPD patients, with less than half of the percent maximum effect observed in healthy control neutrophils; the exception was CCL-5 (Fig. 2a, Additional file 1: Table SE1). Acridinium bromide was less effective than fluticasone propionate in inhibiting cytokine secretion in neutrophils from healthy individuals, achieving 72, 50, 46, 39 and 33 % of the maximal inhibition for IL-8, MMP9, IL-1 β , CCL-5 and GM-CSF, respectively; however, in neutrophils from COPD patients, it exhibited similar inhibitory effects. In sputum neutrophils from COPD patients stimulated with CSE 5 %, < 40 % of maximal IL-8 inhibition was achieved with fluticasone propionate (Fig. 2b, Additional file 1: Table SE1), whereas acridinium bromide concentration-dependently inhibited CSE-induced IL-8 secretion in sputum neutrophils of COPD patients with similar potency and maximal effects observed in peripheral neutrophils from healthy and COPD patients. Acridinium bromide also significantly inhibited basal IL-8 secretion in unstimulated sputum cells (Fig. 2b, Additional file 1: Table SE1). Formoterol exerted pro-inflammatory effects on IL-8,





GM-CSF and IL-1 β secretion in both peripheral blood and sputum neutrophils from healthy controls and COPD patients (Fig. 2b, Additional file 2: Figure SE1 and Additional file 1: Table SE1), while salmeterol showed weak inhibitory or pro-inflammatory effects depending on the measured cytokine (Fig. 2b, Additional file 2: Figure SE1 and Additional file 1: Table SE1). The pro-inflammatory actions of formoterol and salmeterol were inhibited by propranolol, which implied a role for β 2-ADR (data not shown).

Effect of the combination of acridinium bromide and fluticasone propionate on neutrophil response

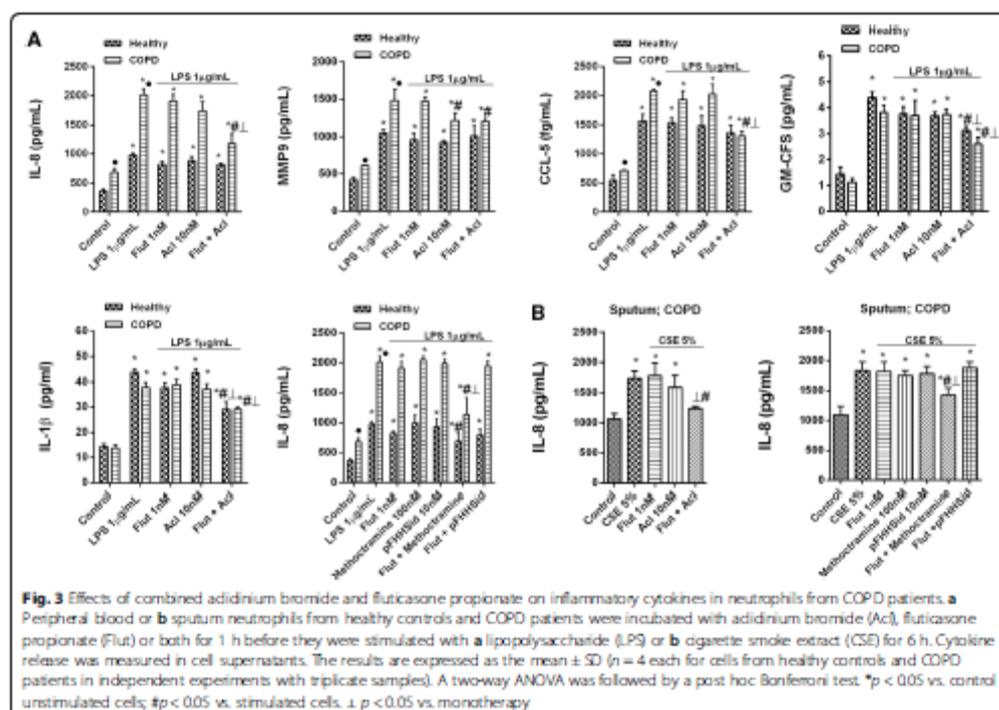
Whether the anti-inflammatory effects of acridinium bromide and fluticasone propionate are additive was tested using suboptimal concentrations of the drugs based on their concentration-dependent inhibitory curves. In peripheral blood neutrophils, the combination of fluticasone propionate (1 nM) and acridinium bromide (10 nM) showed additive effects, resulting in nearly 50 % inhibition of LPS-induced IL-8, CCL-5, GM-CSF and IL-1 β , but not MMP9 (Fig. 3). Suboptimal concentrations of fluticasone propionate in combination with 100 nM of the M2 inhibitor methoctramine [27] reproduced the additive effects observed with acridinium bromide, whereas this was not the case with the M3 inhibitor pFHHSid (Fig. 3). Similar results were obtained in sputum neutrophils from COPD patients.

