



**Universitat de les
Illes Balears**

ciberes

Centro de Investigación Biomédica en Red
Enfermedades Respiratorias



TESIS DOCTORAL

2015

**MODULACIÓN DE LA INFLAMACIÓN PULMONAR
DURANTE LAS EXACERBACIONES DE LA
ENFERMEDAD PULMONAR OBSTRUCTIVA
CRÓNICA**

Amanda Iglesias Coma



**Universitat de les
Illes Balears**



TESIS DOCTORAL

2015

Programa de Doctorado en Ciencias Biosociosanitarias

MODULACIÓN DE LA INFLAMACIÓN PULMONAR DURANTE LAS EXACERBACIONES DE LA ENFERMEDAD PULMONAR OBSTRUCTIVA CRÓNICA

Amanda Iglesias Coma

Director: Francisco de Borja García-Cosío Piqueras

Ponente: Pablo Vicente Escribá Ruiz

Doctora por la Universitat de les Illes Balears

A Lucas y Antonio

Agradecimientos

- Al Dr. Cosío, director de la Tesis Doctoral, por su apoyo, por haberme incorporado a formar parte de su equipo de trabajo y por su categoría personal y científica que ha facilitado la finalización de esta Tesis.
- Al Dr. Agustí, Dr. Sala y Dr. Sauleda por dejarme formar parte de este grupo de trabajo y enseñarme junto al Dr. Cosío todo lo que se de la EPOC.
- Al Dr. Busquets por iniciarme en el mundo de la investigación y estar siempre allí.
- A todos los pacientes que aceptaron colaborar en los estudios y que han hecho posible este trabajo.
- A mis enfermeros que sin ellos no hubiera tenido los datos clínicos y las muestras para llevar a cabo estos estudios.
- A mis compañeros de laboratorio que me aguantaron todos estos años.
- A mi familia por su apoyo constante y hacer que no tirara la toalla.

Certificado de director de tesis



**Universitat de les
Illes Balears**

Dr. Francisco de Borja García-Cosío Piqueras, de Hospital Universitario Son Espases

DECLARO:

Que la tesis doctoral que lleva por título *Modulación de la inflamación pulmonar durante las exacerbaciones de la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica*, presentada por Amanda Iglesias Coma para la obtención del título de doctor, ha sido realizada bajo mi supervisión.

Y para que quede constancia de ello firmo este documento.

Palma de Mallorca, 16 de junio de 2015

Lista de publicaciones derivadas de la tesis

- *Mecanismos moleculares de inflamación durante las agudizaciones de la enfermedad obstructiva crónica.* Ana L. Kersul, Amanda Iglesias, Ángel Ríos, Aina Noguera, Aina Forteza, Enrique Serra, Alvar Agustí y Borja G. Cosío. Arch. Bronconeumol. 2011;47(4);176-183
- *Low-dose theophylline enhances the anti-inflammatory effects of steroids during exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease.* Borja G Cosío, Amanda Iglesias, Ángel Ríos, Aina Noguera, Ernest Sala, Kazuhiro Ito, Peter J Barnes and Alvar Agustí. Thorax 2009;64;424-429

Abreviaturas

- ADN: ácido desoxirribonucleico
- AP-1: proteína activadora -1
- ARN: ácido ribonucleico
- BAL: lavado bronquioalveolar
- BHR: Hiperreactividad bronquial
- CAT: COPD Assessment Test
- CBP : proteína de unión a CREB
- COX-2: ciclooxigenasa-2
- CXCR3; receptor 3 de quimioquina CXC
- DEX: dexametasona
- EGF : Epidermal growth factor
- ENA-78: Epitelial cell-derived neutrophil- activating peptide-78
- EEPOC: exacerbación de la EPOC
- eNO: óxido nítrico exhalado
- EPOC: Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica
- ERG: “elementos de respuesta a los GC”
- ERK: quinasas extracelulares
- FEV₁ : Volumen espiratorio forzado en el primer Segundo
- FGF: Fibroblast growth factor
- FVC: Capacidad vital forzada
- GC: glucocorticoides
- GM-CSF: Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos
- GOLD: *Global Initiative for Chronic Obstructive Pulmonary Disease*
- GRO: Growth-related oncogene
- GR: receptor de glucocorticoides

- H3: histona 3
- HAT: Histona acetilasa
- HDAC: histona deacetilasa
- IFN- γ : interferón gamma
- ICAM-1: molécula intercelular de adhesión -1
- ICS: corticosteroides inhalados
- I- κ B α : proteína inhibidora de la translocación del NF- κ B.
- I κ B α : inhibidor de NF- κ B iNOS: enzima nítrico óxido sintasa inducible
- IKK2: enzima inhibidor quinasa 2 de NF- κ B
- IL: interleuquina
- IP-10: Proteína 10 inducida por interferón
- I-TAC: interferón-inducible de las T cell- quimioatrayente
- LTB₄: leucotrieno B₄
- LPS: lipopolisacáridos
- MAPK: mitogen-activated protein kinase
- MCP-1: proteína quimiotáctica de monocitos-1
- MIG: monoquina inducida por interferón
- MIP-1: factor inflamatorio de macrófagos 1
- MIP: factor inflamatorio de monocitos mMRC: Modified British Medical Research Council
- MMP-12: metaloproteinasa de matriz 12
- NE: elastasa de neutrófilos
- NF- κ B: factor nuclear kappa B
- NO: óxido nítrico
- PAF : factor activador plaquetario
- PCAF: CBP-factor asociado

- PDE: fosfodiesterasa
- PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
- PCR: Proteína C reactiva
- PGE₂ : prostaglandina E₂
- ROS: especies reactivas de oxígeno
- SLPI: inhibidor de las leucoproteasas del suero
- SOD: superóxido dismutasa
- TBP: TATA box-binding protein
- TGF: Transforming growth factor
- TH: célula T helper
- THEO: teofilina
- TLR: receptores Toll like
- TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa
- TxB₂: Tromboxano B₂
- VEGF : Vascular – endotelial growth factor
- VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana

Índice

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	7
LA ENFERMEDAD PULMONAR OBSTRUCTIVA CRÓNICA (EPOC).....	7
MECANISMOS MOLECULARES DE LA INFLAMACIÓN	39
EXACERBACIONES DE LA EPOC	58
HIPÓTESIS	71
OBJETIVOS	72
Estudio I.....	72
Hipótesis.....	72
Objetivos	73
Estudio II.....	73
Hipótesis.....	73
Objetivos	74
Estudio III.....	74
Hipótesis.....	74
Objetivos	75
METODOLOGÍA.....	76
Pacientes	76
Preparación de la cepa bacteriana.....	79
Cultivo celular.....	79
Extracción nuclear para medir actividad de NF- κ B	80
Actividad NF- κ B	81
Extracción nuclear para medir actividad de HDAC	81
Actividad HDAC	82
Citoquinas.....	83
Función Pulmonar	84

Muestras de esputo y preparación	84
Muestras de lavado broncoalveolar y preparación	85
Actividad antioxidante total (TAS)	85
Proteína C reactiva (PCR)	86
Óxido nítrico exhalado	86
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	87
ESTUDIO I: Mecanismos inflamatorios y su modulación farmacológica en un modelo celular de agudización de EPOC.....	87
ESTUDIO II: Determinar las diferencias de los cambios inflamatorios pulmonares observados en pacientes con EPOC en fase de agudización comparados con la fase estable	95
ESTUDIO III: Ensayo clínico para investigar el mecanismo inflamatorio y su modulación farmacológica en pacientes con agudización.....	104
CONCLUSIONES	113
BIBLIOGRAFÍA.....	114

Resumen

Alrededor de un 10% de la población entre 40 y 80 años en España padecen enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). La EPOC es una enfermedad prevenible y tratable que se caracteriza por la limitación del flujo aéreo que suele ser progresiva y está asociada a una respuesta inflamatoria crónica en las vías aéreas y en los pulmones debido a la inhalación de partículas nocivas o gases. Las exacerbaciones y comorbilidades contribuyen a la gravedad global de los pacientes. El proceso inflamatorio pulmonar se caracteriza por aumento de neutrófilos, macrófagos y linfocitos en la vía aérea y se incrementa durante las agudizaciones de la enfermedad.

Los mecanismos moleculares de la inflamación pulmonar han sido recientemente caracterizados, implicando la vía de activación del factor nuclear kappa B (NF- κ B) y la remodelación de la cromatina en el núcleo celular mediante la acetilación o deacetilación de las histonas nucleares. El proceso inflamatorio pulmonar se caracteriza por una actividad disminuida de la enzima deacetiladora de las histonas (HDAC) lo cual es responsable de que la inflamación en la EPOC sea parcialmente resistente a los glucocorticoides. El humo del tabaco puede ser responsable de este efecto, ya que el estrés oxidativo que produce puede afectar a la actividad de esta enzima tanto *ex vivo* como *in vitro*. Sin embargo, los mecanismos que controlan esta respuesta inflamatoria durante las agudizaciones de la enfermedad no son bien conocidos.

La hipótesis general de esta tesis doctoral es que la respuesta inflamatoria que sufren los pacientes con EPOC en la fase estable esta aumentada durante las agudizaciones y puede ser modulada mediante fármacos que potencian la actividad de la HDAC. El objetivo de este estudio es investigar el efecto de la modulación de la actividad HDAC sobre el proceso inflamatorio a nivel pulmonar en pacientes que sufren una agudización de EPOC.

Para contrastar esta hipótesis se han realizado tres estudios: 1) Estudio de los mecanismos inflamatorios y su modulación farmacológica en un modelo celular de agudización de EPOC 2) Estudio sobre el mecanismo molecular de inflamación durante la fase de agudización comparado con la fase estable en pacientes con EPOC, y 3) Ensayo clínico para investigar los efectos de fármacos potenciadores de la

actividad histona deacetilasa sobre la modulación de los mecanismos de inflamación en pacientes con EPOC agudizado. Los objetivos específicos de esta tesis doctoral fueron: 1) Investigar el papel de la vía de la acetilación de histonas sobre la regulación de la respuesta inflamatoria pulmonar en pacientes con EPOC durante una agudización comparado con la fase estable; 2) Comparar la respuesta inflamatoria pulmonar y sistémica entre la fase agudizada y la estable; y 3) Evaluar el efecto de la potenciación de la actividad histona deacetilasa con dosis bajas de teofilina sobre la respuesta inflamatoria en pacientes con EPOC agudizado.

Al voltant d'un 10% de la població entre 40 i 80 anys a Espanya pateixen malaltia pulmonar obstructiva crònica (MPOC). La MPOC és una malaltia prevenible i tractable que es caracteritza per la limitació del flux aeri que sol ser progressiva i està associada a una resposta inflamatòria crònica en les vies aèries i en els pulmons a causa de la inhalació de partícules nocives o gasos. Les exacerbacions i comorbiditats contribueixen a la gravetat global dels pacients. El procés inflamatori pulmonar es caracteritza per augment de neutròfils, macròfags i limfòcits en la via aèria i s'incrementa durant les aguditzacions de la malaltia.

Els mecanismes moleculars de la inflamació pulmonar han estat recentment caracteritzats, implicant la via d'activació del factor nuclear kappa B (NF- κ B) i la remodelació de la cromatina en el nucli cel·lular mitjançant l'acetilació o deacetilació de les histones nuclears. El procés inflamatori pulmonar es caracteritza per una activitat disminuïda de l'enzim deacetiladora de les histones (HDAC) la qual cosa és responsable que la inflamació en la MPOC sigui parcialment resistent als glucocorticoides. El fum del tabac pot ser responsable d'aquest efecte, ja que l'estrès oxidatiu que produeix pot afectar l'activitat d'aquest enzim tant *ex vivo* com *in vitro*. No obstant això, els mecanismes que controlen aquesta resposta inflamatòria durant les aguditzacions de la malaltia no són ben coneguts.

La hipòtesi general d'aquesta tesi doctoral és que la resposta inflamatòria que pateixen els pacients amb MPOC en la fase estable aquesta augmentada durant les aguditzacions i pot ser modulada mitjançant fàrmacs que potencien l'activitat de la HDAC. L'objectiu d'aquest estudi és investigar l'efecte de la modulació de l'activitat HDAC sobre el procés inflamatori a nivell pulmonar en pacients que pateixen una agudització de MPOC.

Per contrastar aquesta hipòtesi s'han realitzat tres estudis: 1) Estudi dels mecanismes inflamatoris i la seva modulació farmacològica en un model cel·lular d'agudització d'MPOC 2) Estudi sobre el mecanisme molecular d'inflamació durant la fase d'agudització comparat amb la fase estable en pacients amb MPOC, i 3) Assaig clínic per investigar els efectes de fàrmacs potenciadors de l'activitat histona desacetilasa sobre la modulació dels mecanismes d'inflamació en pacients amb MPOC. Els objectius específics d'aquesta tesi doctoral van ser: 1) Investigar el paper de la via de l'acetilació d'histones sobre la regulació de la resposta inflamatòria pulmonar en pacients amb MPOC durant una agudització comparat amb la fase estable; 2) Comparar la resposta inflamatòria pulmonar i sistèmica entre la fase aguditzada i la

estable; i 3) Avaluar l'efecte de la potenciació de l'activitat histona desacetilasa amb dosis baixes de teofilina sobre la resposta inflamatòria en pacients amb MPOC aguditzat.

About 10% of the population between 40 and 80 years in Spain with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). COPD is a preventable and treatable disease characterized by airflow limitation that is usually progressive and is associated with a chronic inflammatory response in the airways and lungs due to inhalation of noxious particles or gases. Exacerbations and comorbidities contribute to the overall severity of patients. The pulmonary inflammatory process characterized by increased neutrophils, macrophages and lymphocytes in the airways and increases during exacerbations of the disease.

The molecular mechanisms of lung inflammation have been recently characterized, involving pathway activation of nuclear factor kappa B (NF- κ B) and the remodeling of chromatin in the cell nucleus by acetylation or deacetylation of core histones. Pulmonary inflammatory process is characterized by a decreased enzyme deacetylase of histones (HDAC) which is responsible for inflammation in COPD is partially resistant to glucocorticoid activity. Snuff smoke may be responsible for this effect, since that produces oxidative stress may affect the activity of this enzyme in both *ex vivo* and *in vitro*. However, the mechanisms that control the inflammatory response during exacerbations of the disease are not well known.

The general hypothesis of this dissertation is that the inflammatory response experienced by patients with COPD in stable phase is increased during exacerbations and may be modulated by drugs that enhance the activity of HDAC. The objective of this study is to investigate the effect of HDAC activity modulation on the inflammatory process in the lungs in patients suffering from COPD exacerbations.

To test this hypothesis, three studies were performed: 1) Study of inflammatory mechanisms and their pharmacological modulation in a cellular model of COPD exacerbation 2) Study on the molecular mechanism of inflammation during the exacerbation compared to the stable phase in patients COPD, and 3) clinical trial to investigate the effects of enhancing drugs histone deacetylase activity on the modulation of the mechanisms of inflammation in patients with COPD. The specific objectives of this thesis were: 1) To investigate the role of route of

histone acetylation on the regulation of pulmonary inflammatory response in COPD patients during exacerbation compared to the stable phase; 2) Compare the pulmonary and systemic inflammatory response between exacerbations and stable phase; and 3) evaluate the effect of enhancing histone deacetylase activity with low doses of theophylline on the inflammatory response in patients with acute COPD.

LA ENFERMEDAD PULMONAR OBSTRUCTIVA CRÓNICA (EPOC)

DEFINICIÓN

La Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC) es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en el mundo. El *Global Burden of Disease Study* refleja que la EPOC, la cual estaba sexta en la clasificación de causas de muerte en 1990, sea la tercera causa de muerte en el mundo para el 2020 (Vestbo, Hurd et al. 2013) (Mathers and Loncar 2006).

La *Global Initiative for Chronic Obstructive Pulmonary Disease (GOLD)* (Vestbo, Hurd et al. 2013) define dicha enfermedad como “una enfermedad prevenible y tratable que se caracteriza por la limitación del flujo aéreo que suele ser progresiva y está asociada con un incremento de la respuesta inflamatoria crónica en las vías aéreas y en los pulmones debido a partículas nocivas o gases. Las exacerbaciones y comorbilidades contribuyen a la gravedad global de los pacientes”

La limitación crónica del flujo aéreo característica de la EPOC está causada por una mezcla de la enfermedad de las vías respiratorias pequeñas (bronquiolitis obstructiva) y la destrucción del parénquima (enfisema), las contribuciones relativas de los cuales varían de persona a persona. La inflamación crónica provoca cambios estructurales y el cierre de las vías aéreas pequeñas. La destrucción del parénquima pulmonar, también por procesos inflamatorios, provoca la pérdida de unión alveolar a las vías respiratorias pequeñas disminuyendo la elasticidad pulmonar; a su vez, estos cambios disminuyen la capacidad de las vías respiratorias de mantenerse abiertas durante la espiración (Vestbo, Hurd et al. 2013).

CLASIFICACIÓN DE LA EPOC POR GRAVEDAD

La EPOC se diagnostica mediante la realización de una espirometría. En la tabla 1 se observa la clasificación de la gravedad según el grado de limitación del flujo aéreo. La espirometría debe realizarse después de la administración de un broncodilatador inhalado para minimizar la variabilidad (Vestbo, Hurd et al. 2013).

Tabla 1. Clasificación de la EPOC según la gravedad de la limitación del flujo aéreo.

En pacientes con $FEV_1/FVC < 70\%$		
GOLD1	Leve	$FEV_1 \geq 80\%$ predicho
GOLD2	Moderada	$50\% \leq FEV_1 < 80\%$ predicho
GOLD3	Grave	$30\% \leq FEV_1 < 80\%$ predicho
GOLD4	Muy grave	$FEV_1 < 30\%$ predicho

FEV_1 volumen expiratorio forzado; FVC capacidad vital forzada. GOLD: Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease

Evaluación del riesgo de exacerbaciones

Una exacerbación se define como un evento agudo caracterizado por un empeoramiento de los síntomas respiratorios del paciente que va más allá de las variaciones normales del día a día y que conlleva un cambio en la medicación del paciente (Burge and Wedzicha 2003, Celli and Barnes 2007). El número de agudizaciones varía mucho entre los pacientes (Agusti, Calverley et al. 2010) y el mejor factor de predicción de padecer frecuentes agudizaciones (dos o más por año) es la historia de eventos anteriores (Hurst, Vestbo et al. 2010).

La gravedad de las exacerbaciones generalmente se clasifica en leve, cuando las agudizaciones de los síntomas respiratorios requieren un cambio en el tratamiento inhalado por parte del paciente, moderada cuando las

agudizaciones de los síntomas respiratorios requieren intervención médica, y las agudizaciones graves cuando los síntomas respiratorios requirieren de hospitalización (Vestbo, Hurd et al. 2013).

Evaluación de la comorbilidades

Las comorbilidades implican la coexistencia de dos o más patologías médicas no relacionadas entre sí y son frecuentes en la EPOC. Incluimos así la disfunción del músculo esquelético, síndrome metabólico, osteoporosis, enfermedades cardiovasculares, depresión y cáncer de pulmón (Tockman, Anthonisen et al. 1987, Lange P 1990).

PREVALENCIA DE LA EPOC

Los datos existentes sobre prevalencia de EPOC muestran una significativa variabilidad debido a diferencias en los métodos de encuesta, los criterios diagnósticos y enfoques analíticos (Halbert, Natoli et al. 2006).

La prevalencia de la EPOC varía significativamente de una región a otra y generalmente es mayor en hombres que en mujeres. A nivel mundial la prevalencia del estadio GOLD II o superior es del 10,1% (4,8) en general, mientras que para los hombres es del 11,8% (7,9) y de 8,5% (5,8) para las mujeres. Estos datos son parecidos a los obtenidos en el estudio PLATINO (Buist, McBurnie et al. 2007) el cual estudia la prevalencia de EPOC en cinco áreas metropolitanas de América Latina (Menezes, Perez-Padilla et al. 2005). En este estudio, la prevalencia de la EPOC varía entre 7.8% de Méjico hasta el 20% de Montevideo. Hay mayor prevalencia en los hombres, personas mayores, con un índice de masa corporal más bajo, con una hábito tabáquico mayor y con un nivel de estudios más bajo.

En España la prevalencia de la EPOC según el estudio EPI-SCAN realizado entre el 2006 y 2007 y siguiendo los criterios GOLD es del 10,2% (IC95%9,2–11,1) de la población entre 40 y 80 años de edad. Anteriormente, el estudio IBERPOC, realizado en el 1997, determinaba la prevalencia de EPOC en un

9,1% (14,3 % en hombres y 3,9% en mujeres) de la población entre 40 y 69 años (Soriano, Miravittles et al. 2010) ya con importantes variaciones entre las siete áreas participantes (Pena, Miravittles et al. 2000).

FACTORES DE RIESGO

El factor de riesgo más importante en todo el mundo es el consumo de cigarrillos aunque no es el único (Tabla 2). Otros factores implicados en la patogenia de la EPOC son:

Tabla 2. Factores de riesgo de la EPOC.

Genes
Exposición a partículas
○ Humo de tabaco
○ Exposición laboral a polvos orgánicos e inorgánicos
○ Polución
○ Biomasa
Sexo y edad
Hiperreactividad bronquial
Infecciones
Estatus socio-económico

Genes

El factor de riesgo genético mejor identificado es la deficiencia de la alfa-1 antitripsina (Stoller and Aboussouan 2005). A pesar de que la deficiencia de alfa-1 antitripsina es relevante para una pequeña parte de la población mundial, esto demuestra que la EPOC es una enfermedad poligénica y es un clásico ejemplo de la interacción entre genes y ambiente.

Un riesgo familiar elevado de tener limitación del flujo aéreo se ha observado en los hermanos fumadores de pacientes con EPOC grave (McCloskey, Patel et al. 2001), sugiriendo que el factor genético conjuntamente con factores ambientales puede influenciar en la susceptibilidad de padecer la enfermedad. Genes como el que codifica para la MMP12 (metaloproteinasa 12) se han relacionado con un empeoramiento de la función pulmonar (Hunninghake, Cho et al. 2009).

Exposición a partículas

Tabaquismo: En todo el mundo, la exposición directa al humo del tabaco es el principal factor de riesgo de EPOC. Los fumadores tienen una mayor prevalencia de síntomas respiratorios y de tener una función pulmonar anormal, una tasa anual mayor de declive de FEV₁, y una mayor tasa de mortalidad por EPOC que los no fumadores (Kohansal, Martinez-Cambor et al. 2009). La exposición pasiva al humo del tabaco también puede contribuir a los síntomas respiratorios, de EPOC (Eisner, Balmes et al. 2005) y a las agudizaciones (Garcia-Aymerich, Monso et al. 2001) por el incremento en la carga total de partículas inhaladas y de gases (Dayal, Khuder et al. 1994).

La edad de inicio, el total de paquetes año que se fuma y el estado de los actuales fumadores son predictivos de la mortalidad por EPOC. No todos los fumadores desarrollan una EPOC con una clínica significativa lo que sugiere que los factores genéticos pueden modificar el riesgo de cada individuo (Smith CA 1997).

Otros factores de riesgo relacionados con la exposición a partículas o gases implicados en la patogenia de la EPOC son la biomasa, la polución y la exposición laboral a polvos y químicos, aunque en nuestro medio tienen menor relevancia.

Edad y Sexo

La edad aparece a menudo como un factor de riesgo de padecer EPOC. No está claro si es el envejecimiento como tal lo que predispone a padecer EPOC o si es la suma de las exposiciones acumuladas a lo largo de la vida.

En el pasado muchos estudios vieron que la mayoría de pacientes que sufrían EPOC eran hombres. Actualmente se ha observado que la prevalencia de dicha enfermedad es igual tanto en hombres como en mujeres y esto puede ser debido a los cambios en el patrón tabáquico (Mannino, Homa et al. 2002).

Infecciones

Una historia clínica con infecciones respiratorias durante la infancia se ha asociado con una función pulmonar reducida y un incremento de los síntomas respiratorios en la edad adulta (Barker, Godfrey et al. 1991, de Marco, Accordini et al. 2011). Las infecciones contribuyen a las agudizaciones de la EPOC pero no está claro el efecto en el desarrollo de la enfermedad. El VIH se ha asociado a la aparición del enfisema precoz asociado al tabaquismo (Crothers, Huang et al. 2011) y que la tuberculosis puede ser un factor de riesgo de EPOC (Menezes, Hallal et al. 2007).

Hiperreactividad bronquial

Hiperreactividad bronquial (HRB) se define como una respuesta broncoconstrictora exagerada de las vías respiratorias a diversos estímulos inhalados (Sterk, Fabbri et al. 1993). La prevalencia de HRB en la EPOC parece igual o incluso puede ser más alto que en los pacientes de asma. En un número limitado de sujetos con EPOC leve, se ha descrito una prevalencia del 46% de HRB (Yan, Salome et al. 1985). Una prevalencia similar (25,4-47,8%) se ha observado en sujetos del *Lung Health Study*, los cuales tenían también EPOC leve (Kanner, Connett et al. 1994). Sólo el simple hecho de fumar puede provocar hiperreactividad como demuestra la elevada prevalencia en fumadores actuales (30-40%) y en ex fumadores sin obstrucción de las vías respiratorias (18-25%) (Grootendorst and Rabe 2004).

Un estudio longitudinal holandés encontró una asociación positiva entre la HRB y el desarrollo de síntomas respiratorios (tos crónica, expectoración crónica, disnea, ataques de asma, bronquitis) y una asociación negativa con la resolución de estos síntomas. Estas asociaciones fueron independientes de la condición de fumar (Willemse BW 2004). Estos resultados fueron confirmados en un estudio de Brutsche et al. (Brutsche, Downs et al. 2006). Los autores

encontraron que una HRB asintomática inicial se asociaba con el desarrollo de síntomas respiratorios, asma y la EPOC. La HRB no sólo se encontró que era un factor de riesgo para el desarrollo de EPOC sino que los fumadores con HRB tenían las pérdidas anuales más altas de FEV₁ (Brutsche, Downs et al. 2006). Estos hallazgos indican que la HRB es un predictor importante de la progresión de la obstrucción de las vías respiratorias, especialmente en fumadores habituales (Schafroth Torok and Leuppi 2007).

Estatus socio-económico

La pobreza es un claro factor de riesgo de padecer EPOC. Hay evidencias de que el riesgo de padecer EPOC está relacionado de forma negativa con el estatus socio-económico (Prescott, Lange et al. 1999). No es claro, sin embargo, si este patrón refleja la exposición a los contaminantes, el hacinamiento, la mala nutrición, infecciones u otros factores que están relacionados con un nivel socioeconómico bajo.

PATOLOGÍA DE LA EPOC

Los cambios anatomopatológicos de la EPOC incluyen cambios en las vías respiratorias superiores, vías aéreas inferiores (bronquiolitis), espacio alveolar (enfisema), y la vasculatura pulmonar (Tabla 3). Las diversas lesiones son el resultado de la inflamación crónica en el pulmón, que a su vez se inicia por la inhalación de partículas nocivas y gases tales como los presentes en el humo del cigarrillo (Cosío 2006).

Vías respiratorias centrales.

Se corresponden con la tráquea y con los bronquios que tienen un diámetro interior superior a 2mm. Los grandes cambios de las vías respiratorias consisten en la proliferación de las glándulas mucosas y la hiperplasia de células caliciformes. Estos cambios son proporcionales a la tos y la producción de moco que definen la bronquitis crónica, pero se relacionan con la limitación al flujo de aire (Shapiro and Ingenito 2005). Se caracteriza por un incremento

en el número de macrófagos y linfocitos T CD8⁺ (Tabla 4) (Cosío 2006). Aparecen pocos neutrófilos en la pared de las vías respiratorias pero si en el lumen de las mismas lo que sugiere un paso selectivo de los neutrófilos a través del epitelio (Saetta, Turato et al. 2001, Barnes 2014). La presencia de neutrófilos se ha asociado con el esputo purulento causado por las infecciones del tracto respiratorio superior (Shapiro and Ingenito 2005).

Tabla 3. Patogénesis de la EPOC: respuesta de las vías aéreas, espacio alveolar y vasculatura pulmonar

<p><i>Vías aéreas (vías < 2mm de diámetro)</i></p> <ul style="list-style-type: none">- Bronquiolitis- Tapones mucosos- Fibrosis peribronquial <p><i>Vasculatura pulmonar</i></p> <ul style="list-style-type: none">- Pérdida de resistencia de los precapilares- Alteración de la vasodilatación dependiente del endotelio- Engrosamiento de la pared arteriolar pulmonar <p><i>Espacio alveolar</i></p> <ul style="list-style-type: none">- Apoptosis de las células endoteliales- Hemosiderosis por parte de los macrófagos- Disfunción de los células alveolares tipo II
--

Vías respiratorias distales

Se corresponden con los bronquiolos con un diámetro interior menor a 2mm. Se observa un incremento tanto de los macrófagos como de los linfocitos T, linfocitos B, folículos linfoides, fibroblastos. Como en las vías respiratorias superiores se observan pocos neutrófilos y eosinófilos (Tabla 4). Los cambios

que predisponen al estrechamiento de las vías respiratorias pequeñas son la hiperplasia de células caliciformes, un engrosamiento de la pared de las vías respiratorias, el exceso de mucosidad, el edema y la infiltración celular inflamatoria (Figura 1) (Hogg, Chu et al. 2004, Cosío 2006). El incremento de la respuesta inflamatoria y del exudado intraluminal se correlaciona con la gravedad de la enfermedad.

Tabla 4. Lugares donde incrementan las células inflamatorias en EPOC

<p><i>Vías respiratorias superiores</i></p> <ul style="list-style-type: none">- Macrófagos- Linfocitos T, especialmente los CD8⁺- Neutrófilos, sólo en los casos de enfermedad grave- Eosinófilos, en algunos pacientes <p><i>Vías respiratorias inferiores</i></p> <ul style="list-style-type: none">- Macrófagos- Linfocitos T, especialmente los CD8⁺- Eosinófilos, en algunos pacientes <p><i>Parénquima</i></p> <ul style="list-style-type: none">- Macrófagos- Linfocitos T, especialmente los CD8⁺- Neutrófilos <p><i>Vasculatura pulmonar</i></p> <ul style="list-style-type: none">- Linfocitos T, especialmente los CD8⁺- Neutrófilos

Parénquima pulmonar:

Se observa un incremento de macrófagos y de linfocitos T CD8⁺ (Tabla 4) (Saetta, Di Stefano et al. 1998). Existe destrucción de las paredes alveolares y apoptosis de las células epiteliales y endoteliales con lo que hay una destrucción de los bronquiolos y de los sacos alveolares (Cosio, Majo et al. 2002).

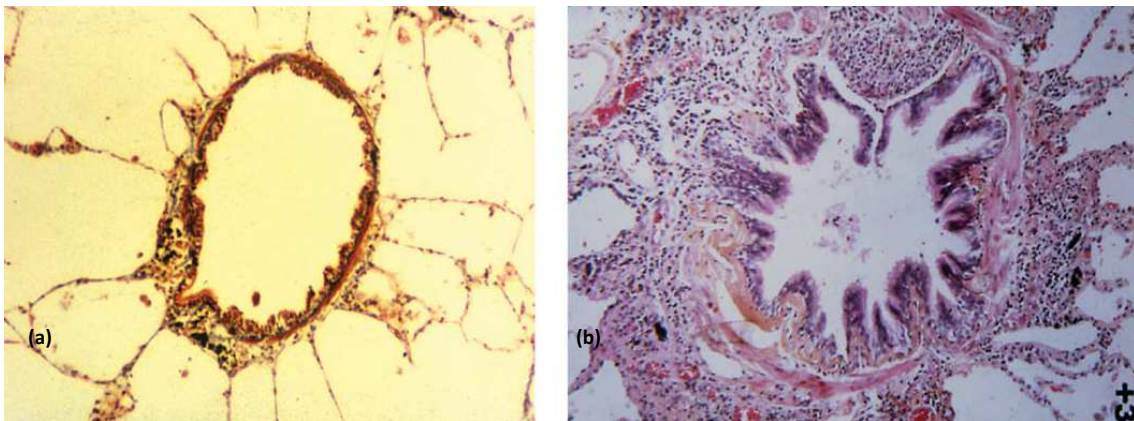


Fig. 1. (a) Vía respiratoria inferior normal. (b) Un bronquiolo anormal en un fumador con FEV1 anormal. Todas las capas de la pared están engrosadas, hay abundante infiltrado celular inflamatorio, el lumen se estrecha, y el epitelio es anormal con células caliciformes (Cosío 2006)

Vasculatura pulmonar:

Existe un incremento de macrófagos y de linfocitos T en la pared vascular (Tabla 4). El engrosamiento de la íntima, la hipertrofia del músculo liso y la inflamación de los vasos hace que los pacientes con EPOC tengan más riesgo de presentar hipertensión pulmonar (Wright JL 2005).

PATOFISIOLOGÍA DE LA EPOC

La EPOC es la consecuencia de la interacción de factores exógenos (humo de tabaco) y endógenos (estrés oxidativo) sobre las vías aéreas y el parénquima

pulmonar dando lugar a un proceso inflamatorio crónico en el que participan diversas células y mediadores (quimioquinas, citoquinas, proteasas) (Figura 2).

1- MECANISMOS CELULARES

La EPOC es una enfermedad inflamatoria compleja donde están implicados varios tipos de células inflamatorias las cuales tiene la capacidad de interaccionar mediante la liberación de una multitud de mediadores inflamatorios (Figura 2) (Barnes 2004).

Las células protagonistas en el proceso inflamatorio son los macrófagos, linfocitos T, linfocitos B y neutrófilos (Barnes 2003).

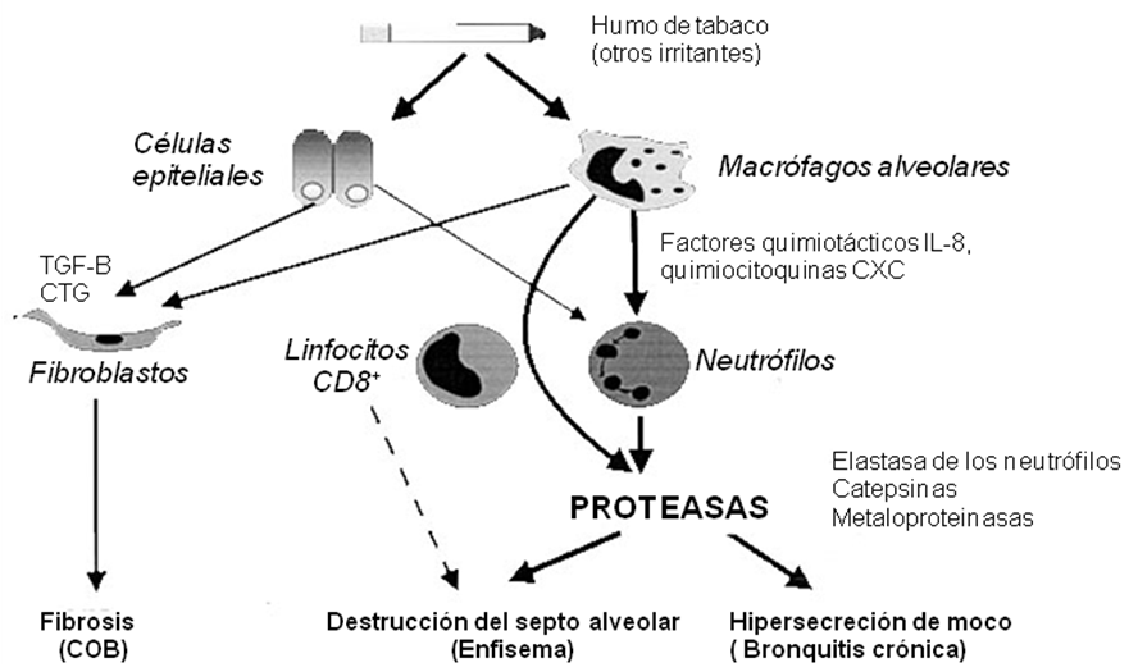


Fig.2. Mecanismos inflamatorios de la EPOC. El humo del tabaco y otros irritantes activan a los macrófagos en el tracto respiratorio liberando factores quimiotácticos como la IL-8. Además estas células liberan proteasas que rompen el tejido conectivo del parénquima pulmonar produciendo enfisema e hipersecreción de moco. Las células T citotóxicas (CD8⁺) también son reclutadas y están involucradas en la destrucción del septo pulmonar. Los fibroblastos están activados por factores de crecimiento liberados por los macrófagos y por las células epiteliales. CTG: factor de crecimiento del tejido conectivo. COB: bronquiolitis obstructiva crónica (Barnes 2004)

Neutrófilos

El número de neutrófilos está elevado en esputo y en muestras en el lavado bronquioalveolar de pacientes con EPOC. En las secreciones de las vías respiratorias altas las células inflamatorias predominantes son los neutrófilos (pasa del 30% en los no fumadores al 70% en los pacientes con EPOC) mientras que en el lavado bronquioalveolar los neutrófilos son el 15% de la población de las células inflamatorias (Tetley 2005).

Los neutrófilos secretan proteasas como la elastasa de los neutrófilos (NE), catepsina G y la proteasa-3 así como metaloproteasa de matriz 8 (MMP-8) y la MMP-9 que contribuyen a la destrucción del parénquima pulmonar. Además estas proteasas son un potente estimulador de la secreción de moco. El reclutamiento de los neutrófilos en las vías respiratorias y en el parénquima pulmonar implica la adhesión de estas células a las células endoteliales. La E-selectina (un molécula de adhesión endotelial) está sobreexpresada en las células endoteliales de pacientes con EPOC (Di Stefano, Maestrelli et al. 1994). Estos neutrófilos adheridos migran al tracto respiratorio bajo la influencia de factores quimiotácticos como son la interleuquina 8 (IL-8), el leucotrieno B₄ (LTB₄) y la quimiocitoquina CXC que son liberados por los macrófagos alveolares y por las células epiteliales expuestas a tabaco (Barnes 2004).

El papel de los neutrófilos no está muy claro aún pero se ha visto que hay una correlación entre el número de neutrófilos circulantes y la caída en el FEV₁. El número de neutrófilos en las biopsias bronquiales y en el esputo inducido se correlaciona con la gravedad de la enfermedad y con la tasa de pérdida de la función pulmonar (Di Stefano A 1998).

Macrófagos

Los macrófagos juegan un papel principal (Figura 3) en la patología de la EPOC (Shapiro 1999) como célula controladora de todo el proceso inflamatorio. Hay un aumento (de 5 a 10 veces) en el número de macrófagos en las vías respiratorias, parénquima pulmonar, en el lavado bronquioalveolar y en el esputo de los pacientes con EPOC. Existe una correlación entre el número de

macrófagos localizados en las vías respiratorias y la gravedad de la EPOC (Di Stefano A 1998).

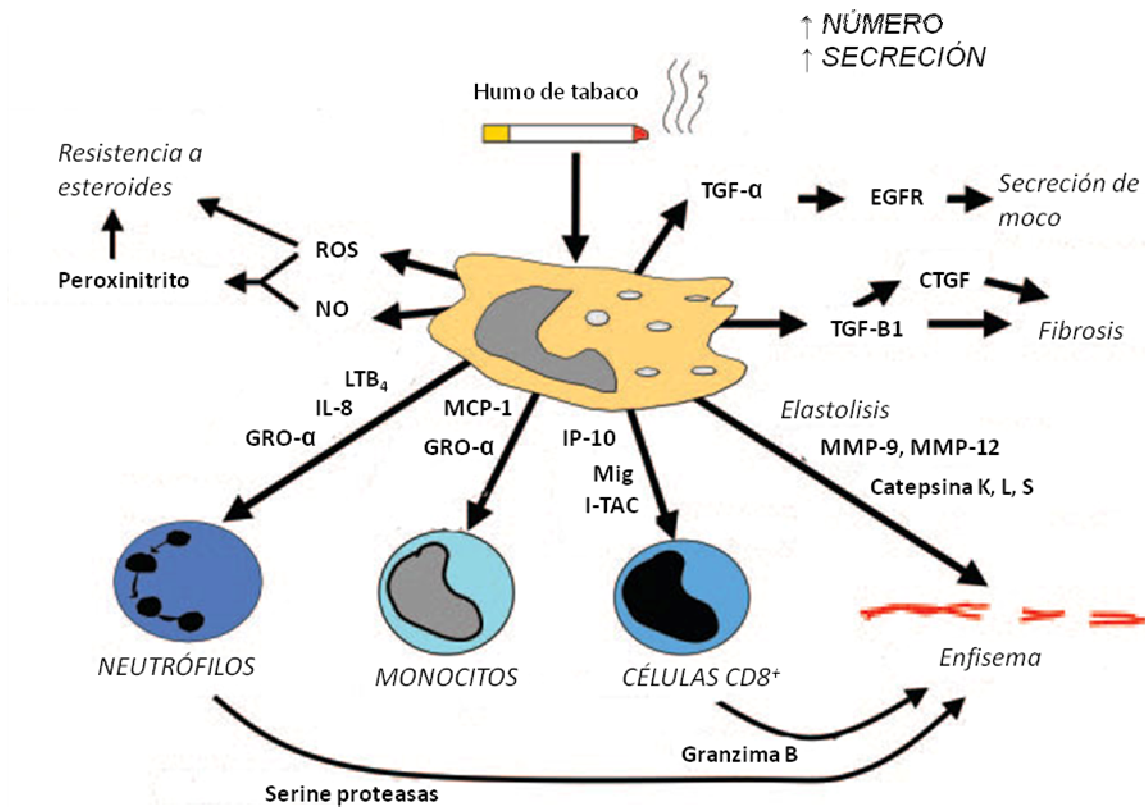


Fig. 3. Implicación de los macrófagos en la EPOC. Los macrófagos son activados por el humo del tabaco secretando multitud de proteínas inflamatorias que orquestan el proceso inflamatorio en la EPOC. Modificado de Barnes et al 2014 (Barnes 2014)

Los macrófagos son activados por el humo del tabaco liberando mediadores inflamatorios que interaccionan con otras células inflamatorias (Figura 3). Esto proporciona un mecanismo celular que une el tabaquismo con la inflamación en la EPOC. Los macrófagos alveolares secretan enzimas elastolíticas como son la MMP-2, MMP-9, MMP-12, catepsinas K, L y S, y la elastasa de los neutrófilos (Punturieri, Filippov et al. 2000, Russell, Thorley et al. 2002). Los macrófagos alveolares de pacientes con EPOC secretan más proteínas inflamatorias y tienen una mayor actividad elastolítica basal en comparación con los fumadores (Lim, Roche et al. 2000, Russell, Culpitt et al. 2002)

(Russell, Thorley et al. 2002). La mayoría de las proteínas proinflamatorias que están sobre expresadas en los macrófagos de pacientes que sufren EPOC están reguladas por el factor de transcripción nuclear factor- κ B (NF- κ B), especialmente durante las agudizaciones (Di Stefano, Caramori et al. 2002, Caramori G 2003).

El aumento del número de macrófagos en los fumadores y en los pacientes con EPOC puede ser debido a un mayor reclutamiento de los monocitos en circulación como repuesta a las quimioquinas monocito selectivas o bien vía linfocitos T ya que liberan quimiotácticos de los macrófagos. El aumento del número de macrófagos en la EPOC también puede deberse a aumento de la proliferación y la supervivencia prolongada en el los pulmones (Barnes 2014).

Linfocitos T

En los pacientes con EPOC se ha observado un incremento en el número total de linfocitos T tanto en el parénquima pulmonar como en las vías respiratorias periféricas y centrales. El incremento es mayor en los CD8⁺ que en los CD4⁺ (O'Shaughnessy, Ansari et al. 1997, Saetta, Baraldo et al. 1999, Majo J 2001, Retamales, Elliott et al. 2001). Existe una correlación entre el número de células T, la cantidad de destrucción alveolar, y la gravedad de la obstrucción del flujo aéreo.

El papel de las células T en la fisiopatología de la EPOC no está muy claro todavía. Las células CD8⁺ tienen la capacidad de causar citolisis y apoptosis de las células epiteliales y alveolares a través de la liberación de perforinas, granzima-B, y el TNF- α (Hashimoto, Kobayashi et al. 2000). Existe una asociación entre las células CD8⁺ y la apoptosis de las células alveolares en el enfisema (Majo J 2001).

Eosinófilos

La presencia de eosinófilos en pacientes con EPOC predice una respuesta a los corticosteroides y puede indicar un asma coexistente (Brightling, Monteiro et al. 2000, Papi A 2000). Se ha observado un aumento del número de eosinófilos tanto en las biopsias bronquiales como en el lavado bronquioalveolar durante las exacerbaciones agudas de bronquitis crónica (Saetta, Di Stefano et al. 1994) (Saetta, Di Stefano et al. 1996). Los niveles de las proteínas básicas de eosinófilos en el esputo inducido son tan elevados en la EPOC como en el asma, a pesar de la ausencia de los eosinófilos, lo que sugiere que puede haber desgranulados y ya no son reconocibles al microscopio (Keatings VM 1997). Este hallazgo puede estar justificado por los niveles altos de elastasa de los neutrófilos, ya que se ha demostrado que puede causar la degranulación de los eosinófilos (Liu, Lazarus et al. 1999).

Células dendríticas

Juegan un papel central en la activación de la respuesta de la inmunidad innata y adaptativa (Banchereau, Briere et al. 2000). Las vías respiratorias y parénquima pulmonar contienen una rica red de células dendríticas que se localiza cerca de la superficie, por lo que su ubicación es ideal para dar la señal de entrada de sustancias extrañas que se inhalan (PA 2000). Las células dendríticas puede activar una gran variedad de células inflamatorias e inmunes como son los macrófagos, neutrófilos y linfocitos T y B (Huang Q 2001).

Células epiteliales

El epitelio celular de las vías respiratorias y alveolares puede ser una importante fuente de mediadores inflamatorios y de proteasas en la EPOC. Las células epiteliales se activan por el humo del cigarrillo para producir mediadores inflamatorios, incluyendo el TNF- α , IL-1 β , GM-CSF, e IL-8 (Mio, Romberger et al. 1997, Hellermann, Nagy et al. 2002, Floreani, Wyatt et al. 2003). Las células epiteliales en las vías aéreas pequeñas pueden ser una

importante fuente de TGF- β (factor de crecimiento transformante beta 1), el cual induce una fibrosis local (Takizawa, Tanaka et al. 2001).

2- ESTRÉS OXIDATIVO Y NITROSATIVO

El estrés oxidativo es una característica importante de la EPOC y cada vez hay más evidencias de que está involucrado en su fisiopatología. El estrés oxidativo se produce cuando las especies reactivas de oxígeno (ROS) se producen en exceso dando como resultado efectos perjudiciales como son daños en los lípidos, proteínas, y ácido desoxirribonucleico (ADN).

Las células inflamatorias y estructurales que se activan en las vías respiratorias de los pacientes con EPOC producen ROS, incluyendo los neutrófilos, eosinófilos, macrófagos y las células epiteliales (MacNee 2001). Las peroxidases de los granulocitos, como la mieloperoxidasa en los neutrófilos, desempeñan un papel importante en la generación del estrés oxidativo (van der Vliet, Eiserich et al. 1999, Gaut, Byun et al. 2002).

Además, el pulmón también se ve expuesto a los oxidantes exógenos, que sumados a la producción endógena de ROS incrementa el estrés oxidativo de los pulmones. Por ejemplo el humo de los cigarrillos es una potente fuente de oxidantes, la fase de gaseosa se estima que contienen más de 10^{15} de radicales libres (Pryor and Stone 1993).

La producción de oxidantes se ve contrarrestada por varios mecanismos antioxidantes endógenos (Cantin AM 1999) y pueden ser mecanismos enzimáticos y no enzimáticos. Los principales enzimas antioxidantes de las vías respiratorias son la catalasa, superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa y glutatión S-transferasa. En la categoría no enzimática tenemos compuestos de bajo peso molecular como el glutatión, tocoferol, ascorbato, urato, bilirrubina, y ácido lipídico. En el pulmón los antioxidantes intracelulares se expresan en niveles relativamente bajos y no son inducidos por el estrés oxidativo, mientras que la mayoría de los antioxidantes son extracelulares (Comhair and Erzurum 2002). Los antioxidantes extracelulares, en particular la

glutación peroxidasa, están sobre expresados en respuesta al humo del cigarrillo y al estrés oxidativo (Cantin AM 1999).

Las especies reactivas de oxígeno tienen varios efectos sobre las vías respiratorias entre ellas aumentar la respuesta inflamatoria de la EPOC. Estos efectos pueden estar mediados por una acción directa de los ROS en las células diana de las vías respiratorias o por una acción indirecta a través de la activación de las vías de transducción de señales y factores de transcripción así como a través de la formación de mediadores oxidados.

Los ROS pueden activar al factor de transcripción NF- κ B, el cual activa a un gran número de genes inflamatorios produciéndose una amplificación de la respuesta inflamatoria (Barnes and Karin 1997). Además el estrés oxidativo provoca una activación en la actividad de la histona acetiltransferasa, esta enzima abre la estructura de la cromatina y se asocia a incremento en la transcripción de varios genes inflamatorios (Rahman 2003, Tomita, Barnes et al. 2003). Otro factor de transcripción que activa los genes inflamatorios es la proteína activadora-1, un heterodímero de las proteínas de Fos y Jun (Xanthoudakis S 1996).

Los oxidantes también activan la vía de las quinasas activadas por (MAPK). El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) es un potente activador de las quinasas extracelulares (ERK) y de la p38-MAPK las cuales regulan la expresión de muchos genes inflamatorios y de supervivencia en algunos tipos celulares (Barnes 2014).

Otra forma de estrés celular es el estrés nitrosativo. Una forma indirecta de valorarlo es mediante el óxido nítrico exhalado.

El óxido nítrico (NO) se genera mediante la enzima nítrico óxido sintasa inducible (iNOS) la cual se expresa en los macrófagos y en el parénquima pulmonar (Ichinose, Sugiura et al. 2000, Maestrelli, Paska et al. 2003). En pacientes con EPOC los niveles de NO exhalado son muy parecidos a los niveles de los controles normales pero están claramente incrementados durante los periodos de agudización (Agusti, Villaverde et al. 1999).

El óxido nítrico puede disminuir con el consumo del tabaco y el estrés oxidativo ya que se combina con aniones superóxido para formar el peroxinitrito (Majori, Corradi et al. 1999, Kanazawa H 2003). El peroxinitrito puede reaccionar con residuos de tirosina de ciertas proteínas y formar 3- nitrotirosina el cual se puede detectar inmunológicamente. En los macrófagos de esputo de los pacientes con EPOC hay un incremento de la inmunoreactividad hacia la 3-nitrotirosina (Ichinose, Sugiura et al. 2000) y esta nitración de la tirosina de las proteínas del esputo está más elevado en los pacientes con EPOC que en los controles y está correlacionada con la severidad de la enfermedad (Sugiura, Ichinose et al. 2004)

3- CITOQUINAS

Las citoquinas son proteínas de bajo peso molecular, por lo general de <80kDa, que actúan en la señalización extracelular y están producidas por diferentes tipos celulares. Las citoquinas pueden actuar sobre las células adyacentes (paracrina), sobre las células distantes (endocrina) y sobre ellas mismas (autocrina). Los efectos de las citoquinas están mediados por su unión a receptores de superficie celular de alta afinidad, por lo general presentes en números bajos y que puede ser sobreexpresados en la activación celular (Chung 2001). Diversas citoquinas se han implicado en la EPOC (Chung 2001) (Tabla 5).

Tabla 5. Fuentes y efectos de las citoquinas

CITOQUINAS	FUENTE	FUNCIONES
TNF-α	Macrófagos Células T Mastocitos Células epiteliales vías respiratorias	Activación del epitelio y endotelio HRB \uparrow de IL-8 por la células epiteliales \uparrow MMP de los macrófagos
IL-1	Monocitos/macrófagos Fibroblastos Células B Células Th1 y Th2 Neutrófilos Células endoteliales Células epiteliales vías respiratorias	\uparrow de la adhesión al endotelio vascular Factor de crecimiento para Th2 Quimioatrayente de neutrófilos Factor de crecimiento para las células B Activación de las células T y de las epiteliales HRB
IL-6	Monocitos/macrófagos Células B Células T Fibroblastos Células epiteliales vías respiratorias	Factor de crecimiento para las células B Factor de crecimiento para las células T \uparrow de IgE
IL-8	Células epiteliales vías respiratorias Monocitos/macrófagos SMC de las vías respiratorias Eosinófilos	Activador y quimioatrayente de neutrófilos Quimiotáctico para las células T CD8 ⁺ Activa la 5-lipoxigenasa de los neutrófilos Induce la liberación de histamina
IL-17	Células T CD4 ⁺	Proliferación de las células T Activación de las células endoteliales, epiteliales y fibroblastos Inducción liberación de IL-6, IL-8 y GM-CSF Quimioatrayente y activador de neutrófilos
GM-CSF	Células T Eosinófilos Fibroblastos Células endoteliales SMC de las vías respiratorias Células epiteliales vías respiratorias	Apoptosis y activación de los eosinófilos Proliferación y maduración de las células hematopoyéticas HRB Migración de las células endoteliales
IL-10	Th2 Monocitos/macrófagos Células T CD8 ⁺	\downarrow supervivencia eosinófilos \downarrow Th1 y Th2 \downarrow Activación monocitos/macrófagos \downarrow HRB \uparrow células B y factor de crecimiento mastocitos
IL-9	Th2 Eosinófilos	\uparrow células T activas y de IgE de células B \uparrow crecimiento y diferenciación mastocitos \uparrow expresión mucinas
IL-5	Th2 Mastocitos Eosinófilos	Maduración de eosinófilos \uparrow Th2 \downarrow apoptosis HRB

Tabla 5. Continuación

IL-4	Th2 Mastocitos Basófilos Eosinófilos	↑factor de eosinófilos ↑Th2; ↓Th1 ↑IgE ↑de la expresión de mucinas ↑expresión VCAM-1 de células endoteliales
IL-13	Th2 Células Natural Killer Basófilos Eosinófilos	Activa eosinófilos ↓apoptosis ↑IgE ↑ expresión mucinas Induce enfisema y MMP
IL-2	Células epiteliales vías respiratorias Th1 y Th2 Eosinófilos	Crecimiento y diferenciación de las células T
IL-12	Células B Monocitos/macrófagos Células dendríticas Eosinófilos	Regula diferenciación de Th1 ↓expansión Th2 ↓síntesis IgE inducida por IL-4 Estimula a las células natural killer y a las células T a producir INF- γ
IL-18	Células Th1 Células epiteliales vías respiratorias Células Natural Killer Células dendríticas Monocitos	Liberación de IL-8, MIP-1, MCP-1 desde células mononucleares Desarrollo de Th1 conjuntamente con IL-12 Activación células natural killer y monocitos ↓IgE

Th: célula T helper; IL: interleuquina; IgE: inmunoglobulina E; HRB: hipereactividad bronquial; IFN- γ : interferón gamma; MIP-1: factor inflamatorio de macrófagos; MCP-1: proteína quimiotáctica de monocitos-1; SMC: células músculo liso; TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa; GM-CSF: factor estimulante de colonias granulocito-macrófagos; VCAM: molécula de adhesión celular. (Modificado de Chung KF, 2001)

Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α)

TNF- α está presente en una concentración elevada en el esputo de pacientes con EPOC sobretodo en las agudizaciones (Keatings, Collins et al. 1996). También se ha observado que en estos pacientes los receptores solubles de TNF están incrementados (Vernooy, Kucukaycan et al. 2002).

TNF- α se sintetiza normalmente como un precursor de unos 26 KDa (pro-TNF- α) que se almacena unido a la membrana. Cuando llega el estímulo apropiado,

como por ejemplo el lipopolisacárido, el precursor se convierte en una proteína de unos 17 kDa, que es la forma biológicamente activa, listo para ser secretado. La enzima que transforma al pro-TNF- α es una metaloproteasa unida a membrana llamada enzima de conversión de TNF- α (TACE), aunque otras metaloproteinasas de la matriz también tienen un efecto de mayor o menor grado de conversión del TNF- α (Gearing, Beckett et al. 1994).

Las concentraciones séricas de TNF- α y la estimulación de la producción de dicha citoquina desde los monocitos de la sangre periférica está incrementada en los pacientes con EPOC y bajo peso lo que sugiere que tiene un papel en la caquexia o pérdida de masa muscular que sufren los pacientes EPOC graves (Di Francia, Barbier et al. 1994, de Godoy, Donahoe et al. 1996, Pitsiou, Kyriazis et al. 2002).

TNF- α activa al factor de transcripción NF- κ B, el cual activa la transcripción de genes inflamatorios, incluyendo citoquinas, quimioquinas y proteasas, tanto en las células epiteliales como en los macrófagos. Del mismo modo se activa p38 MAP quinasa, que a su vez puede activar un conjunto similar de genes y puede interactuar con la vía de NF- κ B. Esto sugiere un papel de TNF- α en la amplificación de la inflamación de la EPOC. TNF- α interviene en la activación de los neutrófilos, monocitos, macrófagos, epitelio, la secreción de moco y la destrucción del parénquima pulmonar a través de la liberación de proteinasas (Figura 4) (Barnes 2004).

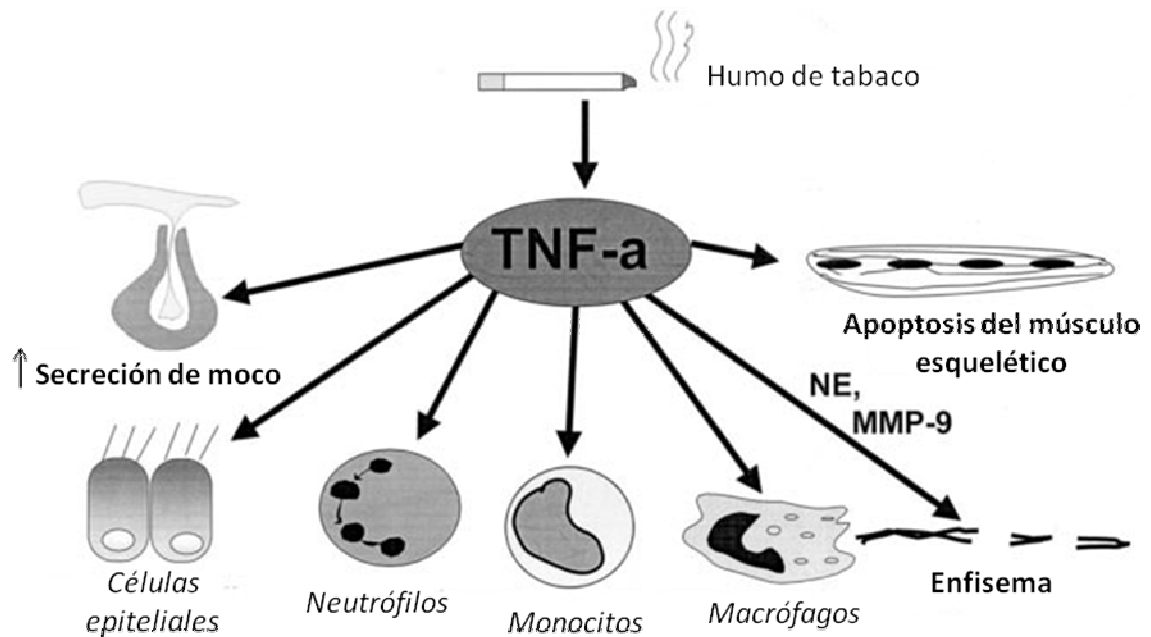


Fig. 4. TNF- α juega un papel primordial en la EPOC y amplifica la respuesta inflamatoria dando como resultado la activación de las células epiteliales, neutrófilos, monocitos y macrófagos. Induce enfisema a través de la liberación de proteasas como es NE y MMP-9, estimula la secreción de moco e induce la apoptosis en el músculo esquelético.(Barnes 2004)

Interleuquina-1 β

IL-1 β tiene unas funciones similares al TNF- α y es un potente activador de los macrófagos alveolares (Russell, Thorley et al. 2002). Induce la proliferación de fibroblastos, aumenta la secreción de prostaglandina y de colagenasa además de favorecer la secreción de otras quimioquinas (Chung 2001, del Puerto-Nevado, Pérez-Rial et al. 2010) y de estimular la expresión de MMPs (metaloproteasas), incluyendo la MMP-9 (Kusano, Miyaura et al. 1998). En el esputo de pacientes con EPOC hay un incremento en la concentración de IL-1 β , que se correlaciona con la severidad de la enfermedad (Sapey, Ahmad et al. 2009).

Interleuquina-6

Las concentraciones de IL-6 están incrementadas en el esputo, BAL (lavado bronquioalveolar) y en el condensado exhalado de los pacientes con EPOC especialmente durante las agudizaciones (Song, Zhao et al. 2001, Bucchioni, Kharitonov et al. 2003). Además la IL-6 está aumentada en el plasma de estos pacientes (Debigare, Marquis et al. 2003, Godoy, Campana et al. 2003, Hageman, Larik et al. 2003), especialmente durante las exacerbaciones (Wedzicha, Seemungal et al. 2000). La IL-6 es un marcador de inflamación, ya que está activado por NF- κ B aunque su papel en el proceso inflamatorio es incierto ya que tiene acciones anti-inflamatorias como pro-inflamatorias por lo que sus efectos podrían estar determinados por la presencia de otras citoquinas.

Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos

Las concentraciones de GM-CSF en BAL se incrementan en los pacientes estables de EPOC pero se incrementan aún más cuando sufren agudizaciones (Balbi B 1997). GM-CSF es importante para la supervivencia de los neutrófilos y desempeña un papel en la mejora de la respuesta inflamatoria de estas células. Al igual que otras citoquinas pro-inflamatorias predominantemente está regulada por el factor NF- κ B. La secreción de GM-CSF se suprime por los corticosteroides mientras que la secreción de otras citoquinas parece ser resistente a corticosteroides (Barnes 2004).

Interleuquina-10

IL-10 es una citoquina anti-inflamatoria que es liberada por los monocitos y por los macrófagos alveolares en respuesta a estímulos inflamatorios. IL-10 tiene un potencial terapéutico en la EPOC, ya que tiene un de amplio espectro de efectos anti-inflamatorios, muchos de los cuales están mediados por la inhibición de NF- κ B (Williams L 2004). IL-10 suprime la liberación de la MMP-9 por parte de los monocitos de pacientes con EPOC y al mismo tiempo estimula

la liberación de sus inhibidores endógenos, los inhibidores tisulares de las metaloproteasas de matriz (TIMP-1) (Lacraz, Nicod et al. 1995, Mostafa Mtairag, Chollet-Martin et al. 2001).

Interferón- γ

Las células T- CXCR3 positivas que se encuentran incrementadas en número en las vías aéreas pequeñas en pacientes con EPOC expresan INF- γ lo que estimula la expresión de quimioquinas CXCR3 como es el IP-10 (IFN-gamma-inducible protein 10), lo que sugiere que hay un circuito de retroalimentación positiva. (Barnes 2004)

Las células CD8⁺- IFN- γ positivas (células TC1) se incrementan en el esputo de los pacientes con EPOC (Tzanakis, Chrysofakis et al. 2004). Un aumento de la secreción de IFN- γ por parte de las células mononucleares de la sangre periférica también se ha descrito en pacientes con EPOC (Majori, Corradi et al. 1999).

4- QUIMIOQUINAS

Las quimioquinas son citoquinas quimiotácticas con un peso molecular de 8-10 kDa y juegan un papel fundamental en la inflamación y en la respuesta inmune ya que regulan el tráfico de células inflamatorias y del sistema inmune a los órganos diana (Chung 2001, Olson and Ley 2002). Además están involucradas en el reclutamiento de células inflamatorias en la EPOC (Lukacs 2001) (Yoshida and Tuder 2007) (Tabla 6).

Las quimioquinas implicadas en la patogenia de la EPOC más conocidas se muestran en la tabla 6, aunque la más importante y la que se va a investigar en esta tesis doctoral es la interleuquina 8 (IL-8).