Non-neuronal cholinergic activation in neutrophils from COPD patients

The muscarinic receptor agonist carbachol was used as a stimulus to explore functional muscarinic receptor activation in neutrophils. Carbachol (10 μ M) induced IL-8 release in isolated blood and sputum neutrophils. This effect was concentration-dependently inhibited by acridinium bromide but not by hexamethonium (Fig. 4), which ruled out the involvement of nicotinic receptors. To eliminate the contribution of extracellular acetylcholine to neutrophil activation, acetylcholinesterase was added 1 h before and again during neutrophil stimulation with LPS or CSE. Acetylcholinesterase attenuated the IL-8 release induced by LPS in peripheral blood neutrophils and by CSE in the sputum neutrophils of COPD patients, suggesting a role for extracellular acetylcholine in neutrophil activation (Fig. 4).

Mechanisms involved in the improved anti-inflammatory effects of fluticasone propionate when combined with acridinium bromide in neutrophils from COPD patients

In peripheral blood neutrophils from COPD patients, the combination of fluticasone propionate and acridinium bromide did not affect the expression of corticosteroid modulator molecules including macrophage migration inhibitory factor (MIF), HDAC2 and GR α . However, together the two drugs increased the expression of the



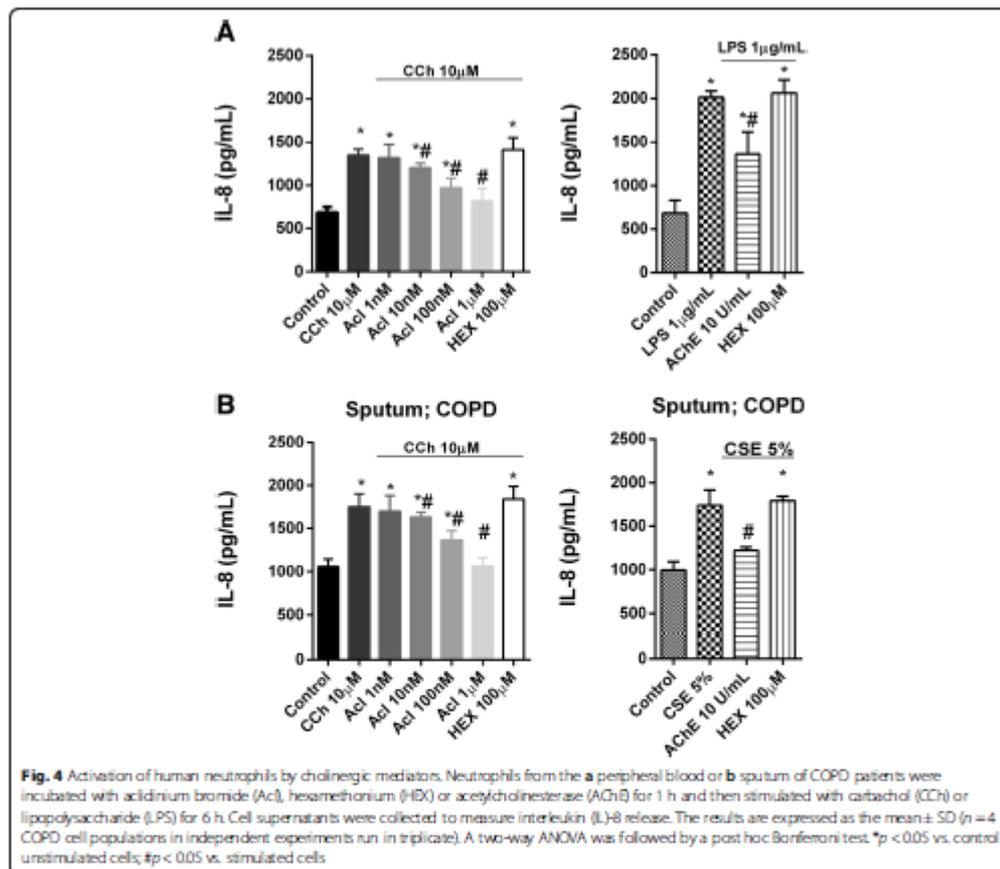
corticosteroid-inducible genes MKP1, CRISPLD2 and GILZ to a greater extent than achieved with fluticasone propionate monotherapy (Fig. 5), consistent with the increased activation of the glucocorticoid response element (GRE).

To corroborate this hypothesis, bronchial epithelial cells Beas2B were transfected with a GRE reporter construct. Treatment of these 2xGRE-Beas2B reporter cells with dexamethasone (0.1 nM–1 μ M) for 6 h induced GRE-dependent transcription in a concentration-dependent manner (Fig. 6a). Neither acridinium bromide nor atropine as monotherapy modified the GRE signal (Fig. 6a), whereas it was increased significantly by combinations of increasing concentrations of acridinium bromide, atropine or the PI3K inhibitor LY294002 with a fixed (1 nM) concentration of fluticasone propionate (Fig. 6b). Similar results were obtained with combinations of fixed concentrations of acridinium bromide (10 nM) or LY294002 (1 μ M) with increasing concentrations of fluticasone propionate (Fig. 6c). In siRNA-M2 cells, fluticasone-propionate-induced GRE activation was higher than in siRNA-M3 or control siRNA(-) cells, suggesting the participation of M2 receptors (Fig. 6d). Acridinium bromide, atropine, methocarbamol and LY294002 (but not pFHHSid) inhibited LPS-induced p38 δ activity in COPD blood neutrophils

(Fig. 6e). Additional mechanistic investigations showed that acridinium bromide in combination with fluticasone propionate potentiated the inhibition of p-ERK1/2, p-p38 and GRSer226 and increased the expression of MKP1 over the level achieved with either drug alone (Fig. 7).