Tabla 6. Quimioquinas y sus funciones

QUIMIOQUINAS	FUNCIONES
QUIMIOQUINAS CC	
MCP-1	Quimiotaxis de monocitos, células NK y basófilos Adquisición del fenotipo de las células Th2 Liberación del mediador de los mastocitos
MIP-1α	Quimioquina Th1 Quimiotaxis de monocitos, células NK y basófilos Activación y maduración de células dendríticas
MIP-1β	Quimioquina Th1 Quimiotaxis de monocitos y células NK
RANTES	Quimioquina Th1 Quimiotaxis de neutrófilos, células NK y eosinófilos Activación y maduración de células dendríticas
MCP-4	Quimiotaxis de monocitos, células T y eosinófilos
TARC	Quimioquina Th2
MIP-3α	Reclutamiento de células dendríticas, células T y B inmaduras
QUIMIOQUINAS CXC	
GROα	Quimiotaxis de neutrófilos Regulación de la función de las células endoteliales
GROβ	Quimiotaxis de neutrófilos Regulación de la función de las células endoteliales
GROγ	Quimiotaxis de neutrófilos Regulación de la función de las células endoteliales
IL-8	Quimiotaxis de neutrófilos, eosinófilos, células T CD8 ⁺ y basófilos Regulación de la función de las células endoteliales
Mig	Quimioquina inducible de IFN- γ Inhibidor de eosinófilos Respuesta de Th1 y Th2
IP-10	Quimioquina inducible de IFN- γ Respuesta de Th1 Quimiotaxis de las células NK

Th: célula T helper; IL: interleuquina; IFN- γ : interferón gamma; MIP-1: factor inflamatorio de macrófagos; MCP-1: proteína quimiotáctica de monocitos-1; MIP: factor inflamatorio de monocitos; RANTES: regulado en el de activación de células T normales expresadas y secretadas; TARC: Thymus and activation- regulated chemokine; GRO: Growth-related oncogene; Mig: monoquina inducida por interferón; IP-10: Proteína 10 inducida por interferón

Interleuquina-8

La quimioquina CXC IL-8 (CXCL8) es un potente factor quimiotáctico de neutrófilos.

La IL-8 se sintetiza en varios tipos celulares, principalmente en las células epiteliales, macrófagos, y en los neutrófilos (Mukaida 2003). Las células epiteliales de las vías respiratorias secretan IL-8 en respuesta a varios estímulos, incluyendo el TNF- α , IL-1 β , los productos bacterianos, lipopolisacáridos (LPS), ciertos virus, estrés oxidativo, y el humo del tabaco (DeForge, Preston et al. 1993, Schulz C 2004) (Johnston, Papi et al. 1998).

Los niveles de IL-8 aumentan en el esputo inducido en pacientes con EPOC y están correlacionados con el aumento de los neutrófilos (Keatings, Collins et al. 1996, Yamamoto, Yoneda et al. 1997). Las concentraciones de IL-8 en el esputo inducido son más elevadas en las agudizaciones lo que puede contribuir al incremento del número de neutrófilos y al aumento de la purulencia del esputo (Crooks, Bayley et al. 2000, Aaron, Angel et al. 2001). Existe una correlación entre las concentraciones de IL-8 y el recuento de colonias bacterianas en el esputo lo que indica que la infección bacteriana puede inducir la inflamación neutrofílica, al menos en parte, a través de la inducción de la liberación de la IL-8 en las vías respiratorias (Hill AT 2000) (Patel IS 2002). IL-8 también está aumentada en el BAL de los pacientes con EPOC y se correlaciona también con el número de neutrófilos (Nocker, Schoonbrood et al. 1996, Soler, Ewig et al. 1999).

La secreción de la IL-8 está regulada por varios factores de transcripción entre los que predomina NF- κ B (Figura 5) (Carter AB 1998, DiMango, Ratner et al. 1998) y se inhibe con la activación de la quinasa IKK2 (inhibidor de NF- κ B cinasa-2) (Tomita, Caramori et al. 2002). La activación de NF- κ B conlleva una hiperacetilación de las histonas lo que conduce a un desenrollamiento del ADN y por último a un incremento de la transcripción del gen de la IL-8 (Tomita, Barnes et al. 2003). La secreción de IL-8 también parece ser que está regulada por las vías de las MAP quinasas y por ERK (Wang, Cleary et al. 2003).

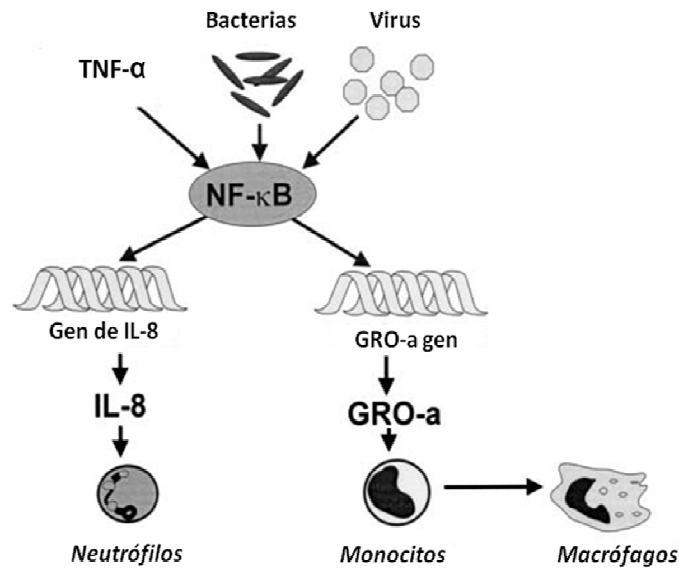


Fig. 5. NF-κB juega un papel central en la regulación de los genes de las quimioquinas entre ellos el de la IL-8 y GRO-α. NF-κB puede ser activado por el humo del tabaco y en las agudizaciones por virus y bacterias. (Barnes 2004)

La IL-8 actúa a través de dos receptores: CXCR1, que es un receptor de baja afinidad y que es específico para IL-8, y CXCR2, que tiene una alta afinidad y es compartido por otras quimioquinas CXC (Figura 6). Es probable que el receptor CXCR2 medie la respuesta quimiotáctica de los neutrófilos y de los monocitos, mientras que CXCR1 puede mediar los efectos de la IL-8 sobre la liberación de mediadores y proteasas. Durante las agudizaciones hay un marcado incremento en el receptor CXCR2 y esto se correlaciona con el aumento del número de neutrófilos en la vía aérea (Qiu, Zhu et al. 2003).

La unión de IL-8 a CXCR1 y -2 activa a la proteína quinasa B (Akt) y a las GTPasas, que conducen a una mayor adhesión de los neutrófilos a las células endoteliales y a su migración. Existe también la activación de Ras y MAPK en los neutrófilos causando su desgranulación. Estos efectos pueden ser regulados a la baja por el regulador intracelular de la proteína G, que disminuyen la vida media del GTP activo unido al CXCR, lo que reduce la migración y adhesión de los neutrófilos mediada por IL-8 (Bowman, Campbell et al. 1998).

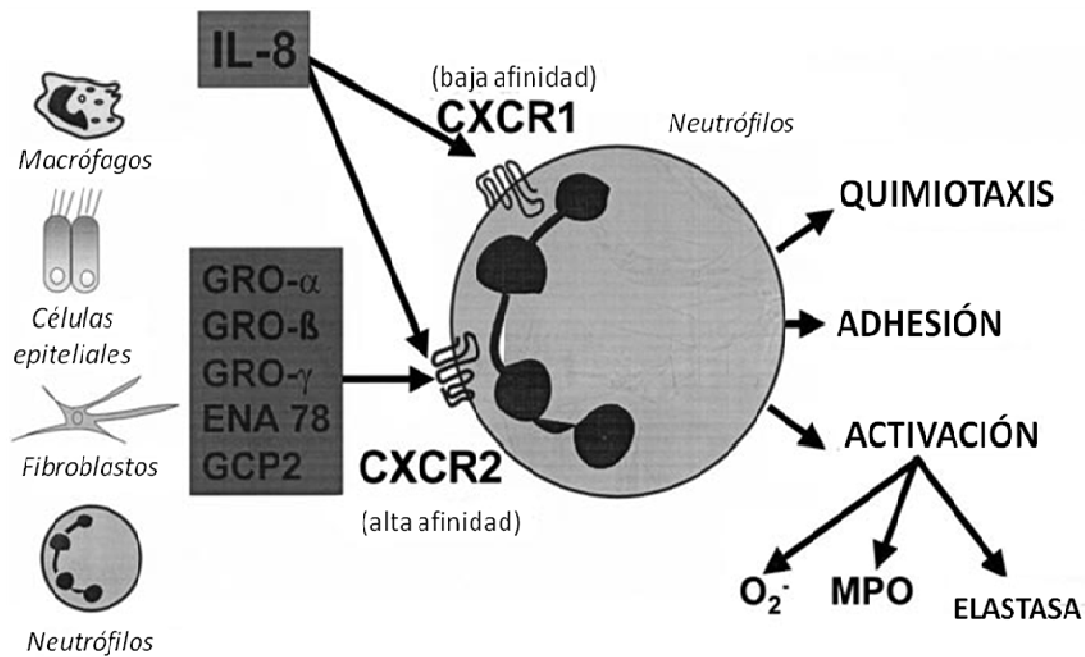


Fig. 6. Receptores CXC en los neutrófilos. IL-8 se une con baja afinidad a CXCR1 resultando en una adhesión y una activación y a los CXCR2 con una alta afinidad resultando en una quimiotaxis. CXCR2 también se activa por otras CXC como es GRO- α , - β y γ . ENA-78 y la proteína granulocítica quimiotáctica (GCP) 2 (Barnes 2004)

Otras quimioquinas implicadas:

Growth- Related Oncogene - α

Growth- Related Oncogene - α (GRO- α ; CXCL1) es otra quimioquina CXC que está implicada en la EPOC. GRO- α es secretada por los macrófagos alveolares y las células epiteliales de las vías aéreas tras ser estimulados con IL-17 y TNF- α (Jones and Chan 2002, Prause, Laan et al. 2003, Schulz C 2004). Además GRO- α activa a los neutrófilos, monocitos, basófilos y los linfocitos T vía CXCR2 (Figura 6). Las concentraciones de GRO- α son elevados en el esputo inducido y en el BAL de los pacientes con EPOC en comparación con los fumadores y los no fumadores (Traves SL 2004). GRO- α activa selectivamente CXCR2 produciendo una quimiotaxis de los neutrófilos y monocitos (Traves SL 2004).

Proteína quimiotáctica de monocitos-1

La proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1; CCL2) es una quimioquina CC que activa al receptor CCR2 de los monocitos y linfocitos T (Rose, Sung et al. 2003). CCR2 puede jugar un papel en la EPOC ya que los niveles de MCP-1 se incrementan en el esputo, lavado broncoalveolar, y en los pulmones de los pacientes con EPOC, además MCP-1 se expresa en los macrófagos alveolares, linfocitos T y en las células epiteliales (Capelli, Di Stefano et al. 1999, de Boer, Sont et al. 2000, Traves SL 2004).

5- FACTORES DE CRECIMIENTO

Se han encontrado cambios estructurales en las vías aéreas y en el parénquima pulmonar probablemente como resultado de un proceso inflamatorio crónico que genera proliferación celular y fibrosis, en la que están implicados diferentes factores de crecimiento (Tabla 7).

Tabla 7. Factores de crecimiento implicados en EPOC

FACTORES DE CRECIMIENTO	FUNCIONES
TGF-1 (transforming growth factor)	Inhibe proliferación celular Regula diferenciación celular Producción de proteínas de la matriz extracelular
EGF (epidermal growth factor)	Regulación de la secreción de moco Expresión de los genes de mucina Diferenciación de las células secretoras de moco
VEGF (vascular- endotelial growth factor)	Regulador del crecimiento vascular Participa en el remodelado pulmonar
FGF (fibroblast growth factor)	Implicado en el remodelado vascular

6- PROTEASAS

Desde hace tiempo se propuso que las diferentes proteasa podían descomponer los componentes del tejido conectivo, en particular la elastina del parénquima pulmonar produciendo enfisema y esto es debido a que existe un desequilibrio entre las proteasas y las antiproteasas endógenas que deberían proteger de los efectos mediados por proteasas.

Las proteasas implicadas en la patogenia de la EPOC son:

Elastasa de neutrófilos (NE)

La NE es una potente secretora de moco en las glándulas submucosas y en las células caliciformes (Sommerhoff, Nadel et al. 1990, Takeyama, Agusti et al. 1998, Nadel 2000). NE induce la expresión de la MUC5AC (mucina 5AC), y este mecanismo parece ser dependiente de la generación de las especies reactivas de oxígeno (Fischer and Voynow 2002). La NE también induce la expresión de algunas citoquinas incluyendo a la IL-8 en las células epiteliales de las vías aéreas (Nakamura, Yoshimura et al. 1992).

La NE es una serin-proteasa que es inhibida por la α_1 - antitripsina del parénquima pulmonar. Se almacena en los gránulos azurofílicos de los neutrófilos, y puede ser expresa en la superficie celular de las células sensibilizadas por las citoquinas (Owen, Campbell et al. 1997). Hay un aumento en la cantidad de complejos NE/ α_1 - antitripsina en el BAL de pacientes con EPOC que son fumadores (Yoshida and Tudor 2007), y esto se correlaciona con la tasa de disminución del FEV₁ (Betsuyaku, Nishimura et al. 1999).

Otras proteasas de serina

Los neutrófilos también pueden almacenar dos proteasas de serina en sus gránulos como son la catepsina G y la proteinasa 3, (Rao, Wehner et al. 1991). Estas proteasas tienen propiedades similares a NE e inducen la secreción de moco de una manera similar (Witko-Sarsat V 1999). La proteinasa-3 se expresa

en la superficie de los neutrófilos después de su activación con citoquinas (Campbell, Campbell et al. 2000) y está inhibida por la α_1 - antitripsina (JG 2003). Los inhibidores de la elastasa de los neutrófilos pueden inhibir también a estas proteasas de serina (H 2002).

Metaloproteasas de matriz

Las MMPs son una gran familia de proteasas dependientes de zinc que regulan la destrucción de los componentes de la matriz extracelular (Stamenkovic 2003). Las MMP juegan también un papel clave en la regulación de las citoquinas, quimioquinas y en los factores de crecimiento.

Las MMP implicadas en la EPOC son la MMP1 (colagenasa I), MMP2 (gelatinasa A), MMP9 (gelatinasa B), MMP12 (elastasa) y se encuentran con frecuencia en el lavado broncoalveolar y en el pulmón de pacientes con EPOC independientemente de si son o no fumadores (Mocchegiani, Giacconi et al. 2011) (Tabla 8).

Niveles elevados de MMP-1 y MMP-9 se han detectado en el fluido de lavado broncoalveolar de pacientes con enfisema (Finlay, Russell et al. 1997). Los macrófagos aislados del BAL de dichos pacientes expresan más MMP-1 y MMP-9 que los aislados en los pacientes control. Esto sugiere que los macrófagos son la principal fuente celular de MMP-1 y MMP-9 en la EPOC (Finlay, O'Driscoll et al. 1997). Los pacientes con EPOC también presentan un aumento en la expresión y en la actividad de MMP-2, MMP-9 en el parénquima pulmonar (Ohnishi, Takagi et al. 1998) y un incremento de la actividad gelatinolítica vinculado a MMP-2 y MMP-9 en su esputo (Cataldo, Munaut et al. 2000). En los fumadores con enfisema, los niveles de MMP-8 y MMP-9 en el BAL fueron significativamente mayores que en los fumadores sin enfisema, lo que implica que el daño a la red de colágeno del pulmón es una parte importante de la enfermedad (Demedts, Brusselle et al. 2005).

La MMP-12 juega un papel importante en la patogénesis del enfisema (Lagente, Manoury et al. 2005). Los macrófagos alveolares son la principal

fuelle de MMP-12 en el pulm3n (Molet, Belleguic et al. 2005). Demedts et al (Demedts, Morel-Montero et al. 2006) observaron un aumento en los niveles de MMP-12 y de su actividad enzimática en el esputo inducido de los pacientes con EPOC en comparaci3n con los fumadores sin enfermedad pulmonar obstructiva, ex fumadores y no fumadores.

Tabla 8. Resumen de las principales MMP implicadas en la EPOC.

Número	Nombre	Sustrato	Secreta
MMP-1	Colagenasa-1	Colágeno tipo I, II, III, VII,X. Gelatina, pro-MMP2 y pro-MMP-9	Células epiteliales bronquiales, pneumocitos tipo II y macrófagos alveolares
MMP-2	Gelatinasa-A	Colágeno tipol, II, III, IV, V, VII, X, XI, XIV. Gelatina, elastina y fibronectina	Células epiteliales bronquiales, macrófagos y por las células del músculo liso de las vías respiratorias
MMP-9	Gelatinasa-B	Colágeno tipo IV, V, X,XIV. Gelatina, elastina pro-MMP-13 y pro-MMP-9	Células epiteliales bronquiales, neutrófilos, eosinófilos, mastocitos y macrófagos alveolares
MMP-12	Metaloelastasa	Fibronectina, elastina, laminina, proteoglicanos fibrina/fibrinogeno	Macrófagos alveolar

MECANISMOS MOLECULARES DE LA INFLAMACIÓN

1- REGULADORES DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA

FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN

La EPOC se caracteriza por un incremento en la expresión de proteínas pro-inflamatorias como citoquinas, quimioquinas, factores de crecimiento, enzimas, receptores y moléculas de adhesión y por la reducción de mediadores anti-inflamatorios como la IL-10 (Caramori, Casolari et al. 2013).

Los cambios en la transcripción de genes son controlados por factores de transcripción, los cuales son proteínas que regulan y activan la respuesta transcripcional dependiente de ADN. Algunos factores de transcripción no sólo controlan genes homeostáticos sino que controlan la expresión de genes inflamatorios por lo que pueden desempeñar un papel importante en la patogenia de la EPOC (Barnes 2006).

Muchos factores de transcripción son comunes a todos los tipos de células inflamatorias, tales como AP-1 (proteína activadora-1) y NF- κ B (factor nuclear kappa B), y pueden jugar un papel general en la regulación de genes inflamatorios (Caramori, Casolari et al. 2013). NF- κ B es una familia de factores de transcripción que regula una gran variedad de genes que participan principalmente en la respuesta inmune e inflamatoria (Barnes 1997) y está compuesta por cinco miembros: NF- κ B p50 (p105/ NF- κ B1), NF- κ B p52 (p100/ NF- κ B2), p65 (RelA), RelB y c-Rel (Figura 7) (Xiao 2004).

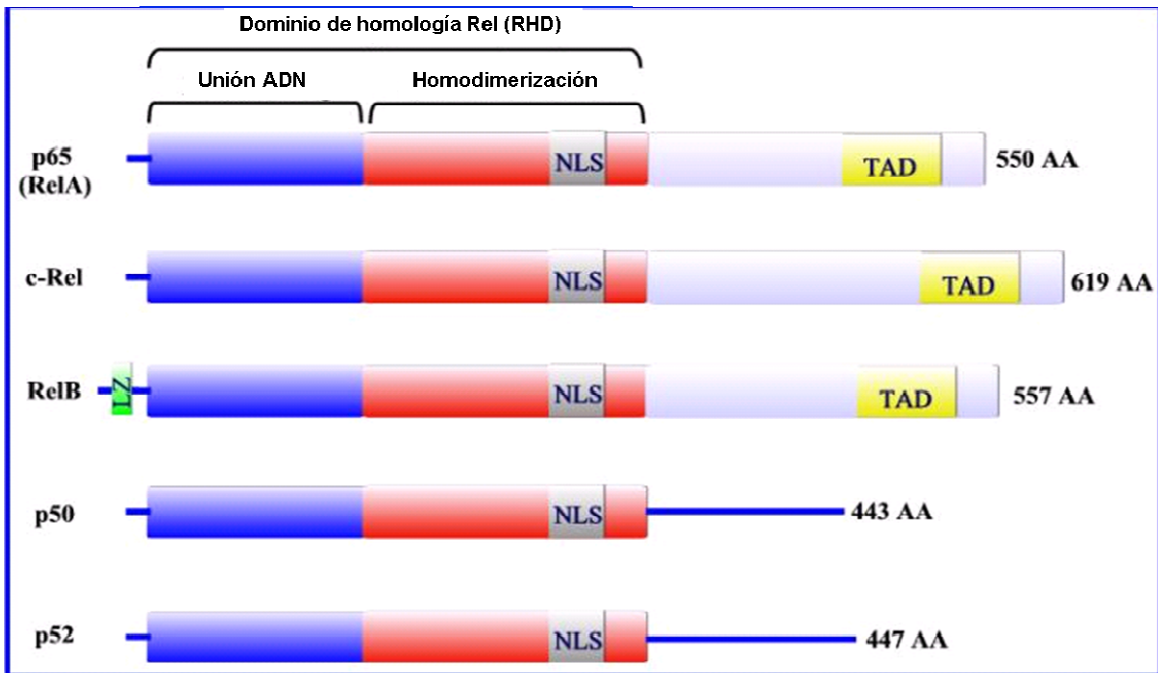


Fig. 7. Miembros de la familia NF- κ B (o Rel). Se caracteriza por tener un dominio N-terminal de aproximadamente ~300 aminoácidos bien conservado, un dominio de homología (Rel-homology domain, RHD), el cual incluye el sitio de unión al ADN y el dominio de dimerización, y la señal de localización nuclear (NLS). NF- κ B se presenta tanto en homodímeros como en heterodímeros. Tres miembros, p65, c-Rel y RelB, contienen el dominio de transactivación (TAD) dentro de la región C-terminal el cual es necesario para la activación de la actividad transcripcional. p50 y p52 son codificados como precursores (p105 y p100 respectivamente) (Xiao 2004)

Todos los miembros de la familia NF- κ B tienen un dominio de homología Rel que contiene la secuencia de localización nuclear (NLS) involucrada en la dimerización, el lugar de unión al ADN y a las proteínas inhibitorias I κ B las cuales enmascaran la señal de importación al núcleo. p65, RelB y c-Rel contiene uno o varios dominios de transactivación (TAD) en su región C-terminal mientras que p50 y p52 no lo tienen. p65:p50 es el heterodímero más frecuente de la familia de NF- κ B y por eso normalmente se le denomina simplemente NF- κ B. Se encuentra inactivo en el citoplasma mediante la unión del inhibidor I κ B a la región RHD interfiriendo así en la función del NLS que es la translocación de NF- κ B al núcleo (Hayden and Ghosh 2008). La familia de I κ Bs tiene como miembros: I κ B α , I κ B β , I κ B γ /p105 (precursor de p50), p100

(precursor de p52) e I κ B ϵ . Cada uno de estos miembros tiene en común una serie de repeticiones de anquirina las cuales interaccionan con la región de unión al ADN y a la señal de localización nuclear manteniendo el factor de transcripción como un complejo inactivo (Guttridge, Albanese et al. 1999).

Tabla 9. Estímulos que activan a NF- κ B

Citoquinas: IL-17, IL-1 β , TNF- α
Oxidantes: peróxido de hidrógeno, ozono
Virus: Rhinovirus, influenzae
Estímulos inmunos: Anticuerpo anti-CD3
Lipopolisacárido

Una vez que llega el estímulo adecuado (Tabla 9), el complejo I κ B quinasa fosforila las serinas 32 y 36 de I κ B α o las serinas 19 y 23 de I κ B β . La fosforilación de estas serinas hace que los inhibidores I κ B sean objeto de ubiquitinación y por tanto sean degradados por el complejo del proteosoma dejando al descubierto la señal de localización nuclear (Guttridge, Albanese et al. 1999) (Figura 8). Una vez llega al núcleo actúa sobre genes de citoquinas pro-inflamatorias, quimioquinas, enzimas que generan mediadores de inflamación y moléculas de adhesión que juegan un papel importante en el reclutamiento de leucocitos en los lugares de inflamación (Barnes and Karin 1997) (Tabla 10).

Tabla 10. Proteínas reguladas por NF- κ B

<p>Citoquinas pro-inflamatorias</p> <ul style="list-style-type: none">- TNF-α, IL-2, IL-6, IL-1β, factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos
<p>Quimioquinas</p> <ul style="list-style-type: none">- IL-8, GRO-α, -β, -γ, MIP-1α
<p>Enzimas inflamatorios</p> <ul style="list-style-type: none">- óxido nítrico sintasa inducible, 5-lipoxigenasa
<p>Moléculas de adhesión</p> <ul style="list-style-type: none">- E-selectina, molécula de adhesión intercelular
<p>Receptores</p> <ul style="list-style-type: none">- Receptor células T, Receptor de IL-2

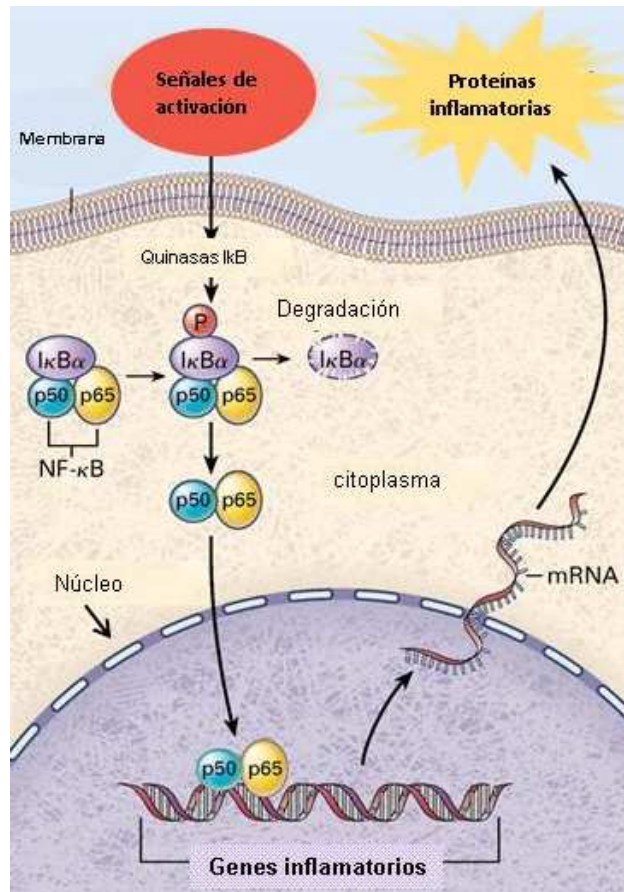


Fig. 8. Diagrama de activación de NF-κB. La activación de NF-κB implica la fosforilación y la subsecuente proteólisis de IκBα. El heterodímero formado por p50 y p65 pasa al núcleo donde se une a las regiones de activación de genes. Modificado de Barnes et al 1997

La activación de NF-κB conduce a un aumento de la expresión de muchos genes cuyos productos median en las respuestas inflamatorias e inmunes. Por ejemplo, la estimulación de la expresión de los genes para la E-selectina, la interleucina-8, y el factor de necrosis tumoral α (TNFα) da como resultado el reclutamiento y la activación de los neutrófilos. Además, productos de los genes que son regulados por NF-κB también causan la activación de NF-κB, por ejemplo las citoquinas pro-inflamatorias IL-1β y TNF- α se activan y activan a NF-κB. Este tipo de bucle regulador positivo puede amplificar y perpetuar respuestas inflamatorias locales (Barnes and Karin 1997) (Figura 9).

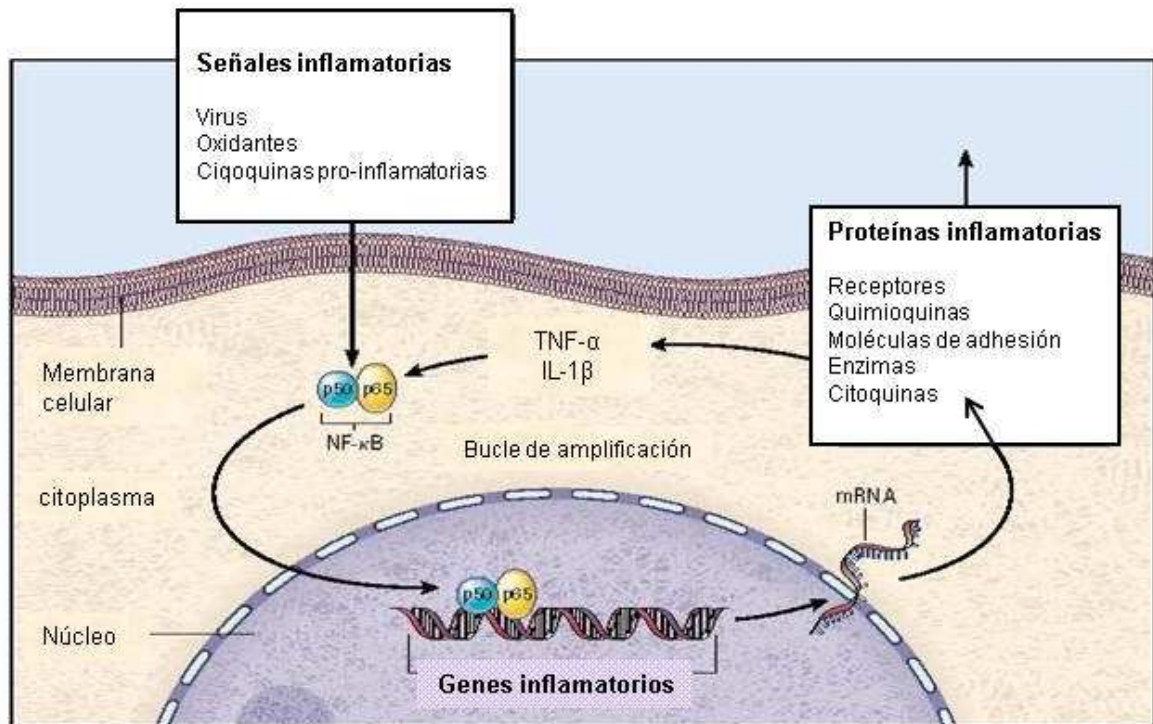


Fig. 9. Diagrama de NF-κB como mediador inflamatorio. NF-κB puede ser activado por una gran variedad de señales inflamatorias dando como resultado la expresión de proteínas inflamatorias como son el TNF-α e IL-1β que vuelven a activar a NF-κB. Modificado de Barnes et al 1997

La modulación de la respuesta inflamatoria en la EPOC por factores de transcripción puede ser, en parte la causa de los diferentes fenotipos de EPOC (Barnes 2006); sin embargo, es evidente que los pacientes con EPOC tienen inflamación la cual aumenta con la gravedad de la enfermedad (Hogg, Chu et al. 2004). Se ha observado que los pacientes con EPOC tienen incrementado la activación de NF-κB en los macrófagos aislados del esputo y del tejido pulmonar así como en las células epiteliales bronquiales (Di Stefano, Caramori et al. 2002, Caramori G 2003, Szulakowski, Crowther et al. 2006). El estado de activación de NF-κB y su represión por los glucocorticoides también puede verse afectado por la expresión de HDAC2 (Ito, Ito et al. 2005, Ito, Yamamura et al. 2006).

2- ACETILACIÓN DE HISTONAS Y TRANSCRIPCIÓN

El núcleo de las células eucariotas contiene una maquinaria bien organizada y regulada para el control de la transcripción de genes (Beckett 2001). La cromatina consiste en ADN, histonas y diferentes complejos de proteínas que asisten en los cambios dinámicos que ocurren durante la replicación del ADN, progresión del ciclo celular, regulación transcripcional y post-transcripcional y reparación del ADN (Verdone, Agricola et al. 2006).

Las histonas juegan un papel estructural y funcional en las funciones del núcleo. Los nucleosomas son las unidades estructurales básicas de la cromatina y están conservados en todos los eucariotas. El núcleo de los nucleosomas consta de dos copias de H2A, H2B, H3 e H4 alrededor del cual se envuelven 146 pares de bases de ADN (Verdone, Agricola et al. 2006). Las alteraciones en la estructura de la cromatina son fundamentales para la regulación de la expresión génica (Urnov and Wolffe 2001, Adcock, Ito et al. 2004). Cuando las células están en reposo, el ADN se enrolla alrededor del octámero de histonas haciendo que sea impenetrable para los grandes complejos de proteínas con la ARN polimerasa II. Esta conformación de la estructura de la cromatina se describe como cerrado, y se asocia con la supresión de la expresión génica. La transcripción de genes sólo se produce cuando la estructura de la cromatina se abre, se desenrolla el ADN y permite que la ARN polimerasa II y diversos complejos de transcripción se unan al ADN (Barnes, Adcock et al. 2005).

Cuando se activan los factores de transcripción pro-inflamatorios, como NF- κ B, se unen a secuencias específicas de reconocimiento en el ADN y posteriormente interactúan con moléculas coactivadoras grandes como la proteína de unión a CREB-(CBP), p300 y p300 / CBP-factor asociado (PCAF) (Figura 10). Estas moléculas coactivadoras actúan como los interruptores moleculares que controlan la transcripción de genes y todas tienen actividad intrínseca HAT (Roth, Denu et al. 2001).