Discussion

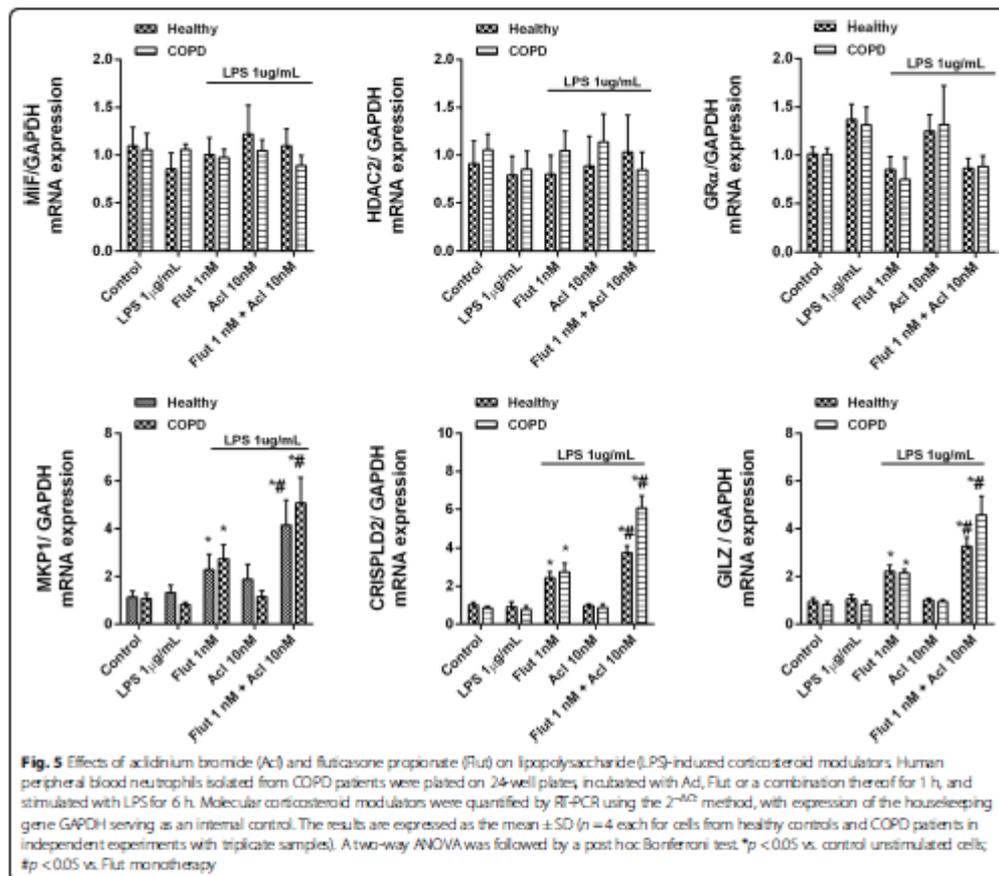
This study provided novel evidence of the additive anti-inflammatory properties of acridinium bromide and fluticasone propionate in neutrophils from COPD patients. It thus establishes a scientific rationale for future clinical research with ICS/LAMA combinations in COPD. We also demonstrated activation of the non-neuronal cholinergic system in the blood and sputum neutrophils of COPD patients and the effective reduction of cytokine and metalloproteinase release in acridinium-bromide-treated neutrophils from COPD patients. The combination of acridinium bromide and fluticasone propionate increased the impaired anti-inflammatory properties of the latter drug by a mechanism involving the inhibition of GR α phosphorylation at Ser-226, the enhancement of fluticasone-propionate-mediated GRE activation and the expression of corticosteroid-dependent anti-inflammatory genes including MKP1, CRISPLD2 and GILZ.



In the treatment of mild to severe COPD, ICS in combination with LABAs plays an essential role in patients at risk of disease exacerbation. Although recent randomised clinical trials showed that ICS withdrawal did not increase the number of exacerbations in patients with severe COPD under LABA/LAMA/ICS triple therapy [28], the reduced FEV1 and impaired quality of life after ICS cessation provided evidence of the benefit of ICS in COPD [28, 29]. However, ICS monotherapy is not indicated; instead, the combination of ICS with LABAs has been broadly prescribed as it is more effective than either agent alone in improving lung function and health status and in reducing exacerbation in patients with moderate to very severe COPD [2]. Nonetheless, the recommendation for combined ICS/LAMA is not evidence-based.

The presence of a non-neuronal cholinergic system in the alveolar macrophages and neutrophils of COPD

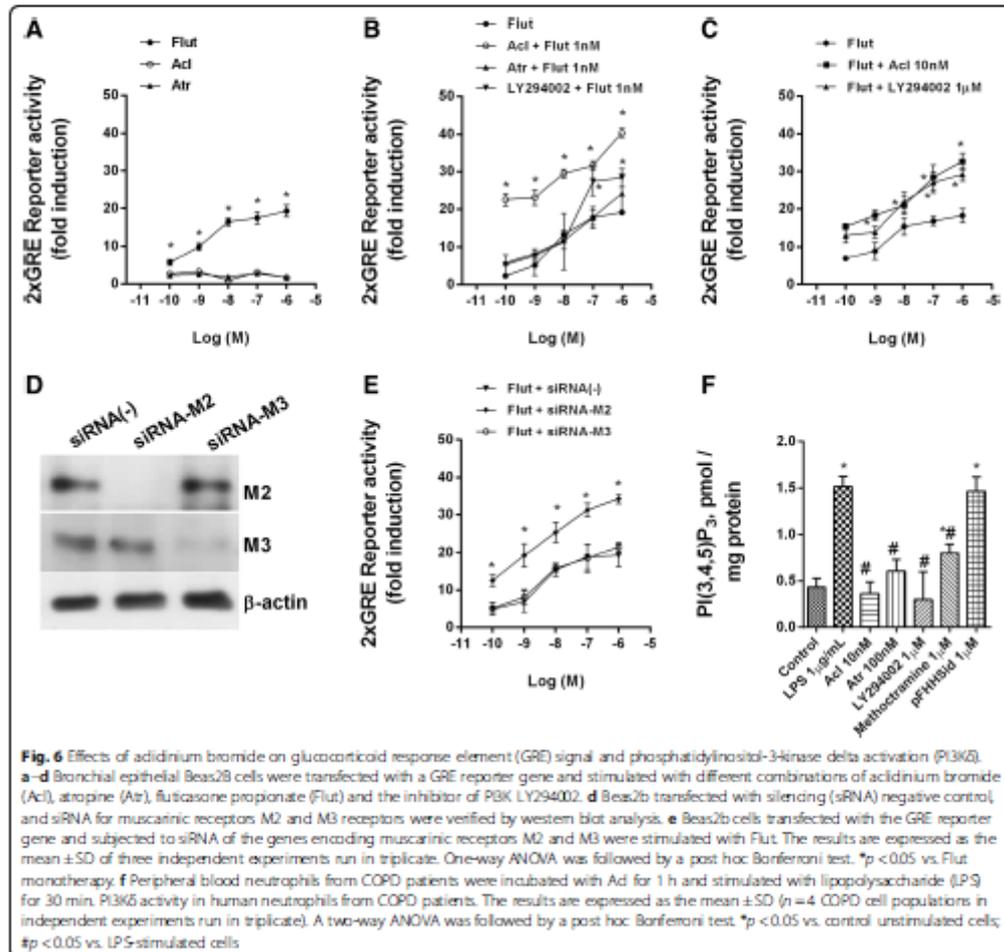
patients has been implicated in the pathogenesis of the disease [15, 16]. It was reported that activation of M1, M2 and M3 receptors occurred in the sputum neutrophils of COPD patients by the addition of exogenous acetylcholine [16]. Immunocytochemistry demonstrated the reduced expression of M2 in COPD compared with that in healthy neutrophils and an increase in M3 expression [16]. In the present work, by fully characterising the non-neuronal cholinergic system in blood and sputum neutrophils from healthy controls and in COPD patients, we found that M2 was more highly expressed in patients with stable disease and over-expressed in those with exacerbated disease. Similar results were obtained for M4, to a lesser extent for M5 and to a very slight extent for M3. The discrepancy with the previous report regarding M2 expression might be explained by the different techniques and antibodies used. However, we also



measured expression by RT-PCR and western blot and obtained similar results. In neutrophils from patients with stable or exacerbated COPD, the non-neuronal cholinergic system was over-expressed, with a predominance of M2 and M4 receptors as well as ChAT, VACHT and OCT1. These findings suggest that human COPD neutrophils synthesise intracellular acetylcholine, mediated by ChAT, which is loaded into secretory organelles by VACHT, thereby making acetylcholine available for secretion through OCT1 membrane channels. Carbachol, a stable analogue of acetylcholine, activated neutrophils to release IL-8, whereas inhibition of the latter by acridinium bromide seemed to confirm a role for functional muscarinic receptors. The addition of exogenous acetylcholinesterase to eliminate acetylcholine from the culture medium reduced neutrophil activation by LPS in blood neutrophils and by CSE in sputum neutrophils,

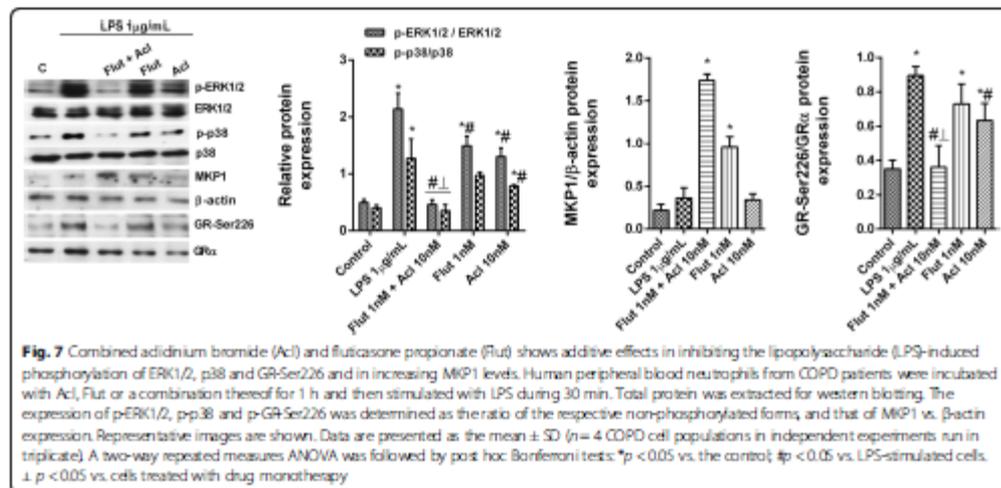
suggesting that bacterial infection and cigarette smoke activate acetylcholine release from neutrophils, which in turn promotes the release of the cytokines and metalloproteinases induced by these triggers. However, we did not detect acetylcholine in the culture medium of human neutrophils, probably due to the low sensitivity of the commercial kit used in this study or rapid degradation by acetylcholinesterases [30] (data not shown). Similar results have been obtained in alveolar macrophages stimulated with carbachol, in which the release of leukotriene B4 via M3 receptor activation was described [15]. In this work, the inhibitory effect of acridinium bromide appeared to be mediated by M2 blockade, since the M2 antagonist methoctramine inhibited cytokine release but pFHHSid, an antagonist of M3, did not.

Neutrophils isolated from our COPD patients were less sensitive to the anti-inflammatory effects of fluticasone



propionate than neutrophils from healthy controls, as previously reported in a study in which dexamethasone was the corticosteroid [10]. Fluticasone propionate in combination with acclidinium bromide exhibited additive anti-inflammatory effects in the blood and sputum neutrophils of COPD patients, consistent with the increased anti-inflammatory effects of budesonide combined with the anti-muscarinic R,R-glycopyrrolate in LPS-stimulated human monocytes [31]. The additive effects achieved with acclidinium bromide and fluticasone propionate can be attributed to M2 receptor antagonism, since methoctramine, but not pFHHSid, increased the anti-inflammatory effects of fluticasone propionate. However, the involvement of M4 and M5 cannot be ruled out by our data.

M1, M3 and M5 receptors are coupled to the G_s protein and mediate bronchial contraction by activating phospholipase Cβ1 (PLC), which leads to the production of inositol 1,4,5-trisphosphate (IP₃); the latter is necessary to activate the release of intracellular calcium stores. M2 and M4 receptors are coupled to G_i protein and mediate PI3K activation and the inhibition of adenylyl cyclase and cyclic adenosine monophosphate (cAMP) [17]. In this work, both acclidinium bromide and methoctramine suppressed LPS-induced PI3K activity. PI3Kδ is increased in neutrophils [10] and macrophages [32] from COPD patients and mediates their corticosteroid insensitivity. Therefore, inhibition of PI3K activity by acclidinium bromide through the M2 receptor may at



least partially explain the improved effects achieved with the further addition of fluticasone propionate. cAMP also increases the anti-inflammatory effects of corticosteroids. Although not explored in this work, we previously showed that, in human fibroblasts, acridinium bromide prevents the down-regulation of cAMP induced by carbachol activation [14], which would also account for the additive effect of acridinium bromide in combination with fluticasone propionate. Further evidence is provided by the fact that cAMP inducers such as LABAs and roflumilast enhance the effects of corticosteroids by elevating cAMP [10, 33].

The anti-inflammatory effect of corticosteroids is mediated in part by promoting the nuclear translocation of GRα to nuclear GRE regions, which in turn increases the expression of anti-inflammatory genes. In this work, we demonstrated an increased fluticasone-propionate-mediated GRE signal by the further addition of acridinium bromide, which resulted in additive effects on the stimulation of corticosteroid-inducible genes such as MKP-1, CRISPLD2 and GILZ. MKP1 dephosphorylates and inactivates different mitogen-activated kinases such as ERK1/2 and p38 as part of the anti-inflammatory effects of corticosteroids. Recent evidence indicated that the inhibition of GRα via GR-Ser-226 phosphorylation by p38, ERK1/2 or JNK1 inhibits GRα nuclear translocation and thus mediates corticosteroid insensitivity in asthmatics [34, 35]. Accordingly, the additive effects obtained with the combination of acridinium bromide and fluticasone propionate in increasing MKP1 and inhibiting p-ERK1/2 and p-p38 could explain the reduced expression of GR-Ser-226 phosphorylation and therefore the increased anti-inflammatory effects of the drug

combination. CRISPLD2 is a secreted protein that binds LPS in humans. Enhanced CRISPLD2 expression by fluticasone propionate down-regulates LPS-activating toll-like receptor 4 (TLR4) pro-inflammatory responses, thus perhaps reducing the exacerbations of COPD produced by infections with gram-negative bacteria [36]. In this work, LPS was used as the stimulus and its pro-inflammatory effects were enhanced by cigarette smoke, mediated in part via TLR4 activation [37]. Thus, the inhibition of TLR4 downstream signalling in response to the increase in CRISPLD2 induced by the combination of acridinium bromide and fluticasone propionate may explain at least some of the anti-inflammatory effects of the two drugs. The corticosteroid-inducible gene GILZ inhibits the transcriptional activity of NF-κB and AP-1, both of which are involved in inflammatory pathways [38]. By suppressing indices of inflammation, the increase in GILZ expression and that of other corticosteroid-inducible genes by the drug combination could confer protection against bronchoconstriction, thus limiting airway remodelling. However, the present work was confined to an *in vitro* analysis of the potential clinical benefits of LAMA/ICS combinations and its results still require clinical corroboration.

Conclusions

Acridinium bromide attenuates corticosteroid-resistant neutrophil activation in COPD patients. Additive anti-inflammatory properties are achieved when it is used in combination with fluticasone propionate. These observations provide a scientific rationale for treating COPD patients with a combination of LAMAs and corticosteroids.

Additional files

Additional file 1: Supplementary Table S1. Maximal percentage of inhibition of IL-8, MMP-9, CCL-5, GM-CSF and IL-1 β release from neutrophils of healthy subjects and COPD patients. Neutrophils were incubated with acridinium (Ad; 0.1 nM-1 μ M), fluticasone (Flut; 0.1 nM-1 μ M), formoterol (Form; 0.01 nM-100 nM) or salmeterol (Salm; 0.1 nM-1 μ M) in response to LPS (1 μ g/ml) or cigarette smoke extract (CSE 5%). The levels of different cytokines in the cell supernatant were determined and the maximal percent of inhibitions were calculated. Values are mean \pm SD of 3 independent experiments run in triplicate. * p < 0.05 vs. Healthy values; # p < 0.05 vs. Ad group. (DOCX 17 kb)

Additional file 2: Supplementary Figure E1. Effects of formoterol and salmeterol on pro-inflammatory markers. Concentration-dependent inhibition of lipopolysaccharide (LPS)-induced cytokines or MMP-9 release by formoterol (Form) and salmeterol (Salm) from peripheral blood neutrophils of healthy subjects and COPD patients. Neutrophils were preincubated with Salm (0.1 nM-1 μ M) or Form (0.01 nM-100 nM) for 1 h followed by cell stimulation with LPS (1 μ g/ml) for 6 h. Results are expressed as means \pm SD of n = 3 (3 cell healthy and 3 cell COPD populations run in triplicate) independent experiments. Two-way ANOVA was followed by the post hoc Bonferroni test. * p < 0.05 related to cells from COPD patients; # p < 0.05 related to the basal values. (TIF 31.72 kb)

Abbreviations

ACHE: Acetylcholinesterase; COPD: Chronic obstructive pulmonary disease; CRSP/D2: Cysteine-rich secretory protein LCCL domain-containing 2; CSE: Cigarette smoke extract; FEV1: Forced expiratory volume in one second; FVC: Forced vital capacity; GILZ: Glucocorticoid-induced leucine zipper; GOLD: Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease; GRE: Glucocorticoid response element; GR α : Glucocorticoid receptor alpha; HDAC2: Histone deacetylase-2; IC α : Inhaled corticosteroid; LABA: Long-acting beta adrenergic agonist; LAMA: Long-acting muscarinic antagonist; LPS: Lipopolysaccharide; MIF: Macrophage migration inhibitory factor; MKP-1: Mitogen-activated protein kinase phosphatase 1; PDE4: Phosphodiesterase 4; RSK δ : Rho GTPase-kinase delta; VACHT: Vesicular acetylcholine transporter; β 2ADR: Beta-2 adrenergic receptor

Acknowledgements

We are grateful for the valuable help of the University General Hospital and University and Polytechnic Hospital La Fe Respiratory Units for access to and characterisation of the COPD patients.

Funding

This work was supported by the grants SAF2014-55322P (JC), FIS P114/01733 (JM), SAF2015-65368-R (BM), CIBERES (CB06/06/0027), TRACE (TRA2009-0811; Spanish Government), and by research grants from the Regional Government Prometeo IV/2013/014 (JC, BM, JM) 'Generalitat Valenciana'. Funding entities did not contribute to the study design or data collection, analysis and interpretation nor to the writing of the manuscript.

Availability of data and materials

All data generated or analysed during this study are included in this published article (and its supplementary information files).

Authors' contributions

JM, AC, JC, AG, BM and MM participated in the conception and design of the research; JM, AC, CS, AD, GJ, EM, AG, MM and BM performed the experiments; JM, AG, MM, AC, JC, GJ, CS and EM drafted the manuscript and interpreted the results of the experiments; and JM, AC, AG, MM, GJ, BM and JC edited and revised the manuscript. All authors approved the final version of the manuscript.

Competing interests

JC received a research grant from the Almirall Company. AG and MM are employees of this company.

Consent for publication

Not applicable.

Ethics approval and consent to participate

This project was approved by the local Ethics Committee of the University General Hospital of Valencia, Spain. Written informed consent was obtained from each patient or volunteer before starting sputum/blood sampling and lung function testing.

Author details

¹Department of pharmacology, faculty of medicine, Jaume I University, Castellón, Spain. ²Pharmacy Unit, University General Hospital Consortium, Valencia, Spain. ³CIBERES, Health Institute Carlos III, Valencia, Spain. ⁴Respiratory Unit, University General Hospital Consortium, Valencia, Spain. ⁵Respiratory Unit, University and Polytechnic La Fe Hospital, Valencia, Spain. ⁶Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, University of Valencia, Valencia, Spain. ⁷Almirall, R&D Centre, Barcelona, Spain. ⁸Health Research Institute INCLIVA, Valencia, Spain. ⁹Research and teaching Unit, University General Hospital Consortium, Valencia, Spain. ¹⁰Unidad de Investigación Clínica, Consorcio Hospital General Universitario, Avenida tres cruces s/n, E-46014 Valencia, Spain.

Received: 27 September 2016 Accepted: 2 November 2016

Published online: 08 November 2016

References

- Roche N, Marthan R, Berger P, Chambellan A, Chanet P, Aguilaniu B, et al. Beyond corticosteroids: future prospects in the management of inflammation in COPD. *Eur Respir Rev*. 2012;20:175-82.
- Calverley PM, Anderson JA, Celli B, Ferguson GT, Jenkins C, Jones PW, Yates JC, Vestbo J, Investigators T. Salmeterol and fluticasone propionate and survival in chronic obstructive pulmonary disease. *The New England Journal of Medicine*. 2007;356:775-789.
- Niewoehner DE, Roe K, Cote C, Paulson D, Cooper Jr JA, Korducki L, et al. Prevention of exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease with tiotropium, a once-daily inhaled anticholinergic bronchodilator: a randomized trial. *Ann Intern Med*. 2005;143:17-26.
- Vestbo J, Hurd SS, Agustí AG, Jones PW, Vogelmeier C, Anzueto A, et al. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013;187:347-65.
- Weite T, Miravittles M, Hernandez P, Eriksson G, Peterson S, Polanowski T, et al. Efficacy and tolerability of budesonide/formoterol added to tiotropium in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009;180:741-50.
- Martinez FJ, Calverley PM, Goehring UM, Brose M, Fabbri LM, Rabe KF. Effect of roflumilast on exacerbations in patients with severe chronic obstructive pulmonary disease uncontrolled by combination therapy (REACT): a multicentre randomized controlled trial. *Lancet*. 2013;385:857-66.
- Barnes PJ. Corticosteroid resistance in patients with asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;131:636-45.
- Urmart OS, Ito K, Maneechotesuwan K, Ito M, Johnson M, Barnes PJ, et al. Glucocorticoid receptor nuclear translocation in airway cells after inhaled combination therapy. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005;172:704-12.
- Rosales C, To Y, Osato G, Ito M, Barnes PJ, Ito K. Corticosteroid insensitivity is reversed by formoterol via phosphoinositide-3-kinase inhibition. *Br J Pharmacol*. 2012;167:775-86.
- Milra J, Ulich J, Almudever P, Freire J, Xiaozhong Q, Corjojo J. Roflumilast Noxide reverses corticosteroid resistance in neutrophils from patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;134:14-22.
- Urdem B, Kollark M. The role of vagal afferent nerves in chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc*. 2005;2:355-60. discussion 371-352.
- Gros NJ. Anticholinergic agents in asthma and COPD. *Eur J Pharmacol*. 2006;533:36-9.
- Gwillt CR, Donnelly LE, Rogers DF. The non-neuronal cholinergic system in the airways: an unappreciated regulatory role in pulmonary inflammation? *Pharmacol Ther*. 2007;113:208-22.
- Milra J, Serrano A, Peiro T, Gavaldà A, Malpèix M, Morcillo EJ, et al. Acridinium inhibits human lung fibroblast to myofibroblast transition. *Thorax*. 2012;67:229-37.
- Kazari A, Traves SL, Fenwick PS, Brown SM, Chana KK, Russell RE, et al. Expression of muscarinic receptors by human macrophages. *Eur Respir J*. 2012;39:698-704.

16. Profita M, Gorgi RD, Sala A, Bonanno A, Riccobono L, Mirabella F, et al. Muscarinic receptors, leukotriene B₄ production and neutrophilic inflammation in COPD patients. *Allergy*. 2005;60(1):361–9.
17. Gosens R, Zaagma J, Meurs H, Halayko AJ. Muscarinic receptor signaling in the pathophysiology of asthma and COPD. *Respir Res*. 2006;7:73.
18. Bos IS, Gosens R, Zuidhof AB, Schaafsma D, Halayko AJ, Meurs H, et al. Inhibition of allergen-induced airway remodelling by tiotropium and budesonide: a comparison. *Eur Respir J*. 2007;30(6):53–61.
19. Turato G, Zain R, Saetta M. Pathogenesis and pathology of COPD. *Respiration*. 2001;68(1):17–28.
20. Barnes PJ. Mechanisms and resistance in glucocorticoid control of inflammation. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2010;120:76–85.
21. Milana J, Juan G, Peto T, Semano A, Corujo J. Neutrophil activation in severe, early-onset COPD patients versus healthy non-smoker subjects in vitro: effects of antioxidant therapy. *Respiration Int Rev Thoracic Dis*. 2012;83:147–58.
22. Pizzichini E, Pizzichini MM, Efthimiadis A, Evans S, Morris MM, Squillace G, et al. Indices of airway inflammation in induced sputum: reproducibility and validity of cell and fluid-phase measurements. *Am J Respir Crit Care Med*. 1996;154:308–17.
23. Milana J, Ortiz JL, Juan G, Gujano R, Almudever P, Martorell M, et al. Cigarette smoke exposure up-regulates endothelin receptor B in human pulmonary artery endothelial cells: molecular and functional consequences. *Br J Pharmacol*. 2010;161(1):599–615.
24. Su Y, Han W, Galindo C, De Li Y, Block ER. Effect of cigarette smoke extract on nitric oxide synthase in pulmonary artery endothelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1998;19:819–25.
25. Plumb J, Gaffey K, Kane B, Maliz-Mianes B, Shah R, Bentley A, et al. Reduced glucocorticoid receptor expression and function in airway neutrophils. *Int Immunopharmacol*. 2012;12:26–33.
26. Milana J, Armengot M, Barrios P, Tenor H, Beume R, Artigas E, et al. Roflumilast N-oxide, a PDE4 inhibitor, improves cilia motility and ciliated human bronchial epithelial cells compromised by cigarette smoke in vitro. *Br J Pharmacol*. 2012;166:2243–62.
27. Rajol-Lerels VA, Hita FJ, Gobbi MD, Verd MG, Rodriguez MC, Rothlin RP. Pharmacological characterization of muscarinic receptor subtypes mediating vasoconstriction of human umbilical vein. *British Journal of Pharmacology*. 2006;147: 516–523.
28. Magnussen H, Disse B, Rodriguez-Roldán R, Kirsten A, Watz H, Tetzlaff K, et al. Withdrawal of inhaled glucocorticoids and exacerbations of COPD. *N Engl J Med*. 2014;371(12):85–94.
29. Kunz LJ, Postma DS, Klooster K, Lappere TS, Vonk JM, Sont JK, et al. Relapse in FEV1 Decline After Steroid Withdrawal in COPD. *Chest*. 2015;148:389–96.
30. Schallreuter KJ, Elway S. Hydrogen peroxide regulates the cholinergic signal in a concentration dependent manner. *Life Sci*. 2007;80:2221–6.
31. Pohl A, Bauhofer A, Petzold U, Cnota P, Maus J, Brune K, et al. Synergistic effects of the anti-cholinergic R₁ glycopyrrolate with anti-inflammatory drugs. *Biochem Pharmacol*. 2006;72:1690–6.
32. Marwick JA, Caramori G, Casolari P, Mazzoni F, Kiriham PA, Adcock IM, et al. A role for phosphoinositol 3-kinase delta in the impairment of glucocorticoid responsiveness in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;125(1):146–53.
33. Moodley T, Wilson SM, Joshi T, Rider CF, Sharma P, Yan D, et al. Phosphodiesterase 4 inhibitors augment the ability of formoterol to enhance glucocorticoid-dependent gene transcription in human airway epithelial cells: a novel mechanism for the clinical efficacy of roflumilast in severe chronic obstructive pulmonary disease. *Mol Pharmacol*. 2013;83:894–906.
34. Kobayashi Y, Mercado N, Barnes PJ, Ito K. Defects of protein phosphatase 2A causes corticosteroid insensitivity in severe asthma. *PLoS One*. 2011;6:e27627.
35. Mercado N, Hakim A, Kobayashi Y, Mesh S, Usmani OS, Chung KF, et al. Restoration of corticosteroid sensitivity by p38 mitogen activated protein kinase inhibition in peripheral blood mononuclear cells from severe asthma. *PLoS One*. 2012;7:e41582.
36. Wang ZQ, Xing WM, Fan HH, Wang KS, Zhang HK, Wang QW, et al. The novel lipopolysaccharide-binding protein CR6PLD2 is a critical serum protein to regulate endotoxin function. *J Immunol*. 2009;183:6646–56.
37. Doz E, Noulin N, Boichot E, Guenon I, Fick L, Le Bert M, et al. Cigarette smoke-induced pulmonary inflammation is TLR4/MyD88 and IL-1R1/MyD88 signaling dependent. *J Immunol*. 2008;180(1):169–78.
38. Mittlestadt PR, Ashwell JD. Inhibition of AP-1 by the glucocorticoid-inducible protein GLZ. *The Journal of Biological Chemistry*. 2001;276: 29603–29610.

Submit your next manuscript to BioMed Central and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit