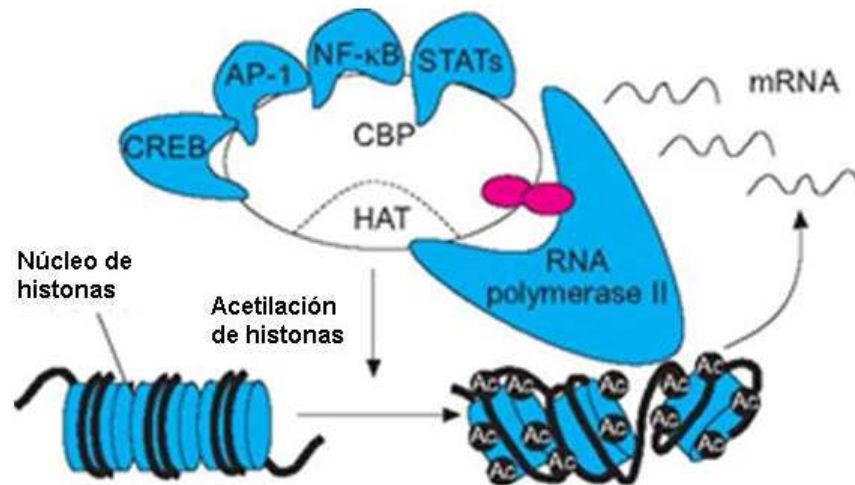


Fig. 10. Coactivadores, como la proteína de unión a CREB (CBP), tienen actividad histona acetiltransferasa (HAT) intrínseca, lo que resulta en la apertura de la cromatina y la unión de la ARN polimerasa II y el inicio de la transcripción del gen. Varios factores de transcripción interactúan con CBP, incluyendo AMP cíclico de respuesta a la proteína de unión (CREB), el factor nuclear (NF)- κ B, proteína activadora (AP)-1. Modificado de Barnes et al 2006

Cada núcleo de histonas tiene en su región N-terminal una secuencia rica en residuos de lisina que pueden ser acetilados. Cuando esto ocurre cambia la carga eléctrica de la histona y, por tanto, su estructura, pasando de la cromatina cerrada a una conformación abierta y por tanto activa (Adcock and Lee 2006). Esto permite la unión a la proteína de unión TATA-box (TATA box-binding protein, TBP), de los factores asociados a TBP y, por último, la ARN polimerasa II, que inicia la transcripción de genes. Este mecanismo molecular es probablemente común a todos los genes, incluyendo los implicados en la diferenciación, la proliferación y activación de las células (Barnes, Adcock et al. 2005).

Recientemente estos mecanismos fundamentales han sido aplicados al entendimiento de la regulación de los genes inflamatorios que son activados en las enfermedades respiratorias. En una línea epitelial humana, la activación de NF- κ B (inducida por la exposición de las células a señales inflamatorias como IL-1 β , el TNF- α o endotoxinas) resulta en la acetilación de residuos de lisina específicos de la histona H4 y esto se correlaciona con un incremento en la

expresión de genes inflamatorios como el factor estimulante de colonias granulocitos y macrófagos (Barnes, Adcock et al. 2005).

3- HISTONA DEACETILASA (HDAC)

Las HDAC juegan un papel importante en la supresión de la expresión génica mediante la inversión de la hiperacetilación del núcleo de histonas (Figura 11). En los mamíferos se reconocen 11 HDAC y se clasifican en dos clases principales (Tabla 11) (Barnes, Adcock et al. 2005). La clase I incluye HDAC1, 2, 3, 8 y 11 las cuales están ampliamente expresadas y se encuentran en los núcleos de la mayoría de tipos celulares. La clase II incluye HDAC 4, 5, 6, 7, 9 y 10 y parece ser que tienen una distribución más restrictiva y pueden estar involucradas en la diferenciación celular (Mroz, Noparlik et al. 2007) . La clase III deacetilan proteínas no histónicas como son α - tubulina, p53, p65 y MyoD. (Barnes, Adcock et al. 2005). Hay evidencias de que las diferentes HDACs tienen como diana a diferentes patrones de acetilación y por tanto regulan a diferentes genes (Peterson 2002). Las HDACs interactúan con moléculas de corepresión, esto ayuda a la represión de genes y puede ser la responsable de la especificidad de las HDACs para los genes (Mroz, Noparlik et al. 2007)

Además de las histonas, otros factores de transcripción, tales como GATA3 y el componente p65 de NF- κ B, son dianas para la acetilación y desacetilación, que de este modo modulan su actividad transcripcional. Por lo tanto, las HDAC también se asocian con p65 inactivo y juegan un papel en la regulación de la transcripción de genes mediada por NF- κ B sin alterar la unión al ADN (Ashburner, Westerheide et al. 2001, Zhong, May et al. 2002).

Tabla 11. Miembros de las familias de HDAC

Familias HDAC	Sustrato	Familias HDAC	Sustrato
Clase I		Clase III	
HDAC 1	H2A,2B,3,4,AR,ER,SHP,YY1	SIRT 1	Proteínas no histonas como tubulina, p65, 53
HDAC 2	H2A,2B,3,4,GR,YY1	SIRT 2	
HDAC 3	H2A,2B,3,4,GR,SHP,GATA1,YY1	SIRT 3	
HDAC 8	H2A,2B,3,4	SIRT 4	
		SIRT 5	
Clase II		SIRT 6	
HDAC 4	H2A,2B,3,4,GATA1	SIRT 7	
HDCA 5	H2A,2B,3,4,GATA1		
HDAC 6	H2A,2B,3,4,TUBULINA, SHP	Clase IV	
HDAC7	H2A,2B,3,4	HDAC 11	H2A/H2B/H3/H4
HDAC 9	H2A,2B,3,4		
HDAC 10	H2A,2B,3,4		

La proteína de unión CREB (CBP) acetila residuos de lisina específicos sobre p65, aumentando su unión al ADN y causando la activación transcripcional. HDAC revierte este proceso; las HDAC1 e HDAC2 son capaces de desacetilar el NF- κ B acetilado y así promover su asociación con el inhibidor I κ B- α dentro del núcleo, con el fin de favorecer la exportación al citoplasma y, por lo tanto, inhibir la actividad de NF- κ B (Chen, Fischle et al. 2001).

Se ha demostrado que la actividad HDAC está disminuida en los macrófagos alveolares de fumadores comparado con los no fumadores y esto está correlacionado con un incremento en la expresión de genes inflamatorios por parte de dichas células (Ito, Lim et al. 2001). También se ha observado una reducción de la actividad total de HDAC en biopsias bronquiales, de parénquima pulmonar y de macrófagos alveolares en pacientes con EPOC y esto se correlaciona con el grado de severidad de la enfermedad y con un incremento de la expresión de IL-8 (Barnes 2006). Hay una reducción selectiva en la expresión de HDAC 2, con una menor reducción para HDAC-3 e HDAC-5. En pacientes con EPOC, la reducción en la expresión de HDAC-2 puede

explicar la falta de sensibilidad de los corticoides como se ha descrito en la enfermedad (Barnes 2006).

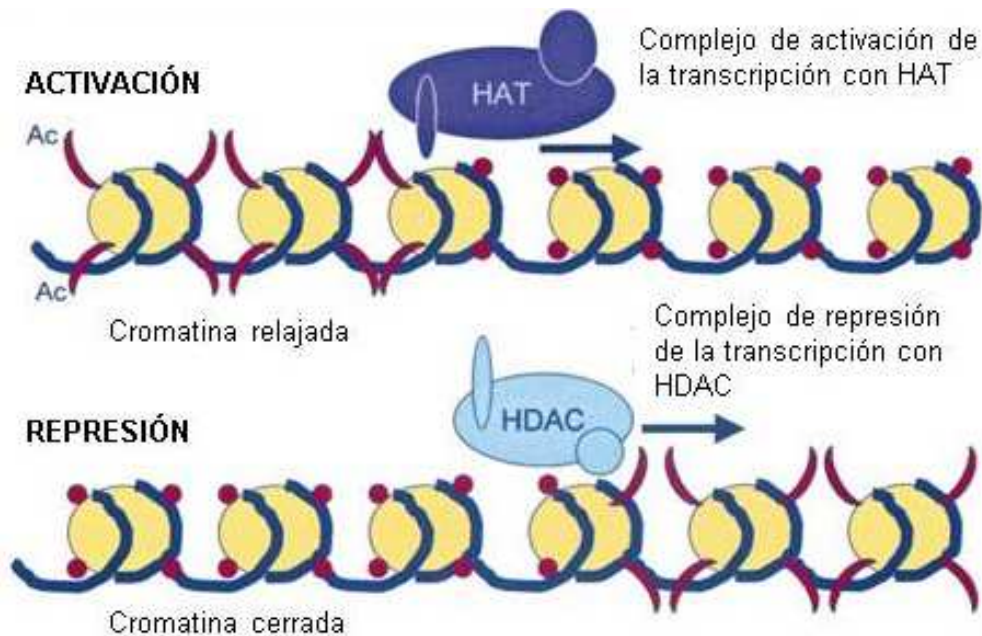


Fig.11. Activación y represión transcripcional de la cromatina. Los círculos amarillos representan el nucleosoma, las colas de las histonas acetiladas (rojo oscuro) se representan surgiendo desde el octámero. El círculo rojo oscuro representa una cola sin grupo acetilo (Ac). El ADN es de color púrpura, y la flecha representa el movimiento del complejo. Tanto histona acetiltransferasa (HAT; activación) y HDAC (represión) requieren varios cofactores para su actividad. (de Ruijter, van Gennip et al. 2003)

Tanto el estrés oxidativo como el peroxinitrito pueden reducir los niveles de las HDAC2 produciendo también una resistencia a los antiinflamatorios corticosteroides (Barnes 2004). Esto puede ser ya que se nitrifican residuos de tirosina de las HDAC2 que son críticos para el funcionamiento correcto de estas enzimas. Además el peroxinitrito activa las vías de las MAPK de las células epiteliales de las vías respiratorias produciéndose una apoptosis de dichas células, en particular a través de la activación de la vía ERK (Nabeyrat, Jones et al. 2003).

4- MODULACIÓN FARMACOLÓGICA DE LA INFLAMACIÓN

GLUCOCORTICOIDES

El principal efecto antiinflamatorio de los glucocorticoides (GC) se basa en la inhibición de la transcripción de numerosos genes que codifican para proteínas pro-inflamatorias entre las que se incluyen numerosas citoquinas como son la IL-1, 2, 3, 4, 5, 6, 11 y 13, el TNF- α , el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), quimioquinas, moléculas de adhesión y enzimas reguladoras de la síntesis de mediadores (Adcock 2003, Pelaia, Vatrella et al. 2003).

Además de la respuesta inmunitaria humoral, los GC tienen importantes efectos en la respuesta celular. Disminuyen la supervivencia de eosinófilos y reducen de forma significativa las células dendríticas (presentadoras de antígenos), lo cual contribuye al efecto antiinflamatorio que se observa en las enfermedades alérgicas. Los GC también inhiben la exudación de plasma y la secreción de la mucosa glandular, además de disminuir la presencia de otras células como los linfocitos o los basófilos, especialmente cuando se utilizan durante largos períodos o a dosis elevadas. Los GC también ejercen acciones sobre otros grupos celulares como son las células endoteliales (regulando la permeabilidad) y las epiteliales o glandulares (inhibiendo la secreción mucosa) (Barnes 1996, Holm, Godthelp et al. 1999).

Los GC difunden a través de la membrana celular y se unen a su receptor (GR). Una vez se ha unido, los GR se activan y se liberan de las chaperonas que mantenían la señal de localización nuclear oculta por lo que una vez activo el GR migra hacia el núcleo donde ejercerá su efecto molecular a través de la activación y supresión de varios genes implicados en el proceso inflamatorio (Cosio, Torrego et al. 2005, Barnes 2009). Los lugares de unión al ADN son secuencias palindrómicas de 15 pares de bases que se denominan “elementos de respuesta a los GC” (ERG) y están situados en la región 5' promotora de los genes diana. Sin embargo, pocos de los genes que son desactivados por los GC parecen tener ERGs negativos en sus secuencias promotoras, lo que sugiere que deben existir mecanismos inhibitorios menos directos. Un ejemplo

de ERG negativo sería el gen de la osteocalcina. Los GC inhiben la producción de osteocalcina mediante la unión del complejo de transcripción al ADN y por tanto no se produce RNA mensajero (Meyer, Carlstedt-Duke et al. 1997).

Existen evidencias de que el complejo GC-RG es capaz de actuar también regulando genes indirectamente a través de la síntesis de proteínas antiinflamatorias o, lo que es más importante, por mecanismos de transrepresión. Por ejemplo, inhibiendo directamente factores transcripcionales pro-inflamatorios como el factor nuclear kappa B (NF- κ B) o la proteína activadora 1 (AP-1), o reduciendo la estabilidad de enzimas relacionadas con la expresión genética y proliferación celular, así como participando en el reclutamiento y actividad de las enzimas histona HAT e HDAC, responsables de la configuración de la cromatin (Kagoshima, Ito et al. 2003, Ito, Chung et al. 2006) (Figura 12). Ito et al (Ito, Barnes et al. 2000, Ito, Jazrawi et al. 2001) demostraron que los GC inhiben la actividad HAT de la fracción p65 del NF- κ B y que el RG recluta HDAC2 para inhibir la acetilación de la histona H4 en las lisinas 8 y 12 inducida por IL-1 β . En consecuencia, todo ello da lugar a la deacetilación de las histonas nucleares, lo que modifica de nuevo la configuración de la cromatina haciendo que ésta se compacte alrededor de las histonas. Los GC ejercerían su acción antiinflamatoria por un doble mecanismo: inhibiendo la acetilación de las histonas mediada por los factores transcripcionales con actividad intrínseca HAT y reclutando HDAC a los sitios de transcripción (Cosio, Torrego et al. 2005).

Los GC también pueden realizar su efecto inhibitorio sobre la inflamación incrementando la síntesis de proteínas antiinflamatorias, como la lipocortina 1, la SLPI (*serum leukoprotease inhibitor*), IL-10 o el antagonista de los receptores de IL-1. Este efecto está mediado vía ERG en las regiones promotoras de estos genes (Barnes 1998). El RG también puede incrementar la transcripción de genes mediante la unión a factores coactivadores como la CBP, que actúa como puente para la activación de la ARN polimerasa II, y dar lugar así a la formación de ARN mensajero. Esta unión entre un RG activado y CBP también origina una mayor acetilación de las histonas nucleares, lo cual es esencial para la activación de la ARN polimerasa II. Por ejemplo, concentraciones

elevadas de GC aumentan la secreción de SLPI en células epiteliales (Ito, Barnes et al. 2000). Los GC también han sido implicados en el incremento de I κ B α (inhibidor de NF- κ B), que puede inducir una inhibición del NF- κ B en los linfocitos (Scheinman, Cogswell et al. 1995), aunque esto no se ha demostrado en otras líneas celulares (Brostjan, Anrather et al. 1996).

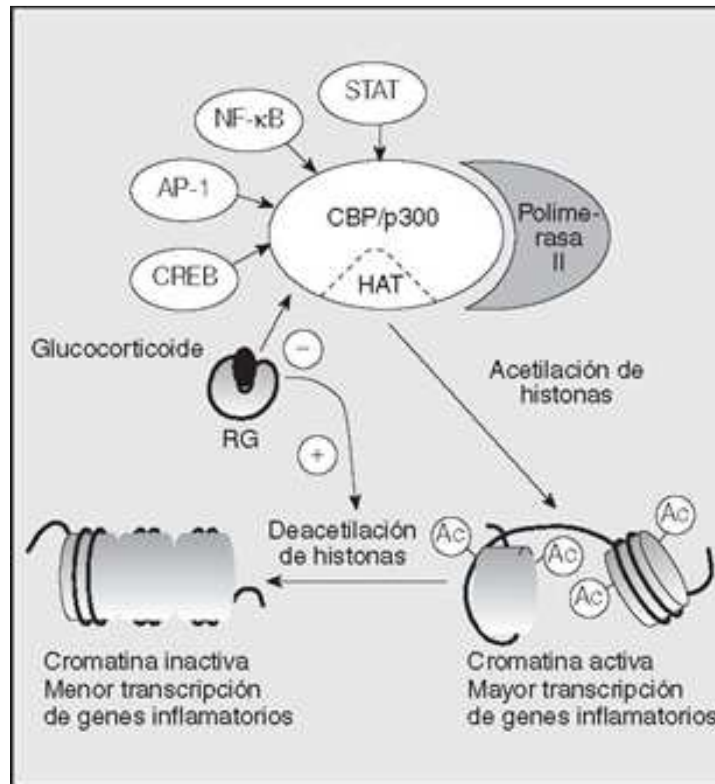


Fig.12. Efecto de los glucocorticoides sobre la estructura de la cromatina. Los factores de transcripción como las STAT (*signal transducer and activator of transcription*), factor proteína activadora 1 (AP-1) y factor nuclear kappa B (NF- κ B) se unen a moléculas coactivadoras, como la proteína de fijación CREB (CBP) o p300, las cuales tienen actividad intrínseca de histona acetiltransferasa (HAT), lo que origina la acetilación de los residuos de histonas. Esto produce que la cromatina se despliegue, lo cual permite a los factores de transcripción unirse a la cromatina y que se produzca la transcripción de genes inflamatorios. Tras la activación por los glucocorticoides, el receptor de glucocorticoides (RG) también se une al CBP inhibiendo su actividad HAT y recluta histona deacetilasas, que aumenta el repliegue del ADN en torno a las histonas, de modo que resulta inaccesible a los factores de transcripción, lo que inhibe la transcripción (Cosio, Torrego et al. 2005).

RESISTENCIA A GLUCOCORTICOIDES EN LA EPOC

Aunque los GC son altamente efectivos en el control del asma y otras enfermedades inflamatorias crónicas existe una pequeña proporción de pacientes asmáticos que no responden incluso a altas dosis de GC orales (Adcock and Lane 2003). Del mismo modo, los pacientes con EPOC son en gran parte insensibles a los GC (Barnes 2000). Hay evidencias de un mecanismo de resistencia a los GC en la EPOC, ya que los GC no logran inhibir citoquinas (tales como IL-8 y TNF- α) que normalmente suprimen (Keatings, Jatakanon et al. 1997, Culpitt, Maziak et al. 1999). En pacientes con EPOC los corticosteroides son ineficaces para suprimir la inflamación (Keatings VM 1997). In vitro la liberación de IL-8, TNF- α y de la MMP-9 por los macrófagos de sujetos normales y fumadores sin EPOC es inhibida por los corticoides, mientras que son ineficaces en los macrófagos de los pacientes con EPOC (Culpitt, Rogers et al. 2003). Las razones de esta resistencia puede ser debida a la reducción de la actividad de la histona deacetilasa (HDAC) (Ito, Lim et al. 2001). La reducción de la actividad de la HDAC en los macrófagos se correlaciona con el aumento de la secreción de citoquinas como el TNF- α y la IL-8. La reducción de la actividad de la HDAC puede estar mediada por el estrés oxidativo o por la formación del peroxinitrito (Ito, Barnes et al. 2000) (Figura 13).

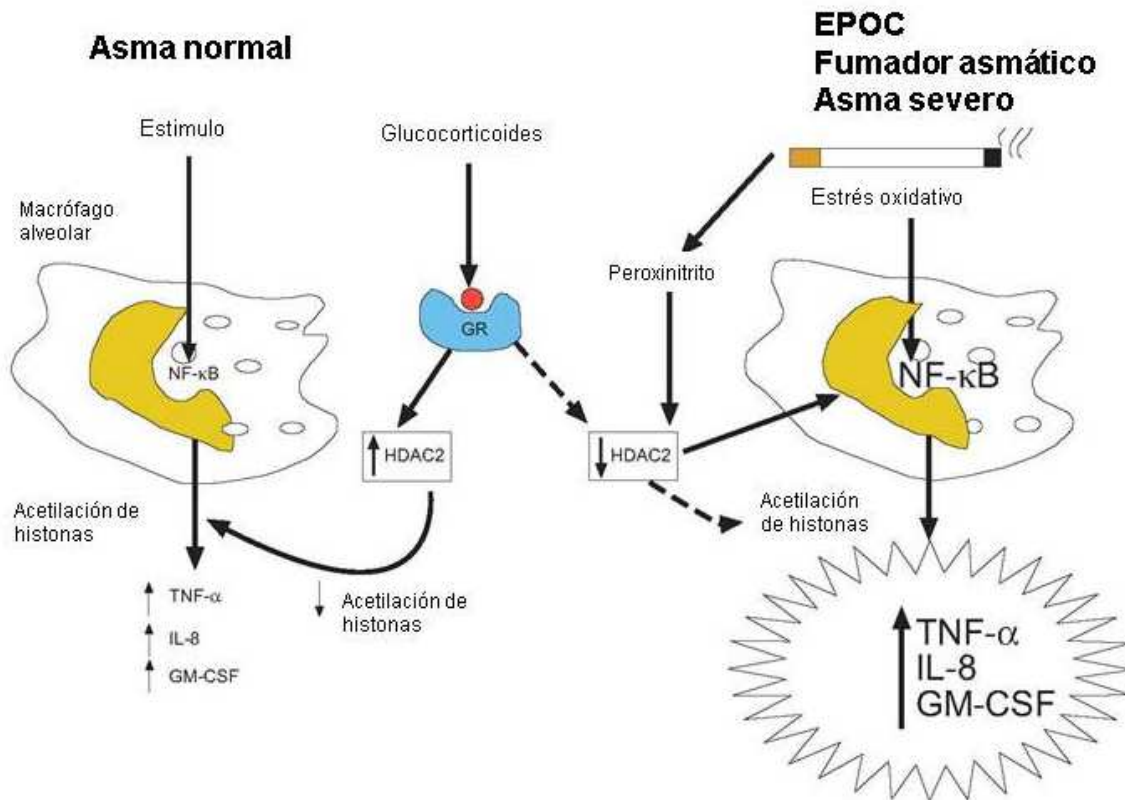


Fig.13. Mecanismo propuesto de la resistencia de corticosteroides en EPOC, asma severa y fumador asmático. La estimulación de los macrófagos alveolares normales y asmáticos activa NF-κB y otros factores de transcripción que activan a las HAT, se acetilan las histonas y, con ello se activa la transcripción de genes que codifican proteínas inflamatorias TNF-α, IL-8 y GM-CSF. Los corticosteroides invierten todo este proceso mediante la unión a receptores de glucocorticoides (RG) y la activación de HDAC-2. En la EPOC y los pacientes asmáticos fumadores, el humo del cigarrillo genera estrés oxidativo (actuando a través de la formación de peroxinitrito) disminuyendo la actividad de HDAC2. Esto amplifica la respuesta inflamatoria por la activación de NF-κB, sino que también reduce el efecto antiinflamatorio de los corticosteroides, ya que HDAC2 es ahora incapaz de revertir la acetilación de histonas. ↑ incremento ↓disminución. (Barnes, Ito et al. 2004)

TEOFILINA

La teofilina es uno de los fármacos más recetados para el tratamiento del asma y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) en todo el mundo, tanto por sus efectos broncodilatadores como por su precio. Se extrajo primero del té y se empezó a sintetizar químicamente en 1895. Al principio se usaba como diurético y no fue hasta 1922 que se empezó a utilizar como tratamiento clínico

para el asma por su propiedad broncodilatadora. A pesar de su uso generalizado, en los países industrializados la teofilina se ha convertido en un tratamiento de tercera línea debido a que los agonistas β_2 inhalados son mucho más efectivos como broncodilatadores (Barnes 2013).

Los principales efectos farmacológicos de la teofilina son: inhibición de la fosfodiesterasa, activación de la histona desacetilasa y antagonismo de los receptores de la adenosina (Morfín Maciel and Castillo Morfín 2010) (Tabla 12).

Tabla 12. Mecanismos de acción de la teofilina

<ul style="list-style-type: none">- Inhibición no selectiva de la fosfodiesterasa- Aumento intracelular del monofosfato de adenosina cíclico y del monofosfato de guanosina cíclico- Antagonismo en el receptor de adenosina- Incremento en la liberación de IL-10- Estimulación de la liberación de catecolaminas- Inhibición de mediadores proinflamatorios como TNF-α- Inhibición de la liberación de calcio intracelular- Disminución en la translocación del factor nuclear NF-κB- Incremento de actividad de histona desacetilasa- Inhibición del fosfoinositol-3-cinasa- Incremento de la apoptosis
--

Por un lado, el factor nuclear κ B se encuentra en el citoplasma y forma un complejo inactivo con la proteína inhibitoria I- κ B α , la cual debe ser fosforilada para disociarse (Driessler, Venstrom et al. 2004). La teofilina, al incrementar la IL-10, inhibe la degradación de la I- κ B α , lo que impide la translocación del

factor nuclear κB al núcleo; de esta manera, se bloquea la transcripción de genes inflamatorios en el asma y en la EPOC (Barnes 2013) (Figura 14)

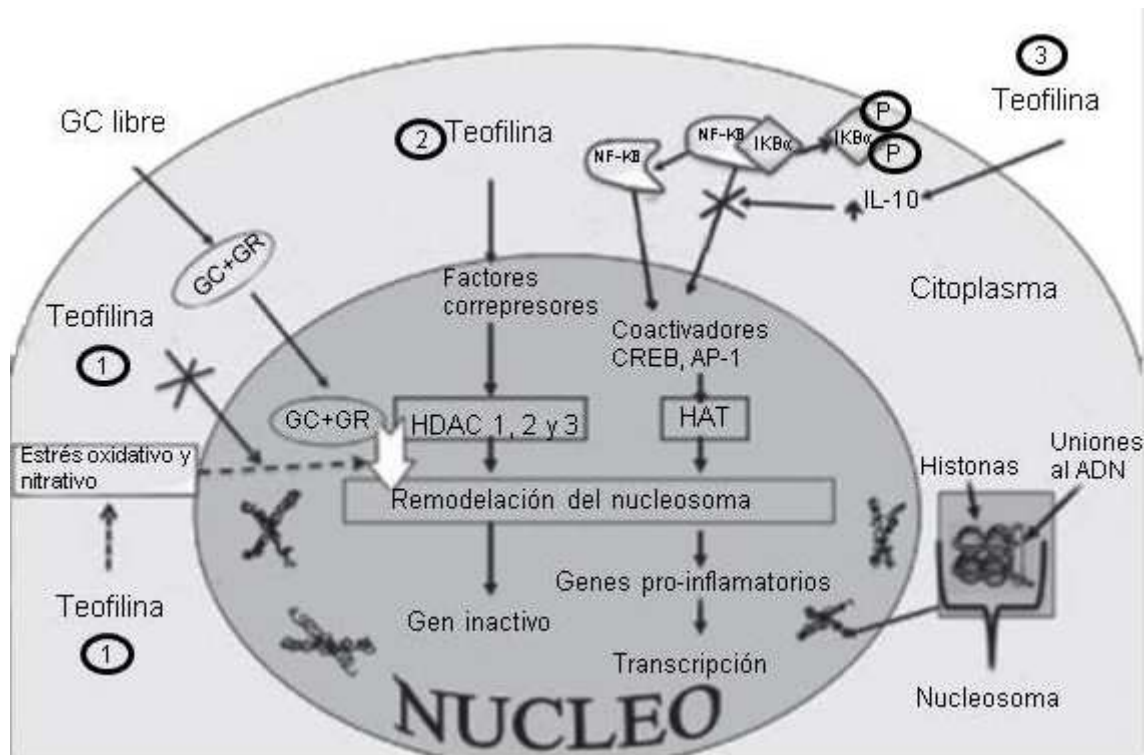


Fig.14. Efectos inhibitorios que ejerce la teofilina en la translocación y transcripción de citoquinas pro-inflamatorias: 1) al inhibir la fosfodiesterasa reduce el estrés oxidativo y revierte la reducción de la HDAC-2, originada por el estrés oxidativo y nitrativo. 2) Incrementa la HDAC, 3) Al incrementar la IL-10 impide la traslocación del factor nuclear κB al núcleo.

GC: glucocorticoesteroide; GR: receptor de corticosteroides; HDAC: histona desacetilasa; HAT: histona acetiltransferasa; AP-1 proteína activadora 1; CREB: proteína de unión al elemento de respuesta del monofosfato de adenosina cíclico (AMPC); NF- κ B factor nuclear; I- κ Ba: proteína inhibidora de la translocación del NF- κ B. (Modificado de Morfín Maciel and Castillo Morfín (2010))

La teofilina a dosis más bajas de las utilizadas para conseguir sus efectos broncodilatadores favorece la acción de los GC al activar la HDAC, y a través de la inhibición de la fosfodiesterasa (PDE) inhibe la producción de radicales libres de oxígeno (Ito, Lim et al. 2001, Chorostowska-Wynimko, Kus et al. 2007); ambas acciones revierten la sensibilidad a GC del asma severa y de la EPOC (Fischle, Kiermer et al. 2001, Chorostowska-Wynimko, Kus et al. 2007, Barnes 2013) (Figura 14).

En los pacientes con EPOC, la teofilina reduce la proporción de neutrófilos en el esputo inducido y reduce la concentración de CXCL8, lo que sugiere un efecto antiinflamatorio diferente al de los GC (Culpitt, de Matos et al. 2002, Kobayashi, Nasuhara et al. 2004). A altas concentraciones, la teofilina inhibe la proliferación los linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ e inhibe la respuesta quimiotáctica de linfocitos T, efectos que están mediados a través de la inhibición de la PDE (Hidi, Timmermans et al. 2000).

EXACERBACIONES DE LA EPOC

Las exacerbaciones o agudizaciones de la EPOC suponen una carga para el sistema de salud de cualquier país. En España se estima que generan entre un 10 y un 12% de las visitas a atención primaria, entre 1-2% de todas las visitas a urgencias y alrededor del 10% de los ingresos hospitalarios. Todo esto conlleva un gasto importante; casi el 60% del coste de la EPOC lo generan dichas agudizaciones. Las exacerbaciones tienen un impacto sobre el paciente muy importante ya que deterioran su calidad de vida, contribuyen al deterioro de la función pulmonar, y empeoran el pronóstico de dicha enfermedad (Calle Rubio, Chacón et al. 2010).

DEFINICIÓN

Tradicionalmente se han definido las exacerbaciones de la EPOC (EEPOC) siguiendo los criterios que Anthonisen describió en un ensayo clínico dirigido a evaluar el papel de los antibióticos durante la agudización y que incluían cambios en la disnea, volumen y purulencia del esputo, y tos (Anthonisen, Manfreda et al. 1987). Actualmente la definición de EEPOC más aceptada la describe como un evento en el curso natural de la enfermedad, caracterizado por un cambio, más allá de la variabilidad diaria, en la disnea, tos y/o expectoración del paciente, de instauración aguda y que puede requerir un cambio en la medicación habitual. El inconveniente de esta definición es que es poco precisa ya que se basa fundamentalmente en cambios de síntomas que pueden ser secundarios de otras patologías como es la insuficiencia cardíaca, arritmias o tromboembolismo pulmonar (Rodríguez-Roisin 2000, MacNee 2003, Rabe, Hurd et al. 2007).

ETIOLOGÍA

La etiología de las EEPOC es heterogénea. Entre un 50-70% se pueden atribuir a infecciones respiratorias ya sean virus o bacterias (Miravittles 2007). En menor proporción tenemos la polución y las bajas temperaturas y en un número importante de agudizaciones, podría llegar al 30%, no se detecta ningún factor desencadenante (Cosio 2008). Los agentes etiológicos más frecuentemente implicados en las EEPOC se muestran en la tabla 13.

Tabla 13. Causas de las agudizaciones de la EPOC. Modificado de Celli et al

AGENTE INFECCIOSO	COMÚN	MENOS COMÚN
Bacterias	<i>Haemophilus influenzae</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Moraxella catarrhalis</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomona aeuroginosa</i> : en pacientes con exacerbaciones frecuentes o graves
Virus	<i>Rhinovirus</i> Virus respiratorio sincitial	Virus de la gripe <i>Virus parainfluenza</i> <i>Coronavirus</i> <i>Adenovirus</i>
Organismos atípicos		<i>Mycoplasma pneumoniae</i> <i>Chlamidia pneumoniae</i>
No infecciosos	Polución Cambios de temperatura	Fallo cardiaco congestivo Embolia pulmonar

Infecciones bacterianas

Entre un 30-50% de pacientes con EPOC estable están colonizados por bacterias (Monso, Ruiz et al. 1995, Rosell, Monso et al. 2005). La colonización bacteriana actúa como factor de riesgo para sufrir agudizaciones y se ha relacionado con la frecuencia y la gravedad de estas (Calle Rubio, Chacón et al. 2010).

La infección por *H influenzae*, *P aeruginosa* y *S pneumoniae* estimulan la secreción de moco, y los dos primeros organismos pueden inhibir la frecuencia de batido de los cilios (Adler, Hendley et al. 1986, Read, Wilson et al. 1991). Además *H influenzae* puede causar un daño directo al epitelio pulmonar y algunas de sus toxinas producen un incremento de citoquinas pro-inflamatorias (IL-6, IL-8 y TNF- α) por parte de los macrófagos alveolares, provocando la migración de neutrófilos hacia el pulmón (Khair, Devalia et al. 1994). Este fenómeno inflamatorio conduce al fracaso del aclaramiento mucociliar permitiendo que la infección bacteriana persista y que la respuesta inflamatoria se cronifique (Balbi, Bason et al. 1997), dando lugar a la colonización del árbol respiratorio.

Los microorganismos atípicos como el *Mycoplasma pneumoniae* y la *Chlamidia pneumoniae* se han visto implicados también en las exacerbaciones de la EPOC, aunque la evidencia de su papel es algo conflictiva ya que estos microorganismos podrían interactuar con las bacterias y los virus. El mecanismo por el que causan las agudizaciones es similar al causado por las infecciones víricas (White, Gompertz et al. 2003).

Infecciones víricas

Los virus podrían ser los responsables del 30 % de las exacerbaciones de la EPOC y son más frecuentes en los meses de frío, cuando las infecciones respiratorias por virus son más comunes (Seemungal, Harper-Owen et al. 2001, Wedzicha and Seemungal 2007). Las agudizaciones por virus respiratorios son más graves y están asociadas con un tiempo de recuperación

más largo que las causadas por otros factores (Seemungal, Harper-Owen et al. 2000, Hurst, Donaldson et al. 2005).

Los virus más comunes que se aíslan en estos pacientes son *Rhinovirus* (es el más frecuente en las agudizaciones) y otros virus como *Coronavirus*, *Virus Respiratorio Sincitial*, *Influenza* y *Parainfluenza* y *Adenovirus* (Wedzicha and Seemungal 2007). Más del 60% de las agudizaciones se asocian a síntomas de resfriado común y al menos un virus es detectado por PCR en el 64% de las agudizaciones. Estos pacientes tienen una frecuencia de exacerbación mayor que los pacientes donde no se detectan virus (Seemungal, Donaldson et al. 2000, Seemungal, Harper-Owen et al. 2001).

Los pacientes de EPOC con antecedentes de agudizaciones reiteradas son más susceptibles a las infecciones respiratorias por virus (Celli and Barnes 2007). Al igual que las bacterias, los virus pueden producir un daño directo o indirecto en las vías respiratorias. Es posible que la regulación positiva de la molécula intercelular de adhesión -1 (ICAM-1), el cual actúa como receptor para el *Rhinovirus*, en las células epiteliales sea importante (efecto indirecto). Además los *Rhinovirus* se asilan con más facilidad en esputo que en muestras de las vías respiratorias superiores, lo que indica que estos virus infectan directamente el tracto respiratorio inferior (Papi and Johnston 1999). De forma directa los virus pueden producir una alteración en el aclaramiento mucociliar mediante el aumento de la exudación de plasma, pérdida del epitelio ciliar y un incremento en la producción de moco. Por otro lado, a través de los receptores muscarínicos pueden provocar broncoconstricción en el árbol bronquial distal (Cosio 2008).

Tanto en las exacerbaciones causadas por virus como por bacterias se observa un aumento del número de los neutrófilos en el esputo, y también un aumento en el número de eosinófilos, lo que sugiere que hay diferentes mediadores inflamatorios involucrados (Papi, Bellettato et al. 2006).

Hay un reconocimiento creciente de la coexistencia de infección bacteriana y vírica en muchos pacientes con EEPOC. Aproximadamente el 25% de los pacientes que ingresan por una agudización en los hospitales están

coinfectedos con bacterias y virus. Estos pacientes tienen agudizaciones más graves (medido por el tiempo de hospitalización) (Papi, Bellettato et al. 2006). En un estudio reciente, el 70% de las exacerbaciones se asociaron con infección por *H. influenzae* y aquellos pacientes que tenían una infección concomitante por *Rhinovirus* (detectado por PCR) tenía una mayor caída de FEV₁, un aumento de la interleuquina 6 en suero y de CXCL8 en esputo (Wilkinson, Hurst et al. 2006). Esto sugiere que los pacientes co-infectados con un virus y por bacterias pueden tener exacerbaciones más graves (Celli and Barnes 2007).

Polución

Un estudio realizado en seis ciudades europeas sobre la contaminación del aire demostró que un incremento de 50µg/m³ en el nivel de contaminación diario suponía un riesgo de hospitalización para los pacientes con EPOC (Anderson, Spix et al. 1997). Estudios epidemiológicos han demostrado que un aumento de los niveles atmosféricos de dióxido de azufre, ozono, dióxido de nitrógeno y de partículas menores de 10 micras (PPM10) se asocian con un aumento de los ingresos hospitalarios por exacerbaciones de la EPOC (Anderson, Spix et al. 1997). Estas partículas *in vitro* inducen estrés oxidativo lo que conduce a la activación de NF-κB, la acetilación de histonas y el aumento de expresión de CXCL8 (Gilmour, Rahman et al. 2003).

Cambios de temperatura ambiente

Los cambios de temperatura también pueden tener relación con las agudizaciones de EPOC. Bajas temperaturas en los dormitorios y en el aire exterior se han asociado a un empeoramiento de la función pulmonar de los pacientes con EPOC y un aumento de la frecuencia de las agudizaciones (Donaldson, Seemungal et al. 1999).

Los mecanismos todavía no están claros pero podrían referirse en parte a una mayor susceptibilidad a las infecciones por virus del tracto respiratorio superior en climas fríos (Celli and Barnes 2007).

FISIOPATOLOGÍA DE LA EEPOC

Inflamación en las agudizaciones de la EPOC

En el estado estable el paciente con EPOC se caracteriza por una variedad de grados de inflamación que afecta a las vías respiratorias así como a los alveolos, resultando en una hipersecreción de moco, cierre de las vías respiratorias y una destrucción de los alveolos. Los principales mediadores responsables de este daño son proteasas producidas por células inflamatorias, particularmente los neutrófilos, que se encuentran en un gran número en las secreciones bronquiales de pacientes con EPOC (Di Stefano A 1998). Los neutrófilos son reclutados del torrente sanguíneo en respuesta a quimioatrayentes como son la IL-8 y LTB4 así como por la expresión de ICAM-1 por parte del endotelio vascular (White, Gompertz et al. 2003). La degranulación de los neutrófilos produce una liberación de elastasa y de otras proteasas que son las causantes del daño tisular así como también lo es la mieloperoxidasa (Stockley 1996).

Con este fondo de inflamación moderada es probable que los procesos de agudización sean episodios donde este proceso inflamatorio está aumentado ya sea por la infección bacteriana, vírica o causada por estímulos no infecciosos como es la polución (White, Gompertz et al. 2003, Celli and Barnes 2007) (Figura 15-16).

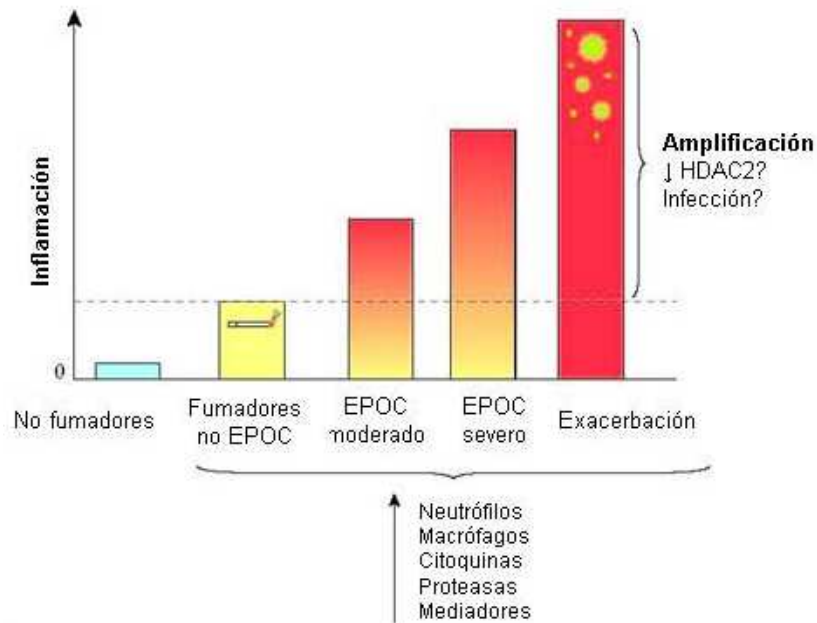


Fig 15. La amplificación de la inflamación pulmonar en la EPOC. Los fumadores no EPOC tienen una respuesta inflamatoria leve, que representa la reacción normal de la mucosa respiratoria a agentes irritantes inhalados. En la EPOC esta misma respuesta inflamatoria está marcadamente amplificada, y ese aumento incrementa a medida que la enfermedad progresa. La inflamación es aún mayor durante las exacerbaciones. Los mecanismos moleculares de esta amplificación actualmente se desconocen, pero pueden ser determinadas por factores genéticos o por infecciones latentes. (Barnes 2009)

En las agudizaciones hay un incremento del número de neutrófilos representado por el cambio de color del esputo y de citoquinas como TNF- α e IL-8. También hay un incremento de CCL5, el cual atrae a las células T y a los eosinófilos y de CXCL5, el cual atrae a los neutrófilos. La IL-6 está incrementada en el suero y en el esputo de los pacientes agudizados (Hill, Bayley et al. 1999, Aaron, Angel et al. 2001) (Figura 17).

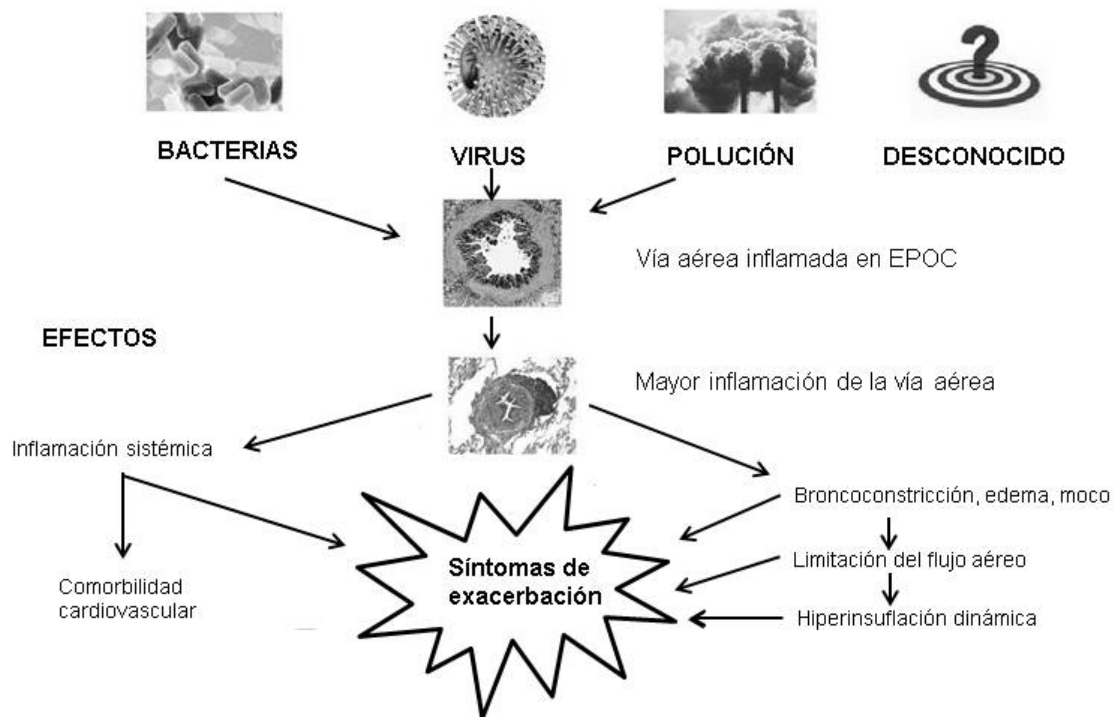


Fig.16. Los factores desencadenantes actúan sobre las vías aéreas previamente inflamadas desencadenando un grado de inflamación mayor, tanto a nivel local como a nivel sistémico dando lugar a los síntomas de exacerbación. (Cosio 2008)

Estos mediadores están regulados por NF- κ B y hay evidencias de su activación en macrófagos de pacientes agudizados (Caramori G 2003). Las agudizaciones causadas por virus y por bacterias pueden activar NF- κ B a través de los receptores Toll like (TLR) los cuales reconocen la superficie de los patógenos (Chaudhuri, Dower et al. 2005). Por ejemplo *H. influenzae* activa NF- κ B sinérgicamente con TNF- α ya que activan al enzima inhibidor quinasa 2 de NF- κ B (IKK2) y activan la vía de MAPK (p38 mitogen-activated protein kinase) (Watanabe, Jono et al. 2004) Además hay un incremento de leucotrieno B₄ (quimioatrayente para neutrófilos y activador de los linfocitos T) en el exhalado y en el esputo (Crooks, Bayley et al. 2000, Biernacki, Kharitonov et al. 2003).

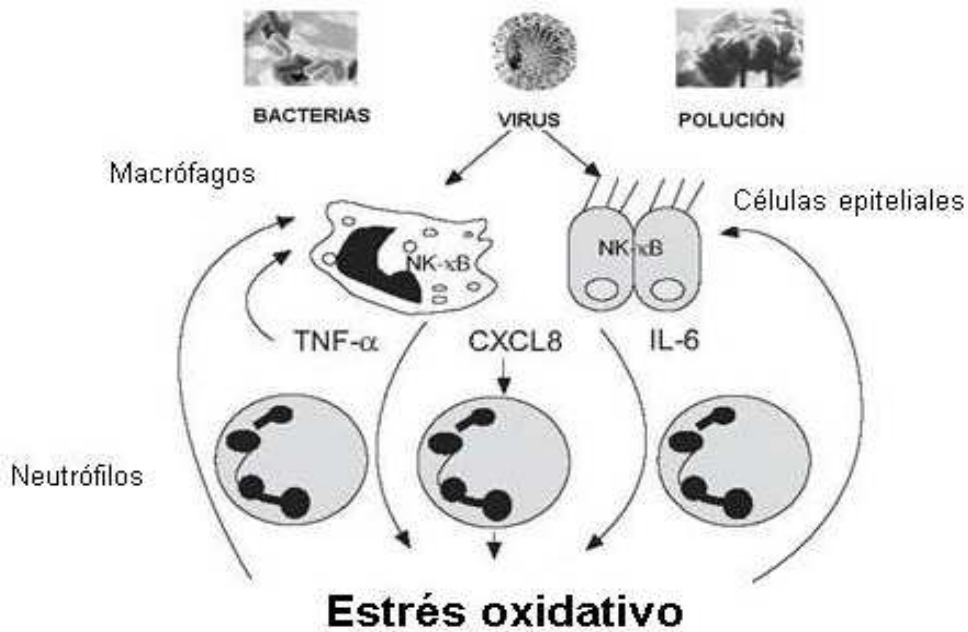


Fig.17. Mecanismos patogénicos de la EPOC. Las bacterias, virus y otros factores pueden activar el factor nuclear factor de transcripción (NF) -κB en las células epiteliales de las vías respiratorias y los macrófagos, que liberan citoquinas inflamatorias CXCL8 (IL-8), que a su vez atrae neutrófilos, factor de necrosis tumoral (TNF) -α e IL-6, los cuales amplifican la inflamación. El aumento del número de neutrófilos genera estrés oxidativo, amplificándose aún más el proceso inflamatorio. Modificado de Celli et al 2007

La exposición a las partículas y a los compuestos orgánicos que puede haber en la contaminación causan citotoxicidad, junto con daño en los macrófagos y en las células epiteliales bronquiales con un incremento del estrés oxidativo por producción de especies reactivas de oxígeno (Roca, Verduri et al. 2013). Una evidencia de que el estrés oxidativo aumenta es el incremento de 8-isoprostano y de peróxido de hidrógeno que persiste durante varias semanas (Dekhuijzen, Aben et al. 1996, Gerritsen, Asin et al. 2005). El estrés nitrosativo también está aumentado en las agudizaciones, como se demuestra por el óxido nítrico exhalado que está elevado durante estos periodos (Agusti, Villaverde et al. 1999, Bhowmik, Seemungal et al. 2005). El aumento prolongado en las exacerbaciones puede reflejar el mantenimiento de la inflamación a través de

una interacción entre el estrés oxidativo y la activación de NF-κB, y el establecimiento de bucles de amplificación (Celli and Barnes 2007).

A pesar de la evidencia de una sobrecarga inflamatoria, los mecanismos moleculares en las EEPOC no han sido analizados. El papel de la regulación de la transcripción inflamatoria mediante la alteración de la acetilación de histonas nucleares no ha sido estudiado durante las exacerbaciones de la EPOC.

PREVENCIÓN

Cualquier terapia que prevenga las exacerbaciones tendrá importantes beneficios económicos y además mejorará el estado de salud del paciente (Wedzicha and Donaldson 2003). Se han propuesto muchas modalidades, tanto farmacológicas como no farmacológicas, para prevenir las exacerbaciones (Tabla 14) (Qureshi, Sharafkhaneh et al. 2014).

Tabla14. Tratamientos para prevenir las agudizaciones. Modificado de Mackay et all 2013.

FARMACOLÓGICOS	NO FARMACOLÓGICOS
<ul style="list-style-type: none">- Corticoides inhalados- Broncodilatadores- Inhibidores de la fosfodiesterasa- Teofilina- Antibióticos- Mucolíticos / antioxidantes	<ul style="list-style-type: none">- Dejar de fumar- Vacunas- Rehabilitación pulmonar- Programas de educación al paciente

Dejar de fumar es la intervención con la mayor capacidad de influir en la historia natural de la EPOC. Un estudio realizado entre 23.497 veteranos en los Estados Unidos de América demostró que dejar de fumar se asocia con un menor riesgo de exacerbaciones de la EPOC y la magnitud de la reducción del riesgo depende de la duración de la abstinencia (Au, Bryson et al. 2009).

Como las infecciones del tracto respiratorio superior son una causa de exacerbación se recomienda el uso de vacunas antigripales y antineumocócicas para todos los pacientes con EPOC (Nichol, Baken et al. 1999, Nichol, Baken et al. 1999). Un estudio sobre el resultado de la vacunación antigripal con una cohorte de pacientes ancianos con enfermedad pulmonar crónica encontró que la vacunación de la gripe se asocia con beneficios significativos para la salud, con un menor número de visitas de pacientes a urgencias, menos hospitalizaciones, y redujo mortalidad (Nichol, Baken et al. 1999). Un enfoque alternativo para la prevención de las exacerbaciones infecciosas de la EPOC es el uso de antibióticos de manera profiláctica. Entre las clases de antibióticos, los macrólidos (como eritromicina, azitromicina y claritromicina) son especialmente atractivos como antibióticos profilácticos en la EPOC. Además de sus efectos directos como antibacterianos, también han demostrado tener efectos antiinflamatorios e inmunomoduladores (Qureshi, Sharafkhaneh et al. 2014). Kobayashi et al demostraron que los macrólidos pueden restaurar la respuesta a corticoides potenciando la actividad HDAC (Kobayashi, Wada et al. 2013). En su estudio Albert et al demostraron que el uso diario de azitromicina disminuía el tiempo el tiempo medio de la primera exacerbación además de la frecuencia de éstas (Albert, Connett et al. 2011).

Los corticoides inhalados, en combinación con un beta-agonista de acción prolongada (LABA) reducen significativamente las agudizaciones en pacientes con EPOC moderada y grave (estudio TORCH) (Calverley, Anderson et al. 2007). En estudios previos de esteroides inhalados a largo plazo en enfermedades pulmonares obstructivas (ISOLDE) realizado en pacientes con EPOC moderada a grave, ya se observaba una reducción de la frecuencia de las exacerbaciones de alrededor del 25% (Burge, Calverley et al. 2000).

TRATAMIENTO

El tratamiento estándar para las exacerbaciones agudas de la EPOC incluye el tratamiento con broncodilatadores, antibióticos y corticosteroides (O'Donnell, Aaron et al. 2007).

Como se ha mencionado anteriormente, se estima que en un 50 % de los casos las exacerbaciones de la EPOC son de causa bacteriana (Calle Rubio, Chacón et al. 2010). Por este motivo, en muchos casos se utilizará el tratamiento antibiótico como tratamiento de base aunque no exista ninguna prueba diagnóstica que nos lo confirme. La mayoría de las normativas aceptan el uso de antibióticos cuando se cumplen 2 de los criterios de Anthonisen (Anthonisen, Manfreda et al. 1987): aumento de la disnea, aumento de la expectoración y aumento de la purulencia del esputo. La elección del antimicrobiano se realiza en función de la sospecha del agente bacteriano implicado, basado en las circunstancias clínicas, la gravedad de la EPOC y la presencia de comorbilidades e infecciones o antibioterapia previa (Miravittles 2007).

En todas las exacerbaciones de la EPOC, el tratamiento de la limitación al flujo aéreo y de la hiperinsuflación dinámica consiste en los broncodilatadores de acción corta. Estos fármacos (agonistas b2-adrenérgicos como el salbutamol y anticolinérgicos como el bromuro de ipratropio) alivian los síntomas y mejoran la función pulmonar. La teofilina a dosis broncodilatadoras no se consideran fármacos de primera elección en las agudizaciones de la EPOC porque no mejoran la función pulmonar, ni la clínica ni la duración del ingreso. Además, presentan abundantes efectos secundarios, por su estrecho margen terapéutico, lo que obliga a controles periódicos de los valores de teofilina en sangre (Calle Rubio, Chacón et al. 2010). Sin embargo, pocos estudios han evaluado sus efectos anti-inflamatorios a dosis más bajas.

Basándonos en el aumento significativo de la inflamación local existente en la vía aérea, el tratamiento de la agudización de la EPOC debe incluir corticoides sistémicos. Diversos ensayos clínicos y revisiones sistemáticas han demostrado que aceleran la recuperación de la función pulmonar y la

desaparición de los síntomas, disminuyen la estancia hospitalaria y reducen el número de reingresos (Aaron, Vandemheen et al. 2003). La principal limitación son los importantes efectos adversos, entre ellos, el más frecuente, la hiperglucemia. A pesar de sus efectos beneficiosos, no se conoce actualmente la dosis óptima que se debe emplear ni la duración del tratamiento ideal. Se aconseja su empleo en la exacerbación de la EPOC grave o en la EPOC leve o moderada con mala respuesta inicial. El tratamiento recomendado es de 30-40 mg de prednisona o equivalentes, durante no más de 10 días (Calle Rubio, Chacón et al. 2010).

HIPÓTESIS

La EPOC es una enfermedad con un incremento de la respuesta inflamatoria crónica en las vías aéreas y en los pulmones. Durante las exacerbaciones dicha inflamación se ve incrementada. La acetilación/ deacetilación de las histonas nucleares juega un papel en la modulación de la respuesta inflamatoria. El proceso inflamatorio pulmonar se caracteriza por tener una actividad histona deacetilasa (HDAC) disminuida lo cual es responsable de que la inflamación en la EPOC sea parcialmente resistente a los glucocorticoides.

La hipótesis general de esta tesis doctoral es que la respuesta inflamatoria que sufren los pacientes con EPOC en la fase estable se agrava durante las agudizaciones y puede ser modulada mediante fármacos que potencian la actividad de la HDAC.

Para contrastar esta hipótesis se han realizado tres estudios:

- 1) Estudio de los mecanismos inflamatorios y su modulación farmacológica en un modelo celular de agudización de EPOC.
- 2) Estudio sobre el mecanismo molecular de inflamación durante la fase de agudización comparado con la fase estable en pacientes con EPOC.
- 3) Estudio sobre los efectos de la modulación de los mecanismos de inflamación con fármacos potenciadores de la actividad histona deacetilasa en pacientes con agudización de EPOC.

OBJETIVOS

Estudio I

Mecanismos inflamatorios y su modulación farmacológica en un modelo celular de agudización de EPOC

Hipótesis

La EPOC es un trastorno inflamatorio parcialmente resistente a los glucocorticoides (Barnes and Adcock 2009). Se ha demostrado previamente que la supresión de genes inflamatorios inducida por los glucocorticoides requiere el reclutamiento de las HDACs por el complejo ligando-receptor de glucocorticoides (GR) (Ito, Barnes et al. 2000) y que la reducción de la actividad de HDAC está relacionada con la insensibilidad a los glucocorticoides en la EPOC (Barnes, Ito et al. 2004). La modulación farmacológica de la actividad HDAC a dosis bajas de teofilina revierte la insensibilidad de GC in vitro y en macrófagos de pacientes con EPOC estable (Cosio, Tsaprouni et al. 2004).

La infección de las vías respiratorias es un mecanismo clave en la patogenia de las exacerbaciones de la EPOC (Bresser, Out et al. 2000, Sethi, Evans et al. 2002, Murphy, Brauer et al. 2004, Look, Chin et al. 2006). *Haemophilus influenzae* se aísla con frecuencia en el esputo de pacientes con EPOC, tanto en estado estable como durante las agudizaciones (Sethi, Evans et al. 2002, Murphy, Brauer et al. 2004). Los efectos potenciales de *Haemophilus influenzae* en las respuestas inflamatorias regulada por la actividad HDAC no se han investigado antes. Del mismo modo, si estos efectos son susceptibles a la acción de efectores farmacológicos es desconocida.

Este apartado de la tesis pretende contrastar la hipótesis de que las agudizaciones de la EPOC relacionadas con infección por *Haemophilus influenzae* inducen una respuesta inflamatoria dependiente de la acetilación de histonas nucleares y que la modulación farmacológica con potenciadores de la actividad HDAC puede atenuar la respuesta inflamatoria.

Objetivos

- Determinar la respuesta inflamatoria inducida por *H. Influenzae* en un modelo celular de agudización de EPOC utilizando una línea celular de macrófagos.
- Investigar los efectos de la modulación farmacológica sobre la respuesta inflamatoria mediada por las vías NF- κ B e HDAC en un modelo celular de agudización. Estudiar la respuesta inflamatoria y los efectos de la intervención farmacológica en los macrófagos alveolares procedentes de pacientes con EPOC e infectados con *Haemophilus influenzae*.

Estudio II

Determinar las diferencias de los cambios inflamatorios pulmonares observados en pacientes con EPOC en fase de agudización comparados con la fase estable

Hipótesis

Existen diversos estudios que demuestran que los episodios de EEPOC se caracterizan por el aumento de diversos marcadores inflamatorios, incluyendo el número de neutrófilos y macrófagos en la vía aérea y la concentración de citoquinas, particularmente IL-6 e IL-8 (Bhowmik, Seemungal et al. 2000, Fujimoto, Yasuo et al. 2005), lo que sugiere que el «mecanismo patogénico» fundamental de los episodios de EEPOC es un «brote inflamatorio» pulmonar, con independencia de su causa «desencadenante».

En el núcleo, el ADN se encuentra combinado con un grupo de proteínas denominadas histonas (Grunstein 1997). El nivel de acetilación de estas histonas (medida como actividad histona acetiltransferasa) controla el grado de accesibilidad de diversos factores de transcripción (incluyendo NF- κ B) al ADN y, por tanto, controla el nivel de expresión de los genes regulados por dichos factores de transcripción. El mecanismo contrarregulador de esta expresión inflamatoria aumentada consiste en deacetilar dichas histonas nucleares, actividad realizada por las enzimas HDAC. Por ello, una mayor acetilación de

las histonas (y por tanto mayor actividad HAT) implica una mayor activación NF- κ B y una mayor transcripción de genes inflamatorios. Por el contrario, la deacetilación de las histonas (actividad HDAC) implica que el DNA se hace inaccesible a los factores de transcripción, y por tanto hay menor transcripción inflamatoria.

En este estudio pretendemos explorar la hipótesis de que la respuesta inflamatoria durante la agudización de la EPOC está aumentada con respecto a la fase estable y el mecanismo de esta respuesta es dependiente de NF- κ B y relacionada con la persistencia de una actividad HDAC disminuida.

Objetivos

- Describir los cambios inflamatorios pulmonares y sistémicos durante las agudizaciones de la EPOC.
- Explorar los mecanismos moleculares relacionados con los cambios inflamatorios observados.

Estudio III

Investigar el mecanismo inflamatorio y su modulación farmacológica en pacientes con agudización.

Hipótesis

Los pacientes con EPOC a menudo experimentan episodios agudos de exacerbación durante el curso de su enfermedad. Estos episodios se caracterizan por la activación de NF- κ B (Caramori G 2003, Barnes, Ito et al. 2004) y un incremento de la inflamación de las vías respiratorias, con un aumento de estrés oxidativo y nitrativo (Drost, Skwarski et al. 2005), aumento de los recuentos de neutrófilos y niveles elevados de varias citoquinas pro-inflamatorias como el TNF- α y la IL-8 e IL6 (Pinto-Plata, Livnat et al. 2007).

Directrices internacionales recomiendan el uso de altas dosis de esteroides orales o intravenosos (en combinación con broncodilatadores inhalados) para el tratamiento de las EEPOC (Rabe, Hurd et al. 2007). Las concentraciones

bajas de teofilina mejoran la actividad HDAC y tienen efectos anti-inflamatorios, tanto en el asma y la EPOC (Barnes 2013).

La hipótesis a contrastar es que la teofilina a dosis bajas potencia la actividad HDAC y mejorar la capacidad de respuesta anti-inflamatoria a los glucocorticoides durante EEPOC.

Objetivos

- Determinar la actividad HDAC en macrófagos de esputo de los pacientes hospitalizados por EEPOC.
- Investigar en un ensayo clínico prospectivo, aleatorizado y controlado si la adición de dosis bajas de teofilina oral a la terapia estándar aumenta la actividad y los efectos anti-inflamatorios de los glucocorticoides.

METODOLOGÍA

Pacientes

Estudio 1

Siete pacientes diagnosticados de EPOC de acuerdo con las guías internacionales (Vestbo, Hurd et al. 2013), 5 fumadores y 6 pacientes no fumadores sin evidencia de obstrucción de la vía aérea en la espirometría y que por razones clínicas se incluyeron en broncoscopia. Se excluyeron los pacientes con enfermedades inflamatorias o infecciosas activas, que reciben tratamiento con antibióticos, agentes inmunosupresores, corticoides orales o inhalados o teofilina, o pacientes con una exacerbación de la EPOC dentro de las 6 semanas anteriores. Todos los participantes firmaron un consentimiento informado aprobado por el Comité de Ética de las Islas Baleares.

Análisis estadístico

Los resultados se expresan como medias \pm error estándar de la media (SEM) de al menos 3 experimentos diferentes en duplicado. La comparación entre los grupos experimentales se realizó mediante la prueba t de student y el análisis de la varianza (ANOVA) de Mann-Whitney. Se consideró significativo un valor de $p < 0,05$. El análisis se realizó utilizando el software *GraphPad Prism* (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EE. UU.).

Estudio 2

Se reclutaron pacientes con diagnóstico de EEPOC durante las primeras 24 horas de ingreso en el servicio de Urgencias. Estos pacientes tenían diagnóstico de EPOC, definida como un cociente FEV1/FVC post-broncodilatador $< 70\%$ determinado durante estabilidad de acuerdo a los criterios GOLD, una historia de tabaquismo > 15 paquetes/año y diagnóstico de EEPOC al ingreso. Este último realizado por un médico de urgencias, que no participaba ni conocía el estudio, y se basaba en los síntomas del paciente

(aumento de disnea, tos y/o cambios en la expectoración) y pruebas complementarias: gasometría arterial, electrocardiograma, radiografía de tórax y analítica sanguínea de rutina.

Del laboratorio de pruebas funcionales respiratorias del servicio de Neumología se reclutaron dos grupos control, uno con historia de tabaquismo mayor a 15 paquetes/año y otro constituido por sujetos no fumadores, todos con un cociente FEV1/FVC post-broncodilatador > 70%. Se excluyeron los participantes con historia de asma, bronquiectasias, carcinoma bronquial, neumonía o fallo cardíaco. También se excluyeron aquellos que fueron incapaces de proporcionar una muestra de esputo adecuada o si estaban en tratamiento con teofilina, fármacos antiinflamatorios para el tratamiento de enfermedades inflamatorias como enfermedad de Crohn o artritis reumatoide, o habían recibido tratamiento con antibióticos o glucocorticoides sistémicos durante las últimas 4 semanas. Todos los participantes fueron informados sobre la naturaleza y propósito del estudio y dieron su consentimiento por escrito. El estudio fue aprobado por el comité de Ética de las Islas Baleares.

Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como media±SEM (o medianas e intervalos en distribuciones no-normales). La actividad HDAC y NF-κB, los valores de IL-8, IL-6, TNF-α, TAS, FEV1, SLPI y PCR presentaron distribución normal y se compararon entre los grupos usando ANOVA. Si la ANOVA mostraba diferencias significativas, las comparaciones a posteriori o post hoc (comparaciones múltiples) se realizaron con el test de Tukey-Kramer. Para la comparación entre los grupos de EPOC durante la agudización y la fase estable se utilizó la t Student para muestras pareadas. Se consideró significativo un valor de $p < 0,05$. El análisis se realizó utilizando el software *GraphPad Prism* (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EE. UU.).

Estudio 3

Los pacientes fueron reclutados en las primeras 24 h del ingreso en el departamento de Urgencias del Hospital Universitario Son Dureta entre junio de

2005 y diciembre de 2007. Los sujetos entraron en el estudio si tenían diagnóstico de EPOC, FEV₁ / FVC post-broncodilatador < 70% y una historia de tabaquismo de >15 años-paquete y un diagnóstico en de ingreso de EEPOC, realizado por el médico de urgencias que desconocía el estudio, y se basa en los síntomas del paciente y las pruebas complementarias. Se excluyeron los pacientes con antecedentes de asma, bronquiectasias, carcinoma bronquial, neumonía o insuficiencia cardíaca. Los pacientes también fueron excluidos si eran incapaces de proporcionar una muestra adecuada de esputo o si ya estaban siendo tratados con teofilina o con una terapia anti-inflamatoria para enfermedades inflamatorias crónicas como la artritis reumatoide o Crohn, o habían recibido antibióticos o esteroides orales durante las 4 semanas anteriores.

Al ingreso todos los pacientes recibieron tratamiento de acuerdo con directrices internacionales (Rabe, Hurd et al. 2007) que incluye nebulizaciones con broncodilatadores, esteroides sistémicos (orales o por vía intravenosa) en todos los pacientes con o sin antibióticos de acuerdo con los criterios de Anthonisen (Anthonisen, Manfreda et al. 1987). Cuando el paciente acepta participar en el estudio se le realiza una espirometría, una gasometría arterial, medición de óxido nítrico exhalado (ENO) y muestras de esputo inducido durante las primeras 24 horas de hospitalización. Los pacientes fueron aleatorizados para recibir tratamiento estándar con o sin teofilina (100 mg dos veces al día) que era mantenido hasta el final del estudio. Al alta, ambos grupos recibieron tratamiento con corticoides inhalados. La asignación al azar se hizo por una enfermera de la investigación sobre la base de una lista de asignación aleatoria generada por ordenador y los investigadores que analizaron los datos no estaban al tanto de los grupos de tratamiento.

Se programó una visita a la clínica a los 3 meses del alta. Se consideró estabilidad clínica si el paciente no había tenido que cambiar su tratamiento regular por aumento de síntomas. Si se produce otro episodio de agudización después del alta, la visita se reprogramó 3 meses más tarde. Durante esta visita ambulatoria, se repitieron las mediciones obtenidas durante la

hospitalización. Si el paciente no acudió a la visita, el equipo investigador se puso en contacto con el paciente para confirmar la supervivencia.

Análisis estadístico

Los resultados se expresan como valores medios (SEM) o valores de la mediana (rango) en las variables no normales. Los valores de la actividad HDAC, valores de activación de NF- κ B, IL8, IL6, TNF α , ENO, TAS y FEV1 se distribuyeron normalmente y se compararon entre grupos mediante. Los análisis se realizaron para la población por intención de tratar. Un valor de $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo. El análisis se realizó utilizando el software GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, California, EE.UU.).

Preparación de la cepa bacteriana

La cepa 05-118741 de *Haemophilus influenzae* es un aislado no tipificable amablemente proporcionados por el Dr. A. Oliver. *H. influenzae* se cultivó en placas de agar de chocolate a 37 ° C en 5% de CO₂.

Cultivo celular

Las células U937, una línea celular humana de monocitos (designación de la American Type Culture Collection (ATCC) CRL-1593.2) se cultivaron a 37 ° C en un ambiente humidificado con 5% de CO₂ en medio RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute 1640 medium) que contiene 10% de suero de ternera fetal, 5% HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) y suplementado con antibióticos (50 U / ml penicilina y 50 Ag / ml de estreptomicina). Para transformar las células U937 de monocitos a macrófagos, se sembraron en placas de 6 pocillos a una densidad de 8×10^5 células/pocillo y fueron expuestas a 100 nM de forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) durante 72 horas. Una vez transformadas las células se incubaron durante 24 horas con medio RPMI 1640 suplementado con 0,5% suero de ternera fetal, 5% HEPES y

suplementado con antibióticos (6 mg/ml penicilina, anfotericina B 0,025 mg/ml y 10 mg/ml de estreptomicina).

Las células se infectaron con *Haemophilus influenzae* a una MOI (multiplicity of infection) de 100: 1. Al mismo tiempo, las células fueron tratadas con dexametasona (1 μ M), teofilina (10 μ M) y una combinación de dexametasona y teofilina, a las mismas concentraciones, que sabemos que son efectivas a partir de experimentos anteriores (Ito, Lim et al. 2002). Los sobrenadantes se recogieron después de 18 horas y se mantuvieron a -20°C. En diferentes experimentos, se aislaron las células después de 4 horas y se extrajeron las proteínas nucleares usando un kit de extracto nuclear [®] (Active Motif, CA, EE.UU.) y se mantuvieron a -80 °C. Los experimentos se repitieron 3 veces por duplicado.

Extracción nuclear para medir actividad de NF- κ B

La extracción nuclear se realizó mediante el kit *Nuclear extract kit* de la casa comercial Active Motif[®] (Carlsbad, California). El procedimiento permite de una manera rápida y efectiva obtener proteínas activas, no desnaturalizadas, que se encuentran tanto en el citoplasma como en el núcleo celular.

Para la preparación del extracto nuclear, las células se recogen con PBS frío en presencia de inhibidores de fosfatasa para limitar las modificaciones de las proteínas. Luego las células son re-suspendidas en buffer hipotónico lo que hace que la célula se hinche y sea más frágil. La adición de un detergente rompe la membrana y hace que las proteínas citoplasmáticas estén en el sobrenadante. Después de recoger la fracción citoplasmática, el núcleo se lisa y las proteínas nucleares son solubilizadas en lisis buffer sin detergente y con un cóctel de inhibidores de proteasas.

La concentración de proteínas de cada una de las muestras se determina con el kit de Bio-Rad *DC protein assay*[®] ([Hercules](#), California) basado en el ensayo de Lowry (Lowry, Rosebrough et al. 1951). El ensayo de proteínas DC Bio-Rad es un ensayo colorimétrico para la concentración de proteínas tras la

solubilización con detergente. El ensayo se basa en la reacción de proteína con una solución de tartrato de cobre alcalino y el reactivo de Folin. Como con el ensayo de Lowry, hay dos pasos para el desarrollo de color: la reacción entre la proteína y el cobre en un medio alcalino y la posterior reducción por el reactivo de Folin. El desarrollo de color se debe principalmente a los aminoácidos de tirosina y triptófano, y en menor medida, cistina, cisteína, e histidina. Las proteínas efectúan una reducción del reactivo de Folin por la pérdida de 1, 2, o 3 átomos de oxígeno, produciendo de ese modo una o más especies reducidas posibles que tienen un color azul característico con absorbancia máxima a 750 nm y la absorbancia mínima a 405 nm.

Actividad NF- κ B

La activación de NF- κ B se evaluó por medio del kit *TransAMk*® de Active Motif. Brevemente, se prepararon extractos nucleares de acuerdo con el kit de extracto nuclear (Active Motif®) y 3 μ g de proteínas nucleares se añadieron a una placa de 96 pocillos que contiene un oligonucleótido inmovilizado correspondiente al sitio de consenso NF- κ B (5VGGGACTTTCC-3V) y al que específicamente se une la forma activa de NF- κ B presente en el extracto nuclear. A continuación, se añadió un anticuerpo contra un epítipo de la subunidad p65 (de RelA) de NF- κ B que sólo es visible cuando está activa. La incubación con el anticuerpo secundario adecuado conjugado con peroxidasa y con un reactivo colorimétrico proporciona una señal que se cuantificó por medio del lector Elx808 de Bio-tek. Los controles positivos se realizaron con un extracto nuclear de células Jurkat proporcionadas por el fabricante.

Extracción nuclear para medir actividad de HDAC

Para la extracción nuclear y citoplasmática no se utilizó ningún kit comercial sino que se utilizó un método previamente descrito (Ito, Jazrawi et al. 2001). Brevemente, se prepararon las células en una suspensión con HBSS (Hanks balanced salts solution) y se centrifugaron durante 6 minutos a 1600rpm. Una

vez centrifugadas se descarta el sobrenadante y se añade 50ul de lisis buffer (10mM Tris-HCl pH 6,5, 50mM de Na bisulfito, 10mM MgCl₂, 8,6% de sucrosa, 2% triton x-100 y un cóctel de inhibidores de proteasas justo antes de su uso) por cada millón de células. Se deja 10 minutos en hielo y se centrifuga a 12000g durante 5 minutos a 4°C (Ito, Lim et al. 2002). El sobrenadante será la fracción citoplasmática. Al pellet añadimos 20ul de la solución HDAC A (15mM Tris-HCl pH 7,9, 450mM de NaCl, 0,25mM EDTA, 10mM mercaptoetanol, 10% glicerol y un cóctel de inhibidores de proteasas justo antes de su uso) fría por cada millón de células. Homogeneizamos con la pipeta y dejamos en hielo durante 20 minutos. Se le añade 20ul de la solución HDAC B (15mM Tris-HCl pH 7,9, 0,25mM EDTA, 10mM mercaptoetanol, 10% glicerol y un cóctel de inhibidores de proteasas justo antes de su uso) fría por millón de células y se centrifuga a 12000g durante 5 minutos a 4°C. El sobrenadante es la fracción nuclear y es la que usaremos para el ensayo de la actividad de HDAC. La concentración de proteínas de cada una de las muestras se determina con el kit de Bio-Rad DC protein assay basado en el ensayo de Lowry explicado anteriormente.

Actividad HDAC

La actividad se midió mediante el kit *COLOR DE LYS® HDAC colorimetric activity assay* de ENZO Life Sciences (Farmingdale, New York). El procedimiento del ensayo tiene dos pasos. En primer lugar, el color de *Lys®Substrate*, que comprende una cadena lateral de lisina acetilada, se incubaba con una muestra que contiene HDAC activa. La desacetilación de la muestra control sensibiliza al sustrato de modo que, en la segunda etapa, el tratamiento con el color de *Lys®Developer* provoca un aumento en la intensidad de color amarillo y la absorción a 405 nm. Hay una correlación lineal entre la absorción y la intensidad del color. Para los controles positivos se usó un extracto nuclear de la línea celular HeLa proporcionada por el fabricante y el control negativo es un potente inhibidor de HDAC, la Tricostatina A.

Citoquinas

Los sobrenadantes de los cultivos, el sobrenadante del esputo y el suero fueron analizados mediante *BD Cytometric Bead Array (CBA) Human inflammation Kit* (BD Biosciences®, Franklin Lakes, New Jersey). Los kits contienen conjuntos de microesferas fluorescentes, pre-revestidas con una especificidad de anticuerpos única. Dentro de las dos poblaciones de microesferas de tamaño diferente, A y B (4 micras y 5 micras), hay varios subconjuntos de microesferas, diferenciados por diversas intensidades de un colorante interno fluorescente. El colorante puede ser excitado por un láser de argón o de Helio-Neón, y emite a 690 nm. La combinación de los dos tamaños de población y de las diferentes intensidades de tinción interna hace posible distinguir hasta 20 tipos de microesferas en un canal fluorescente. La Estreptavidina-ficoeritrina (PE) que se une al conjugado de biotina, emite a una longitud de onda de 578 nm, lo que permite la cuantificación del analito.

La sensibilidad del kit es la siguiente:

- IL- 8: 3,6 pg/ml
- IL-1 β : 7,2 pg/ml
- IL-6: 2,5 pg/ml
- IL-10: 3,3 pg/ml
- TNF- α : 3,7 pg/ml

Determinación de la SLPI

La determinación de la *Secretory Leukocyte Peptidase Inhibitor Protein* (SLPI) se realizó mediante un kit de ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) específico (R&D systems, Minneapolis, MN, EE. UU.). Siguiendo las recomendaciones del fabricante, este ensayo emplea la técnica cuantitativa del inmunoensayo enzimático en sándwich donde un anticuerpo monoclonal específico para SLPI ha sido pre-revestido sobre una microplaca de 96 pocillos.

Los patrones y las muestras se pipetea en los pocillos y el SLPI presente se unirá al anticuerpo inmovilizado. Después de lavar para eliminar cualquier sustancia que no se haya unido, se añade un anticuerpo policlonal ligado a enzima específico para SLPI a los pocillos. Después de otro lavado se añade una solución de sustrato a los pocillos y se desarrolla el color en proporción a la cantidad de SLPI unido en el paso inicial. El desarrollo del color se detiene y se mide la intensidad del color.

Función Pulmonar

Se realizó espirometría forzada con prueba broncodilatadora (GS, Warren E. Collins, Braintree, MA, EE. UU.) a todos los participantes de acuerdo a las guías internacionales en el momento del ingreso y en fase estable (Agusti, Villaverde et al. 1999). Los valores de referencia espirométricos usados fueron los de la población mediterránea (Roca, Sanchis et al. 1986). Si se disponía de pruebas de función pulmonar previas se utilizaban para confirmar el diagnóstico.

Muestras de esputo y preparación

La inducción del esputo y su procesamiento se realizó siguiendo una metodología estandarizada en nuestro laboratorio y previamente descrita (Cosío, Iglesias et al. 2009). Brevemente, el esputo obtenido fue incubado con 0,01M DTT (Dithiothreitol) en agua destilada, durante 15 minutos, diluido con PBS, y filtrado a través de una malla de nylon de 50µm para quitar la mucosidad y detritus, sin eliminar las células. Se centrifugaba a 790xg durante 10 minutos. El sobrenadante acelular se extrae y se conserva a -70 °C para posteriores determinaciones. El precipitado celular se resuspende, se realiza recuento celular total con un hemocitómetro de Neubauer, utilizando tinción de azul de tripano para determinar la viabilidad celular. Aquellas muestras con menos de un millón de células se consideraron inadecuadas y fueron excluidas del análisis. Las células se incubaron en una placa de 6

pocillos a una densidad de 1×10^6 células/pocillo en 2ml de medio (RPMI 1640, 10% suero fetal bovino, L-glutamina). Tras 4 horas se recoge el sobrenadante y se extraen los macrófagos adheridos que posteriormente son lisados para la extracción de proteínas nucleares.

Muestras de lavado broncoalveolar y preparación

La fibrobroncoscopia se realiza a los pacientes que entran en el primer estudio y firman el consentimiento informado. Se obtiene el lavado broncoalveolar (BAL) del lóbulo medio, como se describe anteriormente (Cosio, Tsaprouni et al. 2004). Los macrófagos alveolares se aislaron del BAL mediante centrifugación a 1600rpm durante 10 minutos y se incubaron en placas de 6 pocillos y se cultivaron a 37 °C en un ambiente humidificado con 5% de CO₂ en medio RPMI 1640 que contenía 5% de suero de ternera fetal (FCS), 5% HEPES y suplementado con antibióticos (50 U / ml de penicilina y 50 Ag / ml de estreptomina) durante 24 horas.

Actividad antioxidante total (TAS)

Se midió la TAS en esputo mediante test colorimétrico (Randox Laboratories Ltd, Crumlin, Reino Unido) utilizando una metodología previamente descrita en nuestro grupo (Barcelo, Barbe et al. 2006).

El principio del ensayo es básicamente que el ABTS® (2,2'-Azino-di-[3-ethylbenzthiazoline sulphonate]) se incubaba con peroxidasa y con H₂O₂ para producir cationes ABTS®⁺. Esto tiene un color azul-verde relativamente estable, que se mide a 600nm. Los antioxidantes que se encuentran en la muestra causan la supresión de dicho color produciendo su disminución el cual es proporcional a su concentración.

Proteína C reactiva (PCR)

La determinación de PCR en plasma se realizó utilizando la técnica de nefelometría siguiendo la técnica estandarizada en el laboratorio central del hospital.

Óxido nítrico exhalado

La medición del óxido nítrico en el exhalado se realizó por quimioluminiscencia (Sievers Instruments Inc, Model 280NOA, Boulder, Colorado, USA) siguiendo las recomendaciones de la *European Respiratory Task Force* (Kharitonov, Alving et al. 1997), tal y como ha sido descrito previamente en nuestro grupo (Agusti, Villaverde et al. 1999).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

ESTUDIO I: Mecanismos inflamatorios y su modulación farmacológica en un modelo celular de agudización de EPOC

Las características de los pacientes se resumen en la tabla 15.

Tabla 15. Características de los pacientes

Características	EPOC (n=7)	Fumadores (n=5)	No fumadores (n=6)
Edad	55,0 ± 4,4	59,4 ± 11,6	56,8 ± 16,1
Sexo (M/F)	6/1	4/1	5/1
Historial fumador			
Índice fumador	69,3 ± 16,8	42,5 ± 3,5	0
Fumadores actuales	5/2	4/1	0
FEV ₁ /FVC (%)	60,7 ± 7,9	84 ± 8	83,6 ± 3,6
FEV ₁ (L)	2,5 ± 0,4	2,9 ± 0,7	3,6 ± 1,0
FEV ₁ % previsto	78,3 ± 16,0	96 ± 16,3	107,2 ± 17,5
<u>BAL:</u>			
Volumen de BAL recuperado (ml)	37,9 ± 10,7	51 ± 18,2	62 ± 20,8
Células totales (células/μl)			
<i>Recuento diferencial:</i>			
Macrófagos(células/μl)	21,68 ± 6,46	72,39 ± 11,61	75,94 ± 2,35
Linfocitos (células/μl)	31,93 ± 5,29	17,9 ± 7,29	22,07 ± 3,02
Neutrófilos (células/μl)	45,93 ± 8,59	9,69 ± 4,5	1,92 ± 0,71

Los pacientes con EPOC eran predominantemente GOLD II (moderado) en fase estable, y estaban recibiendo tratamiento con broncodilatadores de acción prolongada. Ninguno de ellos muestra evidencia de infección o colonización de la microbiología del aspirado bronquial después de la broncoscopia.

Las células U937 tratadas con PMA durante 72 horas tienen cambios morfológicos característicos de los macrófagos alveolares (Figura 18). La viabilidad celular evaluada por exclusión del colorante azul de tripano fue > 95%, incluso 12 h después de la infección.

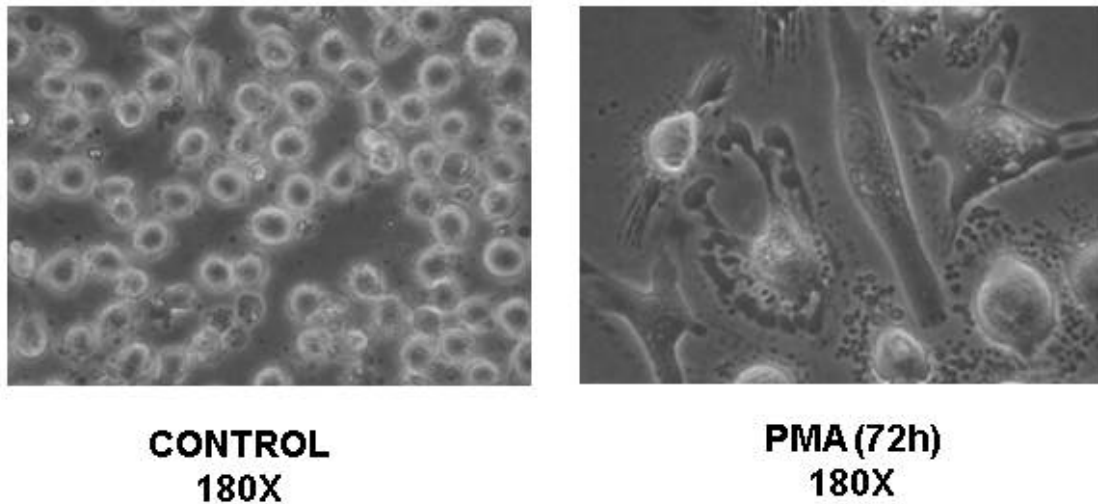


Fig. 18. Cambios morfológicos de las U937 una vez tratadas con PMA (100nM) después de 72 horas en presencia de *Haemophilus influenzae*

Efectos proinflamatorios de H. influenzae

En las células transformadas a macrófagos, *H. influenzae* indujo una fuerte reacción inflamatoria tal como se muestra por el aumento significativo en la liberación de IL-1 β (de 17 ± 6 a 186 ± 82 pg / ml , $p < 0,001$), la IL-6 (de 30 ± 6 - 6427 ± 482 pg / ml, $p < 0,001$), TNF- α (de 8 ± 4 a $2,275 \pm 385$ pg / ml, $p < 0,001$), IL-10 (de 59 ± 5 a 429 ± 91 pg / ml, $p < 0,001$) y la IL-8 liberación (de 686 ± 50 hasta $2,267 \pm 289$ pg / ml, $p < 0,001$) (Figura 19A). Este efecto inflamatorio esta mediado por una mayor activación de NF- κ B (Figura 20A).

También se observó que la actividad HDAC se redujo significativamente por la infección por *H. influenzae* ($p < 0,05$) (Figura 20B).

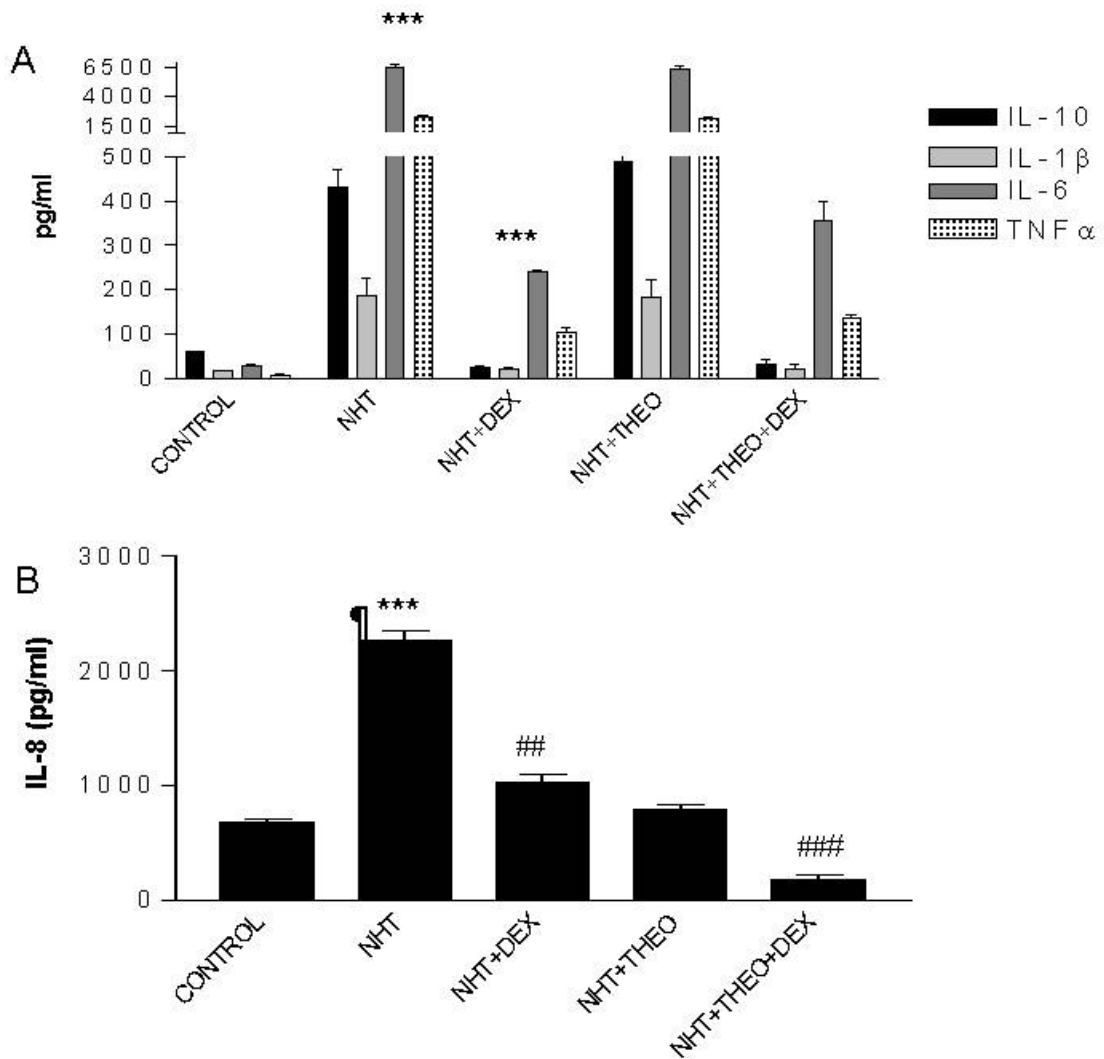


Fig. 19. Efecto de la dexametasona y la teofilina en la liberación de citoquinas en células similares a macrófagos después de la infección por *Haemophilus influenzae*. Abreviaturas Dex: 1 μ M dexametasona, Theo: teofilina 10 μ M, NHTi: *Haemophilus influenzae* no tipificable. (***) $P < 0,001$ por el control, ## $p < 0,01$ sobre células estimuladas, ¶ $p < 0,05$ sobre Dex + NHTi).

Modulación farmacológica de la respuesta inflamatoria inducida por *Haemophilus influenzae*

En las células tipo macrófago, la adición de dexametasona a las células infectadas con *H. influenzae* reduce la activación de NF- κ B ($p < 0,05$) (Figura 20A) y la liberación de la mayoría de las citoquinas determinadas, incluyendo la de IL-1 β (reducido en un 88%, de 186 ± 82 a 23 ± 7 , $p < 0,001$), IL-6 (reducido en un 96%, de $6,427 \pm 482$ a 241 ± 16 pg / ml, $p < 0,001$), TNF- α (reducido en un 95%, pasando de $2,275 \pm 385$ vs 106 ± 20 , $p < 0,001$) y la IL-10 (reducido en un 94%, pasando de 429 ± 91 a 25 ± 6 pg / ml, $p < 0,001$) (Figura 19A). Por el contrario, IL-8 sólo se redujo un 54% (de $2,267 \pm 289$ a 1024 ± 150 pg / ml, $p < 0,05$) (Figura 19B). La dexametasona no afectó significativamente la actividad de HDAC, aunque hubo una tendencia hacia la recuperación de los niveles basales (Figura 20B).

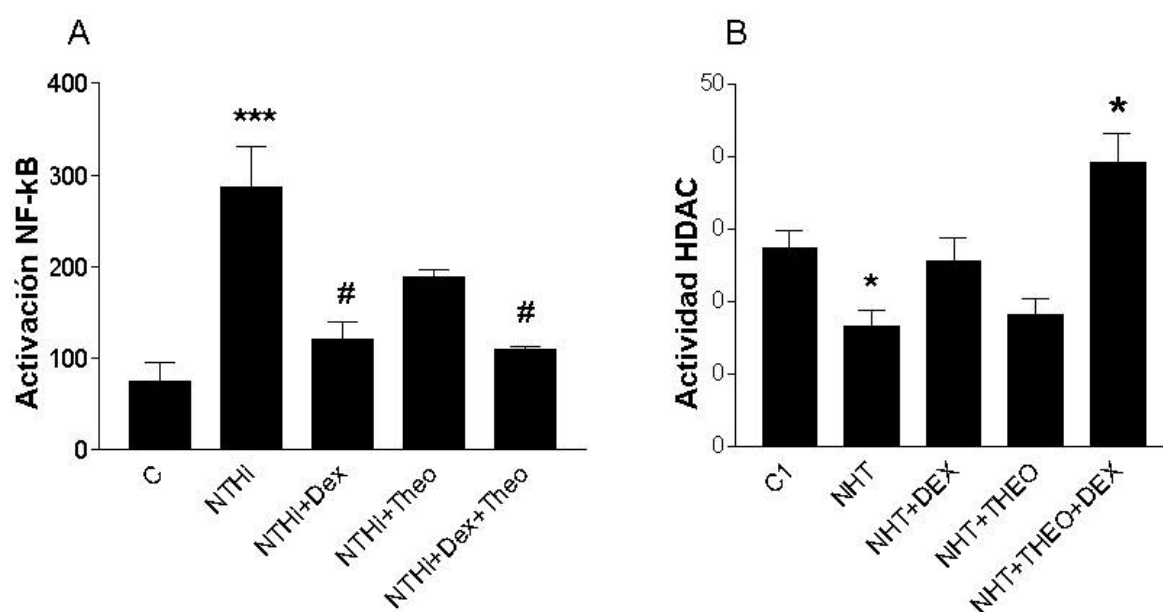


Fig.20. Efecto de la dexametasona y la teofilina en la actividad de NF- κ B y la activación de HDAC en células similares a macrófagos después de la infección por *H. influenzae*. Abreviaturas Dex: 1 μ M dexametasona, Theo: teofilina 10 μ M, NTHi: *Haemophilus influenzae* no tipificable (# $p < 0,05$ sobre células estimuladas, *** $p < 0,001$ por el control, * $p < 0,05$ por el control).

La respuesta inflamatoria provocada por *H. influenzae* fue parcialmente suprimida por dexametasona (1 μ M) en los macrófagos alveolares de pacientes con EPOC, así como los macrófagos de los fumadores y no fumadores sanos. De esta manera, la liberación de TNF- α , e IL-10 se redujo significativamente por la dexametasona (con supresión promedio de 56% y 68%, respectivamente, $p < 0,05$) (Figura 21A) mientras que la IL-1 β , IL-6 e IL-8 no fueron significativamente suprimidas en cualquiera de los macrófagos infectados por *H. influenzae*, independientemente de tener EPOC ($p > 0,05$) (Figura 21B).

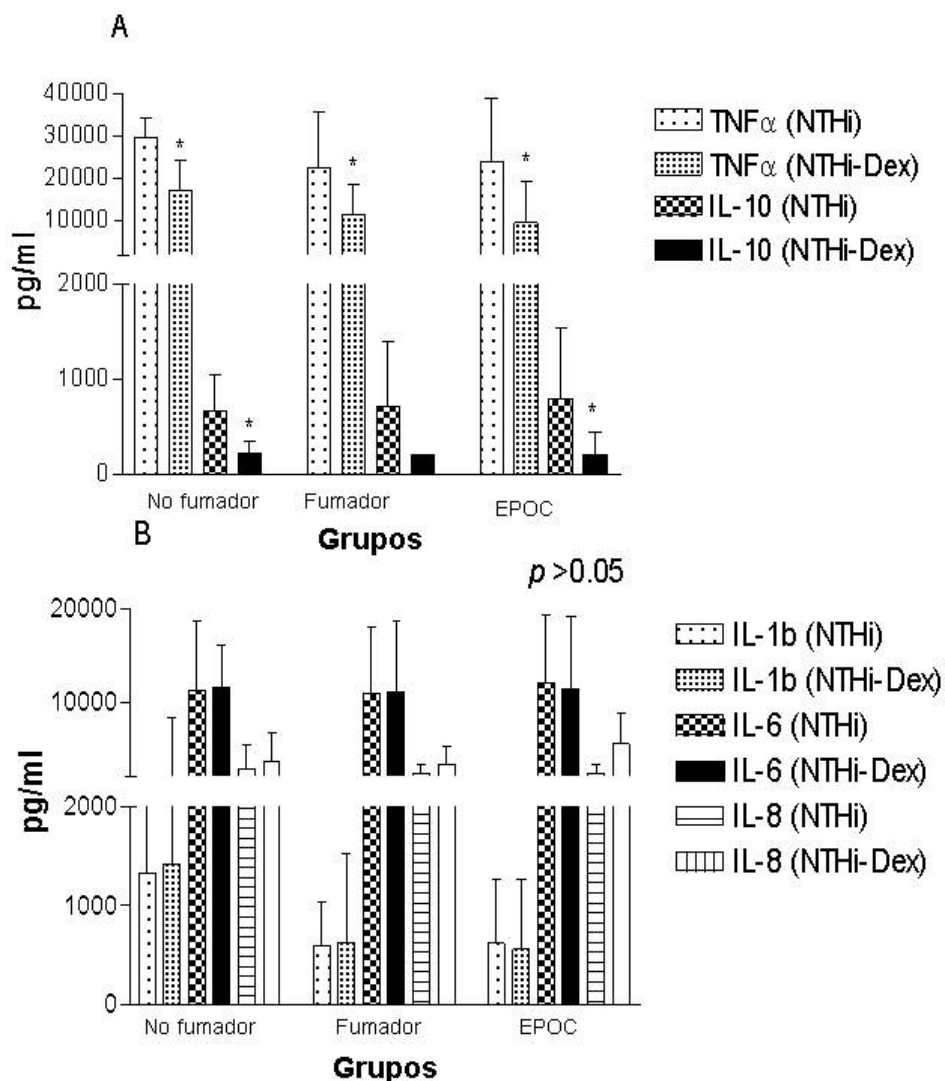


Fig. 21. Efecto de la dexametasona sobre la liberación de citoquinas inflamatorias por los macrófagos alveolares obtenidas de pacientes con EPOC, fumador y no fumador. Abreviaciones Dex: 1 μ M dexametasona, NTHi: Haemophilus influenzae no tipificable (* $p < 0,05$ respecto a las células infectadas con NTHi)

Efectos sobre la actividad HDAC

En línea de células transformadas en macrófago, la teofilina en concentraciones bajas (10 uM) no produce una reducción significativa de la activación de NF- κ B (Figura 20A) y no pudo modificar la liberación de ninguna de las citoquinas medidas (Figura 21A). La teofilina como tratamiento único no afectó la actividad HDAC (Figura 20B). La combinación de teofilina y dexametasona no modificó la activación de NF- κ B ni modificó la reducción de IL-6, IL-10, IL-1 β y TNF α observada con esteroides solos (Figura 19A, 19B y 20A). Sin embargo, esta combinación dio lugar a una mayor supresión de la liberación de IL-8 (92 vs 58%) en comparación con dexametasona sola (1024 ± 150 vs. 174 ± 65 pg / ml, $p < 0,05$) (Figura 19B) y aumentó significativamente la actividad de HDAC (Figura 20B).

Discusión

Este estudio confirma que *H. Influenzae*, uno de los gérmenes más frecuentemente implicados en la patogenia de las EEPOC, activa una respuesta inflamatoria dependiente de NF- κ B en los macrófagos alveolares (Shuto, Xu et al. 2001, Watanabe, Jono et al. 2004), y muestra por primera vez que se produce una disminución simultánea en la actividad HDAC global. Esto es relevante porque se demuestra que esta respuesta inflamatoria no puede ser totalmente suprimida por los fármacos antiinflamatorios más potentes, los glucocorticoides. Esta resistencia parcial a los esteroides no parece estar exclusivamente relacionada con la EPOC, como se pensaba, ya que también es inducida en macrófagos de fumadores y no fumadores que no sufren de EPOC. Además, en nuestro modelo experimental de células, la combinación de dexametasona y teofilina puede restaurar la actividad HDAC y suprimir IL-8 casi por completo.

Estudios previos

Está bien establecido que las bacterias pueden estimular la expresión de muchas citoquinas y quimioquinas, especialmente IL-8, en diferentes tipos de

células (Wang, Cleary et al. 2003). Esta regulación normalmente (pero no exclusivamente) implica la activación de la vía NF- κ B (Bowie and O'Neill 2000). Nuestros resultados están de acuerdo con estas observaciones, porque también observamos la activación de NF- κ B y un aumento significativo en la liberación de citoquinas. Hallazgos similares a los nuestros fueron observados en células epiteliales infectadas con *Moraxella catharralis*, incluyendo el efecto sobre actividad HDAC (Slevogt, Schmeck et al. 2006).

Interpretación de los resultados obtenidos

La actividad de HDAC se reduce progresivamente a medida que aumenta la gravedad de la EPOC (Ito, Ito et al. 2005). Esto se asocia con la acetilación de la histona-4 del promotor de IL-8 y el aumento de IL-8 RNA mensajero (mRNA) (Ito, Ito et al. 2005). Los mecanismos que subyacen a estas observaciones no son claros. Se encontró que el *H. influenzae*, un patógeno bacteriano que a menudo se aísla en las vías respiratorias de los pacientes con EPOC moderada a grave (Sethi, Evans et al. 2002, Murphy, Brauer et al. 2004), induce una resistencia parcial a los esteroides *ex vivo* y reduce la actividad de HDAC *in vitro*, lo que ofrece una posible explicación para la reducción observada de HDAC en pacientes con EPOC avanzado. Por lo tanto, proponemos que la reducción de la actividad de HDAC inducida por *H. influenzae* que observamos en nuestro estudio es debida a modificaciones post-transduccionales de HDAC (nitración o fosforilación) (David, Neptune et al. 2002, Ito 2007). De hecho, en un estudio reciente, en células epiteliales bronquiales, *M. catarrhalis* (otro patógeno bacteriano frecuentemente aislado en pacientes con EPOC) aumenta la acetilación de las histonas H3 y H4, tanto a nivel global como en el sitio del promotor del gen de la IL-8 (Slevogt, Schmeck et al. 2006). Además, la prevención de la desacetilación de histonas por el inhibidor de histona desacetilasa tricostatina A aumentó la respuesta de IL-8 inducida por *M. catarrhalis* (Slevogt, Schmeck et al. 2006).

En nuestro estudio *in vitro*, los glucocorticoides inhibieron la liberación de la mayoría (IL-1 β , IL-6, TNF- α e IL-10), pero no todas (IL-8) las citoquinas inducidas por *H. influenzae*. Sin embargo, esta última fue completamente

inhibida cuando los esteroides se combinaron con la teofilina, un fármaco que restauró la actividad HDAC. La supresión de la expresión de citoquinas por los glucocorticoides no depende exclusivamente de la inhibición de NF- κ B, y varios eventos post-transcripcionales, tales como la estabilización del RNA mensajero de la IL-8 (Josse, Boelaert et al. 2001), y la participación de otros factores de transcripción o co-factores son necesarios para regular la expresión de diferentes citoquinas (Kagoshima, Cosio et al. 2003). Nuestros datos apoyan el papel de HDAC en este proceso regulador, ya que la teofilina, un conocido activador de HDAC (Ito, Lim et al. 2002, Barnes 2003, Cosio, Tsaprouni et al. 2004), disminuye la resistencia a los glucocorticoides en la supresión de IL-8. Sin embargo, la teofilina por sí sola no afecta la liberación de IL-8 inducida por *H. influenzae*. Esto es probablemente debido al hecho de que el aumento de la actividad de HDAC por sí misma no es capaz de reprimir la transcripción de genes inflamatorios porque necesita ser reclutado por el complejo transcripcional que forma el receptor glucocorticoide (GR) junto a otros factores de transcripción cuando pasa al núcleo celular (Barnes 2003). Esto puede explicar la relativa falta de efecto de la teofilina sola en la supresión de la liberación de IL-8 inducida por *H. influenzae*, así como su efecto cuando se combina con dexametasona.

ESTUDIO II: Determinar las diferencias de los cambios inflamatorios pulmonares observados en pacientes con EPOC en fase de agudización comparados con la fase estable

Datos clínicos

Se reclutaron 17 pacientes con diagnóstico previo de EPOC durante una agudización (EEPOC), que posteriormente fueron re-estudiados en fase estable, y como controles se estudiaron 17 fumadores y 11 no fumadores con función pulmonar normal. Las características demográficas y funcionales de los pacientes se resumen en la tabla 16. Cinco pacientes (29%) con EEPOC tenían un cultivo de esputo con crecimiento de bacterias potencialmente patógenas (BPP): 2 *Pseudomonas aeruginosa*, 2 *Haemophilus influenzae*, y 1 *Streptococcus pneumoniae* en el momento del ingreso por agudización y dos pacientes tuvieron crecimiento de *Haemophilus influenzae* en fase estable. No hubo diferencias en los parámetros analizados a continuación entre los pacientes con cultivo positivo para BPP y los pacientes con cultivo negativo.

Tabla 16. Características demográficas y funcionales de los participantes

	EPOC (n= 17)	Fumadores (n=17)	No fumadores (n= 11)
Edad (años)	66,6±1,5	60,8±2,2	64,2±3,1
Sexo (M/F)	17/0	14/3	4/7
Paquetes/año	61,9±3,8	49,8±3,7	0
IMC (kg/m ²)	25,3±1,0	26,03±0,9	27,4±1,6
FEV1 (L)	1,39±0,57	2,92±0,18	2,45±0,16
FEV1 (%)	41,7±15	98,5±2,4	117,5±9,07
FVC (L)	2,79±0,99	3,68±0,9	2,94±0,61
FVC (%)	83,7±8,5	104,1±10,2	112±,8,6
FEV1/FVC	49,9±13	79,8±5,8	88,8±4,5
Nº pacientes con EEPOC previas	9	0	0
Nº pacientes recibiendo CSI	13	0	0

Valores expresados como media±desviación estándar CSI: corticoesteroides inhalados IMC: índice de masa corporal FEV1: volumen espiratorio forzado en el primer segundo en fase estable

Marcadores de inflamación pulmonar

El patrón celular del esputo muestra un predominio neutrofílico en pacientes con EPOC durante la agudización pero que también persiste durante la fase estable, mientras que los controles muestran un predominio de macrófagos y linfocitos (Figura 22).

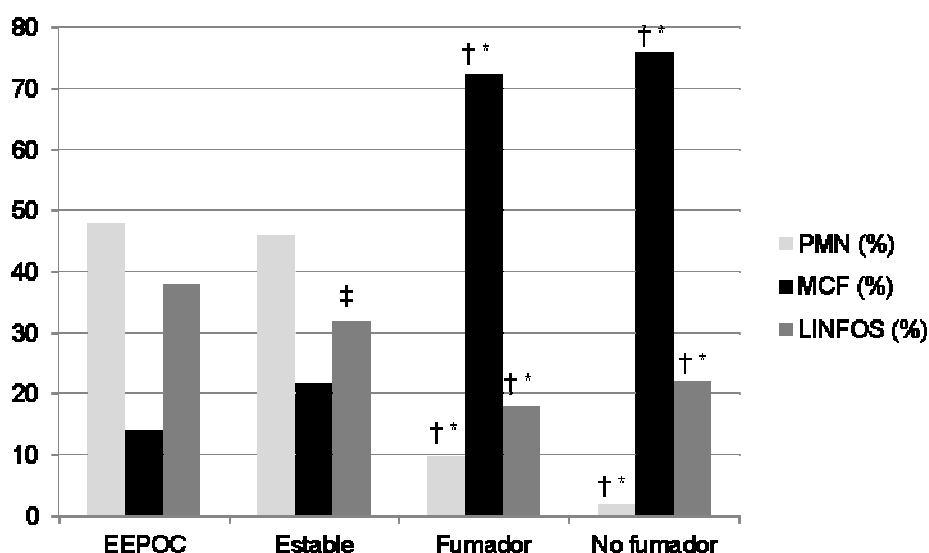


Fig. 22. Patrón celular del esputo. * $p < 0,001$ respecto a EEPOC. $† p < 0,001$ respecto a estable. $‡ p < 0,05$ respecto a EEPOC.

Durante las EEPOC también encontramos niveles significativamente elevados de citoquinas inflamatorias IL-8, IL-1 β , IL-6 y TNF- α en esputo (Figura 23). IL-8 e IL-1 β disminuyen significativamente durante la fase estable, pero IL-6 y TNF- α no disminuyen significativamente de la agudización a la fase estable y persisten elevados con respecto a los controles sin EPOC. Los niveles de IL-8 en fase estable fueron significativamente más elevados que en los controles fumadores y no fumadores. En cambio, los niveles de IL-1 β disminuyeron hasta niveles similares a los controles. Las citoquinas antiinflamatorias IL-10 y SLPI están aumentadas durante la agudización con respecto a los controles. Los niveles de SLPI permanecen elevados durante la fase estable, pero los niveles

de IL-10 disminuyen en fase estable a niveles similares a los controles (Figura 24).

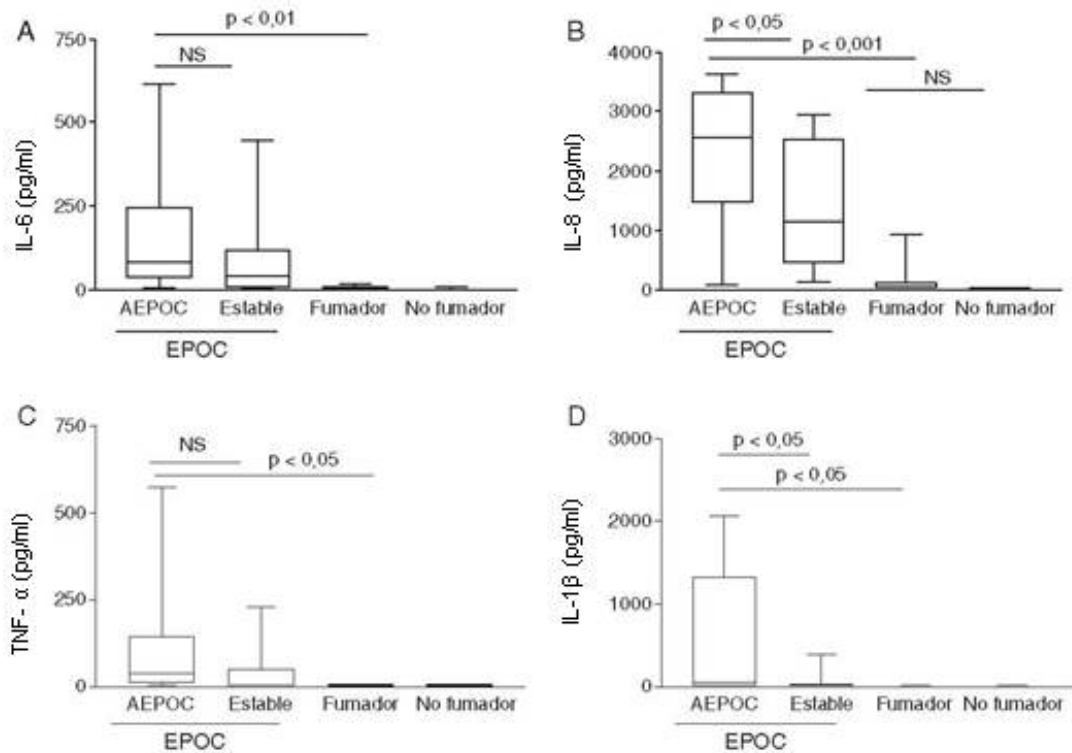


Fig.23. Diferencias en la concentración en esputo de diferentes marcadores inflamatorios. IL-6, Panel A, IL-8, Panel B, TNF- α , Panel C e IL-1 β , Panel D.

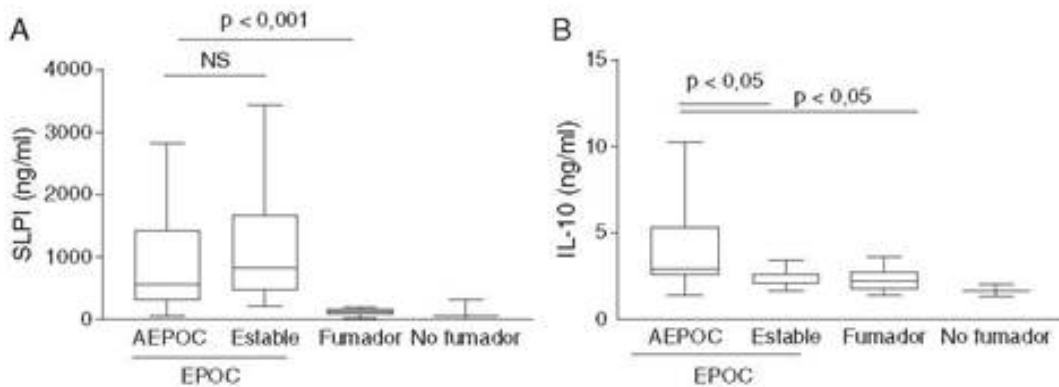


Fig. 24. Concentración en esputo de citoquinas anti-inflamatorias: inhibidor de las leucoproteasas del suero (SLPI, Panel A) e IL-10, Panel B.

Marcadores de inflamación sistémica

El patrón celular en sangre periférica muestra un significativo aumento de leucocitos polimorfonucleares y disminución de linfocitos en los pacientes agudizados con respecto a los pacientes estables y los controles. Los pacientes con EPOC estable y los fumadores también mostraron mayor número de leucocitos totales que los no fumadores (Tabla 17). Durante las agudizaciones se encontraron niveles elevados de proteína C reactiva (PCR) y fibrinógeno en plasma en comparación con fase estable y controles fumadores ($p < 0,001$). No se encontraron diferencias significativas en los niveles séricos de IL-6, 8, 1 β , 10, 12, TNF- α medidos en los diferentes grupos.

Tabla 17. Marcadores inflamatorios sistémicos

	EEPOC	Estable	Fumador	No fumador
Leu totales ($\times 10^3/uL$)	12,14 (0,97)	8,59 (0,61)‡	7,70 (0,49)‡	6,28 (0,56)* †
PMN total ($\times 10^3/uL$)	10,19 (0,94)	5,54 (0,56)*	4,42 (0,41)*	3,91 (0,68)*
PMN (%)	82 (2,53)	63,68 (3)	56,69 (2,88)	58,94 (4,97)
Linfos total ($\times 10^3/uL$)	1,09 (0,10)	1,95 (0,17)‡	2,36 (0,21)	1,64 (0,15)
Linfos (%)	9,89 (1,30)	23,39 (1,97)‡	31,13 (2,46)	28,57 (3,58)
Eos total ($\times 10^3/uL$)	0,10 (0,04)	0,29 (0,08)	0,26 (0,06)	0,22 (0,08)
Eos (%)	1,28 (0,48)	3,33 (0,93)	3,19 (0,71)	3,81 (1,44)
Fibrinógeno (mg/dl)	505,8 (44,14)	471,33 (26,26)	457,50 (31,86)	301,75 (13,53)*
PCR (mg/dl)	9,28 (2,05)	0,79 (0,26)*	1,16 (0,34)*	0,58 (0,13)*

Eos: eosinófilos; linfos: linfocitos; Leu: leucocitos; PMN: leucocitos polimorfonucleares; PCR: Proteína C reactiva. * $p < 0,001$ respecto a EEPOC. † $p < 0,001$ respecto a estable. ‡ $p < 0,05$ respecto a EEPOC.

Mecanismos de inflamación

La determinación de indicadores indirectos de estrés oxidativo demuestra una mayor carga oxidativa, traducida por una mayor presencia de antioxidantes en el sobrenadante de esputo de los pacientes con EPOC, tanto estables como

agudizados respecto a los controles. Sin embargo, los niveles de TAS en esputo fueron inferiores en agudizados que en fase estable ($p < 0,05$) aunque significativamente mayores en fase estable que los controles ($p < 0,05$) (Figura 25). La agudización de EPOC se relacionó con una mayor actividad NF- κ B en macrófagos de esputo que disminuye en fase estable ($p < 0,05$) y que fue mayor que los controles no fumadores ($p < 0,01$) (Figura 25). La actividad HDAC en macrófagos estaba disminuida respecto a controles no fumadores ($p < 0,001$) pero sin diferencia entre agudización y fase estable. La disminución de la actividad HDAC se correlacionó de forma significativamente con mayores niveles de IL-8 ($r^2 = 0,38$, $p < 0,05$) (Figura 26). No se encontraron correlaciones significativas entre los niveles de activación de NF- κ B o de estrés oxidativo con el resto de parámetros inflamatorios.

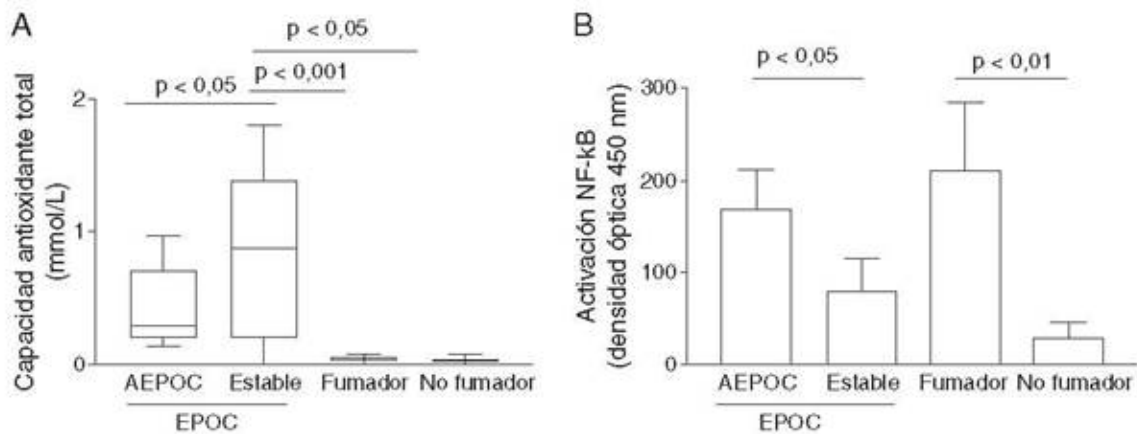


Fig. 25. Niveles de estrés oxidativo en esputo medidos por la capacidad antioxidante total (Panel A). Diferencias en los niveles de activación del factor nuclear kappa B (Panel B) en extractos nucleares de macrófagos de esputo

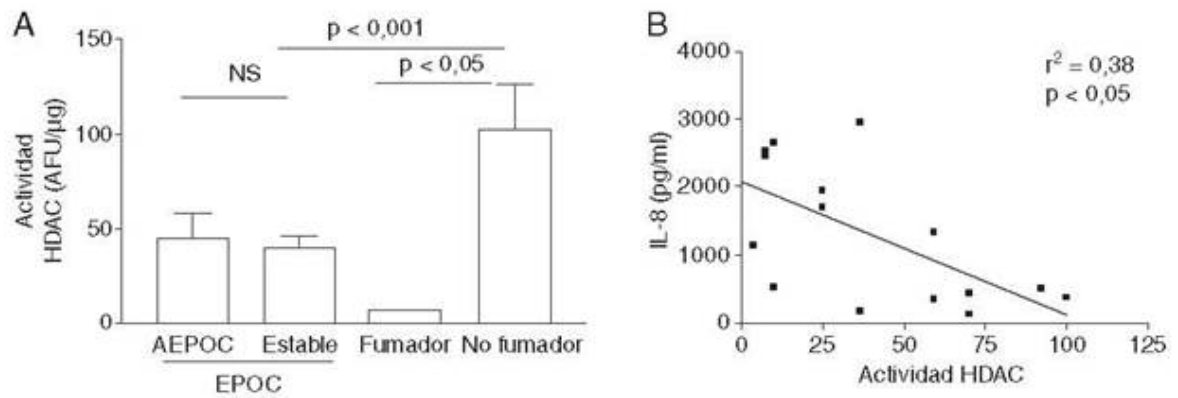


Fig. 26. Reducción de la actividad HDAC en pacientes fumadores y pacientes con EPOC (Panel A). Esta reducción esta inversamente correlacionada con los niveles de interleucina 8 en esputo (Panel B).

Función pulmonar

Los pacientes con EPOC presentaron una recuperación significativa de la función pulmonar a los tres meses de la agudización ($p < 0,05$) (Figura 27) sin encontrarse correlación con los parámetros de inflamación pulmonar.

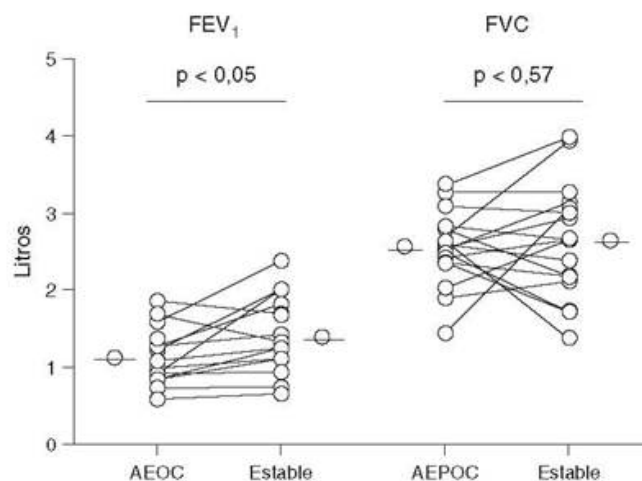


Fig. 27. Diferencias en volumen espirado en el primer segundo (FEV1) y capacidad vital forzada (FVC) durante la agudización y durante la fase estable.

Discusión

En nuestro estudio encontramos que durante las EEPOC se observan cambios en diferentes marcadores inflamatorios pulmonares y sistémicos que se acompañan de un deterioro significativo de la función pulmonar, que podrían estar en relación con un aumento del estrés oxidativo y con una mayor activación del NF- κ B. Sin embargo, diversos marcadores de inflamación pulmonar como la concentración de neutrófilos, IL-6 o TNF- α en esputo no cambian significativamente de la agudización a la fase estable, ni tampoco la actividad HDAC, y su afectación se asocia a una mayor producción de IL-8.

Estudios previos

Los mecanismos moleculares de la inflamación que ocurren durante las agudizaciones han sido poco estudiados. Algunos trabajos han demostrado una mayor activación del factor de transcripción nuclear NF- κ B (mediante localización nuclear por inmunocitoquímica pero sin estudiar su actividad real) (Caramori G 2003) y el papel del estrés oxidativo durante las agudizaciones (Drost, Skwarski et al. 2005) que daría lugar a una mayor liberación de citoquinas que inducen mayor expresión de moléculas de adhesión endotelial como el TNF- α , y quimioquinas que atraen a los neutrófilos en la vía aérea como la IL-8. Estudios previos ya han demostrado un aumento de IL-8 y neutrófilos durante las fases de agudización (Fujimoto, Yasuo et al. 2005). Sin embargo, ningún estudio previo había investigado el mecanismo molecular que regula esta transcripción inflamatoria mediante la activación de la actividad HDAC de las células implicadas en este proceso inflamatorio. Esto puede tener especial relevancia ya que se ha demostrado que incrementar la actividad HDAC durante las agudizaciones potenciando la actividad antiinflamatoria de los glucocorticoides con un estimulador de la actividad HDAC, como es la teofilina a dosis bajas, se traduce en una menor inflamación pulmonar y mejores parámetros clínicos (Cosio, Iglesias et al. 2009).

Interpretación de los resultados obtenidos

Varios factores se han identificado como desencadenantes de una agudización: infección, polución, etc. Además, hay evidencia suficiente para afirmar que la

inflamación juega un rol preponderante en la fisiopatología de la EPOC (Bhowmik, Seemungal et al. 2000, Gompertz, Bayley et al. 2001, Saetta, Turato et al. 2001, Wedzicha and Seemungal 2007). En nuestro estudio demostramos que, en el esputo de los pacientes agudizados, existe un aumento de la inflamación pulmonar y sistémica. Los pacientes con EPOC estable tienen una respuesta inflamatoria caracterizada por un incremento de macrófagos y linfocitos T CD8⁺ en la pared del árbol traqueobronquial y de neutrófilos en la luz de las vías respiratorias. Esta evidencia permite asumir que la inflamación de la vía aérea está amplificadas, esto conduce a incremento del tono bronquial, edema de la pared y aumento de la producción de moco, lo que clínicamente se traduce en empeoramiento de la disnea, tos, esputo y alteración del intercambio de gases, dando lugar a los síntomas de la exacerbación. La mayor inflamación de la vía aérea durante las agudizaciones también se acompaña de mayor inflamación a nivel sistémico, lo que se ha sugerido que pudiera tener un papel sobre la mayor morbilidad cardiovascular (Hurst, Perera et al. 2006). Los mecanismos de este proceso inflamatorio no son bien conocidos, y aquí demostramos que el estrés oxidativo y la activación del factor NF-κB, vía inflamatoria donde convergen diferentes estímulos tanto infecciosos como de otra índole, juegan un papel predominante. Sin embargo, la actividad HDAC, uno de los mecanismos moleculares que regula la transcripción de genes inflamatorios en el núcleo celular, que basalmente está disminuida en la EPOC (Ito, Ito et al. 2005) y que es responsable de la corticorresistencia observada en el proceso inflamatorio de la EPOC estable (Cosio, Tsaprouni et al. 2004), no se incrementa durante el tratamiento de la agudización con glucocorticoides, lo que creemos que podría ser responsable de la persistencia de marcadores inflamatorios elevados tres meses tras la agudización. En nuestro estudio encontramos que esta actividad se correlaciona con los niveles de IL-8, potente factor quimiotáctico de los neutrófilos, lo que puede contribuir a la persistencia del proceso inflamatorio tras la agudización, y se traduce a su vez en persistencia de neutrófilos en la vía aérea, así como persistencia de niveles elevados de IL-6 y TNF-alfa. Perera et al (Perera, Hurst et al. 2007) relacionan los cambios inflamatorios presentes en la exacerbación de EPOC y la falta de recuperación y recurrencia en los siguientes 50 días, midiendo las

concentraciones de IL-6 y PCR en plasma e IL-6 y 8 en esputo en pacientes EPOC en fase estable, en exacerbación y a los 7, 14 y 35 días post-exacerbación. La falta de mejoría sintomática tras la exacerbación se asoció a elevación persistente de la inflamación sistémica. La persistencia de neutrofilia en esputo y de estrés oxidativo en fase estable observada en nuestro estudio puede ir en la misma línea. Pinto-Plata et al (Pinto-Plata, Livnat et al. 2007) intentaron relacionar citoquinas sistémicas y los cambios fisiológicos y clínicos en pacientes hospitalizados por exacerbación de EPOC. Se encontró una correlación significativa entre los cambios en IL-6, IL-8 y LTB4 y los cambios en el FEV1, desde las 48 horas del ingreso hasta 8 semanas tras el alta.

ESTUDIO III: Ensayo clínico para investigar el mecanismo inflamatorio y su modulación farmacológica en pacientes con agudización

Resultados

Datos clínicos

De los 42 pacientes reclutados originalmente, 7 fueron excluidos dentro de las primeras 24 h debido a una inadecuada de muestra de esputo ($n = 5$), por la ausencia de obstrucción de las vías respiratorias en la primera espirometría ($n = 1$) o la retirada voluntaria de estudio ($n = 1$). Los 35 pacientes restantes (todos varones) entraron en el estudio y fueron asignados al azar para recibir el tratamiento estándar (19 pacientes) o tratamiento estándar más teofilina oral de 100 mg dos veces al día (16 pacientes) (Figura 28).

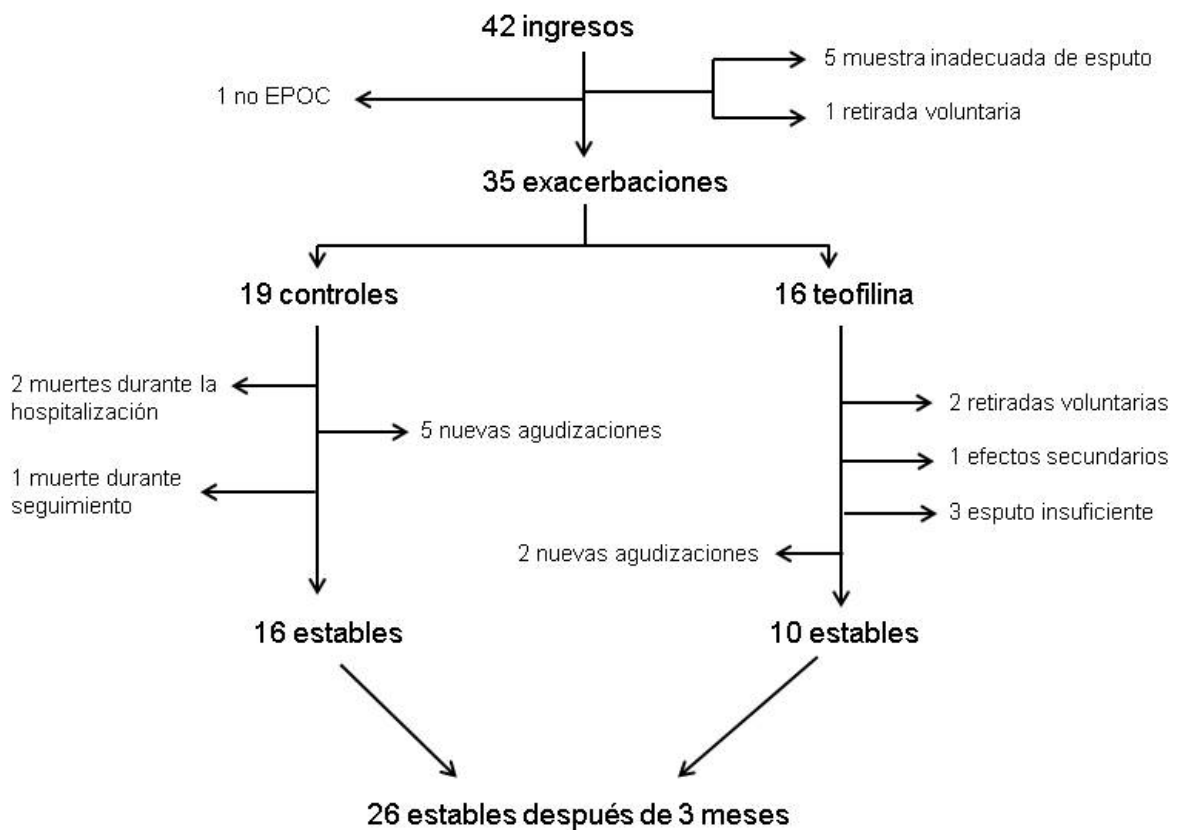


Fig. 28. Diagrama de flujo de los participantes separados en los dos grupos correspondientes.

La Tabla 18 muestra las características demográficas, clínicas y funcionales de todos los participantes. En el grupo de teofilina, 10 pacientes estaban recibiendo tratamiento con una combinación de corticosteroides inhalados y de acción prolongada y 6 recibían tiotropio, mientras que en el grupo control fue el caso en 11 y 9 pacientes, respectivamente. Las historias de exacerbaciones previas revelaron que, en el grupo de teofilina, 3 pacientes habían tenido ≥ 2 exacerbaciones y 3 habían tenido 1 exacerbación en el año anterior, mientras que en el grupo control 2 pacientes habían tenido ≥ 2 exacerbaciones y 5 habían tenido 1 exacerbación en el año anterior.

Todos los pacientes fueron tratados con corticosteroides sistémicos que fueron administrados durante el ingreso. La dosis y duración del tratamiento no se estandarizó, y se individualizó según los síntomas y el examen físico. Todos los pacientes tenían una prescripción de prednisona oral al alta. La dosis total media fue de 590 mg (intervalo de 400 a 920) y la media del tiempo total de tratamiento con corticosteroides fue de 18 días (15-30) en el grupo de teofilina y 600 mg (425 a 1000) y 19 días (15-32) en el grupo control. Estas cifras no fueron estadísticamente diferentes. De los 35 pacientes estudiados, 27 fueron tratados con antibióticos (12 en el grupo de teofilina y 15 en el grupo de tratamiento estándar, $p = 0,15$). Los antibióticos administrados fueron amoxicilina/clavulánico en 19 pacientes, levofloxacino en 6 pacientes y trimetoprim / sulfametoxazol en 2 pacientes

Tabla 18. Características demográficas y clínicas de los pacientes con EPOC en el momento de la admisión

	Todos (n= 35)	Teofilina (n= 16)	Tratamiento estándar (n= 19)
Edad (años)	67,6 (1,3)	66,7 (1,7)	68,2 (2,1)
Sexo (V/M)	35/0	16/0	19/0
Paquetes año	58,6 (4,3)	62,9 (6,9)	54,1 (6,4)
Fumadores activos	15 (42%)	8 (50%)	7 (37%)
Índice Charlson	1,83 (0,2)	1,77 (0,3)	1,88 (0,2)
FEV ₁ (L)	1,03 (0,1)	0,99 (0,1)	1,11 (0,1)
FEV ₁ (%)	38,4 (2,1)	39,2 (3,8)	37,7 (1,9)
FEV ₁ /FVC (%)	46,39 (1,9)	45,34 (3,3)	47,89 (2,7)
Reversibilidad salbutamol (%)	5,17 (1,3)	7,33 (1,6)	3,89 (1,6)
ICS, n (%)	21 (60%)	11 (68%)	10 (53%)
PaO ₂ (mm Hg)	56,4 (1,6)	53,7 (2,4)	58,6 (1,7)
PaCO ₂ (mm Hg)	45,6 (1,7)	48,4 (2,5)	42,7 (2,2)

Los valores son la media (SEM) a menos que se indique lo contrario. FEV₁: volumen espiratorio forzado en 1 s; FVC, la capacidad vital forzada; ICS, corticosteroides inhalados; PaO₂, PaCO₂, tensiones de oxígeno arterial y dióxido de carbono.

Cuatro pacientes en el grupo de teofilina y 3 en el grupo control tenían un cultivo de esputo en el momento del ingreso con crecimiento de bacterias potencialmente patógenas. Las bacterias aisladas fueron *Pseudomonas aeruginosa* (2), *Stenotrophomona sp* (1), *Haemophilus influenzae* (2), *Streptococcus pneumoniae* (1) y *Proteus mirabilis* (1). Dos pacientes murieron durante la hospitalización, ambos en el grupo de tratamiento estándar. La

duración de la estancia hospitalaria no fue diferente entre los dos grupos (6,31 (0,27) días en el grupo de teofilina vs 7,35 (1,05) días en el grupo que recibió la terapia estándar, $p = 0,38$). Después del alta, 2 pacientes en el grupo de teofilina (12,5%) y 5 en el grupo de tratamiento estándar (26%) tuvieron una nueva exacerbación. La teofilina se mantuvo durante la nueva admisión y ambos pacientes recibieron esteroides sistémicos y antibióticos (uno amoxicilina/clavulánico y el otro levofloxacino) y se dieron de alta después de 7 y 10 días de ingreso, respectivamente. El tiempo medio para una nueva exacerbación fue de 36 días (rango 32-40) en el grupo de teofilina y 32 días (rango 12-46) en el grupo control. Hubo una muerte adicional en el grupo de tratamiento estándar durante el seguimiento. Algunos pacientes se perdieron durante el seguimiento debido a la falta de voluntad para participar ($n = 2$), la interrupción de la teofilina debido a los efectos secundarios ($n = 1$) o una muestra de esputo insuficiente ($n = 3$). Como resultado, 16 de los 19 pacientes en el grupo de tratamiento estándar y 10 de la 16 en el grupo de teofilina fueron estudiados de nuevo cuando estuvieron clínicamente estables (Figura 28). En comparación con las mediciones obtenidas en la sala de urgencias, el FEV₁ mejoró en un 24% (intervalo de confianza del 95% (IC) del 2% al 45%) durante la estabilidad clínica en los pacientes que recibieron el tratamiento estándar y en un 37% (IC del 95%: 1% a 63%) en los que recibieron teofilina ($p < 0,01$ entre los grupos, las diferencias de medias -0,40 l vs -0,25 l).

Efectos anti-inflamatorios de la terapia estándar

Tras el manejo convencional con broncodilatadores, corticoides sistémicos y antibióticos administrados durante la agudización, la activación de NF- κ B en macrófagos de esputo se redujo durante la recuperación de EEPOC en un 34% (IC del 95%: 23,8% a 44%) (Figura 29A). En paralelo, hubo una reducción estadísticamente significativa en la concentración del óxido nítrico en aire exhalado (FeNO) y en los niveles de TNF α , IL6 e IL8 en el sobrenadante del esputo (Figura 30). La actividad antioxidante total (TAS) en el esputo aumentó durante la recuperación en comparación con la exacerbación en un 70% (IC del 95% -4,0% a 145%; 0,55 (0,1) mmol / l vs 0,95 (0,2) mmol / l), aunque la actividad HDAC no cambió significativamente (Figura 29B).

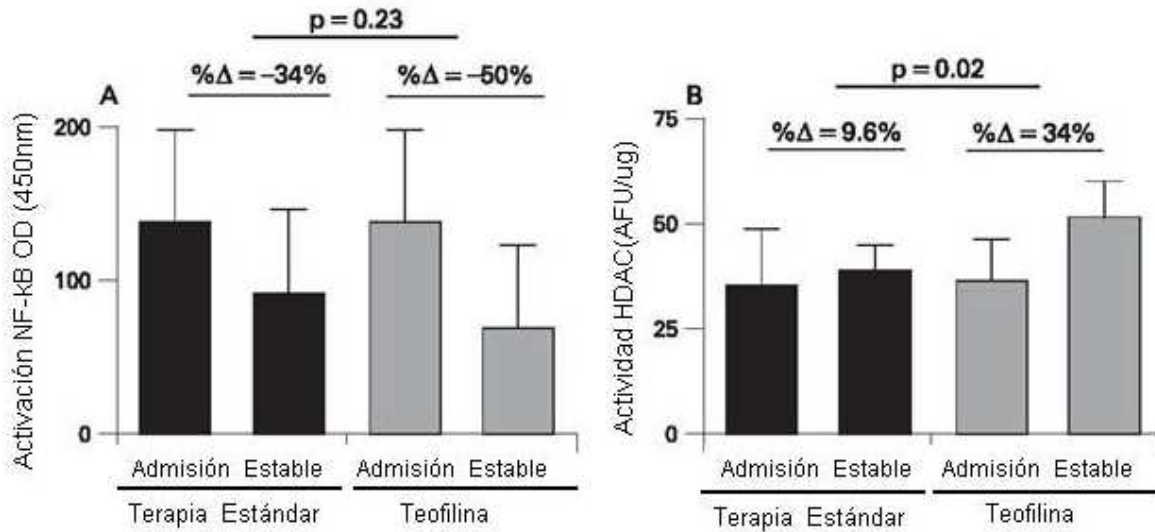


Fig.29. Los valores medios (SEM) de (A) la actividad del factor nuclear kB (NF-kB) y (B) de la histona deacetilasa (HDAC) en pacientes con una exacerbación de la EPOC y 3 meses después de recibir la terapia estándar con o sin teofilina; p valores se refieren a las comparaciones entre los grupos

Efectos anti-inflamatorios de la adición de teofilina

Los niveles (SEM) medios en plasma de teofilina durante el seguimiento fueron 4,6 (1,2) mg / l. Dos pacientes que recibieron teofilina experimentaron náuseas leves y dos pacientes cefaleas. La reducción en la activación de NF-κB o el aumento de la TAS en esputo visto en el grupo de tratamiento estándar no estuvieron influenciadas por la adición de dosis bajas de teofilina (100 mg vía oral cada 12 horas) (Figura 29A). En los pacientes tratados con teofilina, el TAS en el sobrenadante del esputo estaba aumentado en un 105,9% (IC 95%; 56% a 155%; 0,37 (0,1) mmol / l vs 0,69 (0,2) mmol / l) durante la exacerbación en comparación con la fase estable. Además, la adición de dosis bajas de teofilina resultó en un incremento estadísticamente significativo en la actividad HDAC de los macrófagos del esputo (Figura 29B) en comparación con el grupo de terapia estándar que fue acompañado por una mayor reducción en las concentraciones de TNFα y IL8 en el esputo (Figura 30).

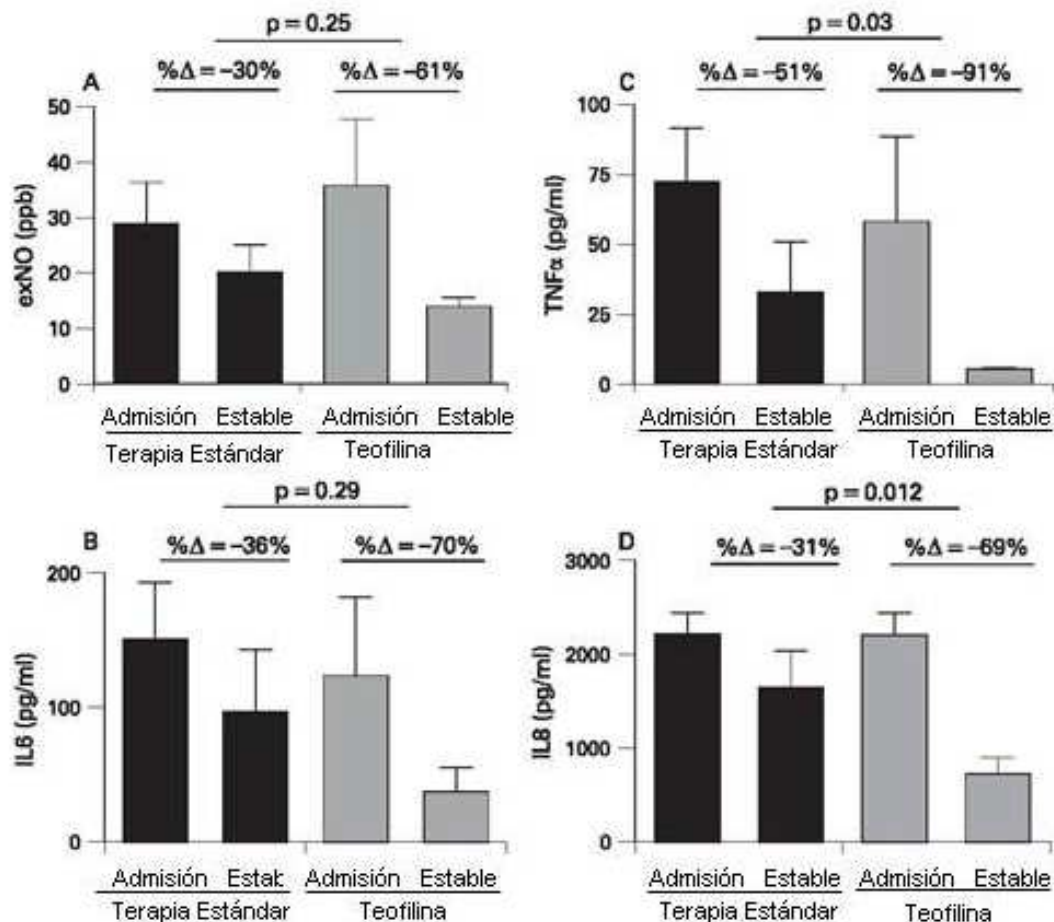


Fig. 30. Niveles (SEM) de (A) la concentración de óxido nítrico en el aire exhalado (exNO), (B) la interleucina-6 (IL6), (C) factor de necrosis tumoral alfa (TNFα) y (D) la interleucina-8 (IL8) en sobrenadantes de esputo en pacientes con una exacerbación de la EPOC, antes y después de recibir la terapia estándar con o sin teofilina; p valores se refieren a las comparaciones entre los grupos

Discusión

Este estudio muestra que dosis bajas de teofilina añadido al tratamiento con glucocorticoides aumenta la actividad de la HDAC y los efectos antiinflamatorios de los esteroides en pacientes varones con EPOC con producción de esputo y hospitalizados por una agudización de la enfermedad.

Estudios previos

Estudios previos demostraron que la actividad HDAC esta reducida en células del pulmón de pacientes con EPOC estable, lo que contribuye a la resistencia a los esteroides observada en el tratamiento de la fase estable de la enfermedad (Barnes, Ito et al. 2004, Ito, Ito et al. 2005), y que tanto la actividad HDAC (Ito, Lim et al. 2002) como la sensibilidad a esteroides (Cosio, Tsaprouni et al. 2004) puede ser restaurada con dosis bajas de teofilina. Este estudio extiende las observaciones anteriores a los pacientes hospitalizados por una exacerbación aguda de la enfermedad (EEPOC).

El estrés oxidativo se ha propuesto como uno de los agentes responsables de la reducción de la actividad de HDAC en pacientes con EPOC estable (Adcock, Cosio et al. 2005). Esto se asocia con la acetilación de la histona-4 del promotor de IL8 que a su vez aumenta la transcripción IL8 (Ito, Ito et al. 2005) y con un aumento de la expresión génica mediada por NF- κ B (Ito, Yamamura et al. 2006). El incremento de la síntesis IL8 contribuye al reclutamiento de neutrófilos, un evento patogénico clave en la EPOC (Barnes 2000). El estrés oxidativo aumenta durante las EEPOC (Drost, Skwarski et al. 2005), pero sus efectos sobre la actividad HDAC no han sido investigados.

Los efectos anti-inflamatorios de la teofilina se habían observado anteriormente, y los mecanismos de acción propuestos variaban desde la inhibición de la fosfodiesterasa (Rabe, Magnussen et al. 1995), aumento de la apoptosis (Yasui, Hu et al. 1997) o la inhibición de NF- κ B (Tomita, Chikumi et al. 1999). Estos efectos anti-inflamatorios directos, sin embargo, se producen en concentraciones mayores de teofilina que los utilizados en la práctica clínica (> 20 mg/l). En contraste, a dosis bajas teofilina aumenta la actividad de la HDAC (Cosio, Tsaprouni et al. 2004), reduce la concentración de neutrófilos en esputo (Culpitt, de Matos et al. 2002) y aumenta los efectos anti-inflamatorios de los glucocorticoides (Ito, Lim et al. 2002). Estos efectos biológicos a dosis bajas de teofilina han sido descritos después del tratamiento a largo plazo (Iiboshi, Ashitani et al. 2007), pero se puede ver después de sólo 4 semanas de tratamiento (Kobayashi, Nasuhara et al. 2004).

Interpretación de los resultados obtenidos

Se encontró que la activación de NF- κ B y la concentración de varios marcadores inflamatorios en el esputo disminuyeron de la exacerbación a la estabilidad clínica, y que la adición de teofilina disminuye aún más la concentración de IL8 y TNF α . Proponemos que estos efectos diferenciales pueden deberse a un efecto específico de la teofilina sobre la actividad HDAC para estos dos genes particulares (Figuras 29 y 30).

El efecto de la teofilina sobre la actividad HDAC se puede explicar por diferentes mecanismos. En primer lugar, el estrés oxidativo provoca disminución en la actividad de HDAC (Adcock, Cosio et al. 2005) y, de acuerdo con estudios previos, (Rahman, Morrison et al. 1996, Drost, Skwarski et al. 2005) hay un aumento del estrés oxidativo durante EEPOC como se indica por la reducción de TAS. Sin embargo, es poco probable que esto contribuya a las diferencias observadas en los pacientes que recibieron teofilina porque la recuperación de TAS fue similar en ambos grupos, sin diferencias estadísticas entre ellos. En segundo lugar, el aumento del estrés nitrativo puede generar peroxinitrito que actúa en los residuos de tirosina de HDAC2 y deteriora la actividad de la enzima (Tomita, Barnes et al. 2003). Como se muestra anteriormente (Agusti, Villaverde et al. 1999), se encontró que la concentración de FeNO, un marcador indirecto del estrés nitrativo, aumentó durante las EEPOC (Figura 30A). Sin embargo, la recuperación FeNO durante la estabilidad clínica mostró una tendencia, aunque no estadísticamente significativa, de mejoría en pacientes que recibieron teofilina (Figura 30A), lo que sugiere que la reducción del estrés nitrosativo puede contribuir a una mayor actividad de HDAC (Figura 29A). Esto estaría en consonancia con estudios previos que muestran que la teofilina reduce el estrés nitrativo *in vitro* y *ex vivo* (Hirano, Yamagata et al. 2006).

Mediante la comparación de la exacerbación con la fase estable 3 meses más tarde, el efecto de una dosis baja de teofilina en la actividad de HDAC no sólo afectaría a los mecanismos inflamatorios durante las exacerbaciones sino que también tendría un efecto sobre la inflamación crónica de base que caracteriza

la EPOC. Sin embargo, la reducción en la activación de NF- κ B vista en la estabilidad en ambos grupos indica que la carga inflamatoria es diferente entre la exacerbación y la fase estable, y el hecho de que la actividad HDAC no se reduzca en la exacerbación en comparación con la fase estable de la EPOC en el grupo de control sugiere que la actividad de HDAC no es capaz de ser modificada solamente por los corticosteroides, lo que confirma las observaciones anteriores (Barnes, Ito et al. 2004, Ito, Ito et al. 2005). Independientemente del mecanismo molecular subyacente que explica una mayor actividad HDAC inducida por la teofilina, está bien establecido que esta última puede mejorar la sensibilidad de los GC en la EPOC (Cosio, Tsaprouni et al. 2004). Esto explicaría la reducción adicional de los marcadores inflamatorios observados en los pacientes que recibieron una dosis baja de teofilina además de la terapia estándar, que incluye el tratamiento con esteroides (Figura 30).

CONCLUSIONES

- 1- Nuestros datos proporcionan información nueva acerca de los mecanismos moleculares utilizados por *H. influenzae* para activar la respuesta inflamatoria en los macrófagos, que son relevantes en las EEPOC.
 - a. Induce una disminución de la actividad HDAC que se puede revertir con concentraciones bajas de teofilina.
 - b. La resistencia relativa de la expresión de IL-8 puede ser suprimida por los glucocorticoides en presencia de concentraciones bajas de teofilina.
- 2- Las agudizaciones de la EPOC se acompañan de cambios inflamatorios, tanto a nivel pulmonar como sistémico, que no se resuelven por completo tras la agudización.
- 3- En el mecanismo molecular de los cambios inflamatorios pulmonares participan el estrés oxidativo y el factor nuclear NF- κ B.
 - a. La mayor activación del factor nuclear NF- κ B observada durante la agudización disminuye en fase estable en probable relación con el tratamiento glucocorticoideo.
 - b. La actividad HDAC no disminuye en la fase estable y podría ser la responsable de la persistencia de la inflamación neutrofílica tras la agudización.
- 4- Las dosis bajas de teofilina aumenta la actividad de la HDAC y además reduce la inflamación cuando se añade al régimen terapéutico estándar de las EEPOC.
- 5- Las implicaciones clínicas de estas observaciones moleculares merecen ser investigadas en un ensayo más grande, aleatorizado, controlado con placebo, para estudiar su relevancia clínica.

BIBLIOGRAFÍA

- Aaron, S. D., J. B. Angel, M. Lunau, K. Wright, C. Fex, N. Le Saux and R. E. Dales (2001). "Granulocyte inflammatory markers and airway infection during acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease." Am J Respir Crit Care Med **163**(2): 349-355.
- Aaron, S. D., K. L. Vandemheen, P. Hebert, R. Dales, I. G. Stiell, J. Ahuja, G. Dickinson, R. Brison, B. H. Rowe, J. Dreyer, E. Yetisir, D. Cass and G. Wells (2003). "Outpatient oral prednisone after emergency treatment of chronic obstructive pulmonary disease." N Engl J Med **348**(26): 2618-2625.
- Adcock, I. M. (2003). "Glucocorticoids: new mechanisms and future agents." Curr Allergy Asthma Rep **3**(3): 249-257.
- Adcock, I. M., B. Cosio, L. Tsaprouni, P. J. Barnes and K. Ito (2005). "Redox regulation of histone deacetylases and glucocorticoid-mediated inhibition of the inflammatory response." Antioxid Redox Signal **7**(1-2): 144-152.
- Adcock, I. M., K. Ito and P. J. Barnes (2004). "Glucocorticoids: effects on gene transcription." Proc Am Thorac Soc **1**(3): 247-254.
- Adcock, I. M. and S. J. Lane (2003). "Corticosteroid-insensitive asthma: molecular mechanisms." J Endocrinol **178**(3): 347-355.
- Adcock, I. M. and K. Y. Lee (2006). "Abnormal histone acetylase and deacetylase expression and function in lung inflammation." Inflamm Res **55**(8): 311-321.
- Adler, K. B., D. D. Hendley and G. S. Davis (1986). "Bacteria associated with obstructive pulmonary disease elaborate extracellular products that stimulate mucin secretion by explants of guinea pig airways." Am J Pathol **125**(3): 501-514.
- Agusti, A., P. M. Calverley, B. Celli, H. O. Coxson, L. D. Edwards, D. A. Lomas, W. MacNee, B. E. Miller, S. Rennard, E. K. Silverman, R. Tal-Singer, E. Wouters, J. C. Yates, J. Vestbo and C. L. t. I. P. S. E. i. Evaluation of (2010). "Characterisation of COPD heterogeneity in the ECLIPSE cohort." Respir Res **11**: 122.
- Agusti, A. G., J. M. Villaverde, B. Togores and M. Bosch (1999). "Serial measurements of exhaled nitric oxide during exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease." Eur Respir J **14**(3): 523-528.
- Albert, R. K., J. Connett, W. C. Bailey, R. Casaburi, J. A. Cooper, Jr., G. J. Criner, J. L. Curtis, M. T. Dransfield, M. K. Han, S. C. Lazarus, B. Make, N. Marchetti, F. J. Martinez, N. E. Madinger, C. McEvoy, D. E. Niewoehner, J. Porsasz, C. S. Price, J. Reilly, P. D. Scanlon, F. C. Scirba, S. M. Scharf, G. R. Washko, P. G. Woodruff, N. R. Anthonisen and C. C. R. Network (2011). "Azithromycin for prevention of exacerbations of COPD." N Engl J Med **365**(8): 689-698.
- Anderson, H. R., C. Spix, S. Medina, J. P. Schouten, J. Castellsague, G. Rossi, D. Zmirou, G. Touloumi, B. Wojtyniak, A. Ponka, L. Bacharova, J. Schwartz and K. Katsouyanni (1997). "Air pollution and daily admissions for chronic obstructive pulmonary disease in 6 European cities: results from the APHEA project." Eur Respir J **10**(5): 1064-1071.

Anthonisen, N. R., J. Manfreda, C. P. Warren, E. S. Hershfield, G. K. Harding and N. A. Nelson (1987). "Antibiotic therapy in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease." Ann Intern Med **106**(2): 196-204.

Ashburner, B. P., S. D. Westerheide and A. S. Baldwin, Jr. (2001). "The p65 (RelA) subunit of NF-kappaB interacts with the histone deacetylase (HDAC) corepressors HDAC1 and HDAC2 to negatively regulate gene expression." Mol Cell Biol **21**(20): 7065-7077.

Au, D. H., C. L. Bryson, J. W. Chien, H. Sun, E. M. Udris, L. E. Evans and K. A. Bradley (2009). "The effects of smoking cessation on the risk of chronic obstructive pulmonary disease exacerbations." J Gen Intern Med **24**(4): 457-463.

Balbi, B., C. Bason, E. Balleari, F. Fiasella, A. Pesci, R. Ghio and F. Fabiano (1997). "Increased bronchoalveolar granulocytes and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor during exacerbations of chronic bronchitis." Eur Respir J **10**(4): 846-850.

Balbi B, B. C., Balleari E, Fiasella F, Pesci A, Ghio R, Fabiano F (1997). "Increased bronchoalveolar granulocytes and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor during exacerbations of chronic bronchitis." Eur Respir J Suppl **10**.

Banchereau, J., F. Briere, C. Caux, J. Davoust, S. Lebecque, Y. J. Liu, B. Pulendran and K. Palucka (2000). "Immunobiology of dendritic cells." Annu Rev Immunol **18**: 767-811.

Barcelo, A., F. Barbe, M. de la Pena, M. Vila, G. Perez, J. Pierola, J. Duran and A. G. Agusti (2006). "Antioxidant status in patients with sleep apnoea and impact of continuous positive airway pressure treatment." Eur Respir J **27**(4): 756-760.

Barker, D. J., K. M. Godfrey, C. Fall, C. Osmond, P. D. Winter and S. O. Shaheen (1991). "Relation of birth weight and childhood respiratory infection to adult lung function and death from chronic obstructive airways disease." BMJ **303**(6804): 671-675.

Barnes, P. J. (1996). "Molecular mechanisms of steroid action in asthma." J Allergy Clin Immunol **97**(1 Pt 2): 159-168.

Barnes, P. J. (1997). "Nuclear factor-kappa B." Int J Biochem Cell Biol **29**(6): 867-870.

Barnes, P. J. (1998). "Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms." Clin Sci (Lond) **94**(6): 557-572.

Barnes, P. J. (2000). "Chronic obstructive pulmonary disease." N Engl J Med **343**(4): 269-280.

Barnes, P. J. (2000). "Inhaled corticosteroids are not beneficial in chronic obstructive pulmonary disease." Am J Respir Crit Care Med **161**(2 Pt 1): 342-344; discussion 344.

Barnes, P. J. (2003). "New concepts in chronic obstructive pulmonary disease." Annu Rev Med **54**: 113-129.

Barnes, P. J. (2003). "Theophylline: new perspectives for an old drug." Am J Respir Crit Care Med **167**(6): 813-818.

Barnes, P. J. (2004). "Mediators of chronic obstructive pulmonary disease." Pharmacol Rev **56**(4): 515-548.

Barnes, P. J. (2006). "Reduced histone deacetylase in COPD: clinical implications." Chest **129**(1): 151-155.

Barnes, P. J. (2006). "Transcription factors in airway diseases." Lab Invest **86**(9): 867-872.

Barnes, P. J. (2009). "Histone deacetylase-2 and airway disease." Ther Adv Respir Dis **3**(5): 235-243.

Barnes, P. J. (2009). "Role of HDAC2 in the pathophysiology of COPD." Annu Rev Physiol **71**: 451-464.

Barnes, P. J. (2013). "Theophylline." Am J Respir Crit Care Med **188**(8): 901-906.

Barnes, P. J. (2014). "Cellular and molecular mechanisms of chronic obstructive pulmonary disease." Clin Chest Med **35**(1): 71-86.

Barnes, P. J. and I. M. Adcock (2009). "Glucocorticoid resistance in inflammatory diseases." Lancet **373**(9678): 1905-1917.

Barnes, P. J., I. M. Adcock and K. Ito (2005). "Histone acetylation and deacetylation: importance in inflammatory lung diseases." Eur Respir J **25**(3): 552-563.

Barnes, P. J., K. Ito and I. M. Adcock (2004). "Corticosteroid resistance in chronic obstructive pulmonary disease: inactivation of histone deacetylase." Lancet **363**(9410): 731-733.

Barnes, P. J. and M. Karin (1997). "Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases." N Engl J Med **336**(15): 1066-1071.

Beckett, D. (2001). "Regulated assembly of transcription factors and control of transcription initiation." J Mol Biol **314**(3): 335-352.

Betsuyaku, T., M. Nishimura, K. Takeyabu, M. Tanino, P. Venge, S. Xu and Y. Kawakami (1999). "Neutrophil granule proteins in bronchoalveolar lavage fluid from subjects with subclinical emphysema." Am J Respir Crit Care Med **159**(6): 1985-1991.

Bhowmik, A., T. A. Seemungal, G. C. Donaldson and J. A. Wedzicha (2005). "Effects of exacerbations and seasonality on exhaled nitric oxide in COPD." Eur Respir J **26**(6): 1009-1015.

Bhowmik, A., T. A. Seemungal, R. J. Sapsford and J. A. Wedzicha (2000). "Relation of sputum inflammatory markers to symptoms and lung function changes in COPD exacerbations." Thorax **55**(2): 114-120.

Biernacki, W. A., S. A. Kharitonov and P. J. Barnes (2003). "Increased leukotriene B4 and 8-isoprostane in exhaled breath condensate of patients with exacerbations of COPD." Thorax **58**(4): 294-298.

Bowie, A. and L. A. O'Neill (2000). "Oxidative stress and nuclear factor-kappaB activation: a reassessment of the evidence in the light of recent discoveries." Biochem Pharmacol **59**(1): 13-23.

Bowman, E. P., J. J. Campbell, K. M. Druey, A. Scheschonka, J. H. Kehrl and E. C. Butcher (1998). "Regulation of chemotactic and proadhesive responses to chemoattractant receptors by RGS (regulator of G-protein signaling) family members." J Biol Chem **273**(43): 28040-28048.

Bresser, P., T. A. Out, L. van Alphen, H. M. Jansen and R. Lutter (2000). "Airway inflammation in nonobstructive and obstructive chronic bronchitis with chronic haemophilus influenzae airway infection. Comparison with noninfected patients with chronic obstructive pulmonary disease." Am J Respir Crit Care Med **162**(3 Pt 1): 947-952.

Brightling, C. E., W. Monteiro, R. Ward, D. Parker, M. D. Morgan, A. J. Wardlaw and I. D. Pavord (2000). "Sputum eosinophilia and short-term response to prednisolone in chronic obstructive pulmonary disease: a randomised controlled trial." Lancet **356**(9240): 1480-1485.

Brostjan, C., J. Anrather, V. Csizmadia, D. Stroka, M. Soares, F. H. Bach and H. Winkler (1996). "Glucocorticoid-mediated repression of NFkappaB activity in endothelial cells does not involve induction of IkappaBalpha synthesis." J Biol Chem **271**(32): 19612-19616.

Brutsche, M. H., S. H. Downs, C. Schindler, M. W. Gerbase, J. Schwartz, M. Frey, E. W. Russi, U. Ackermann-Liebrich, P. Leuenberger and S. Team (2006). "Bronchial hyperresponsiveness and the development of asthma and COPD in asymptomatic individuals: SAPALDIA cohort study." Thorax **61**(8): 671-677.

Bucchioni, E., S. A. Kharitonov, L. Allegra and P. J. Barnes (2003). "High levels of interleukin-6 in the exhaled breath condensate of patients with COPD." Respir Med **97**(12): 1299-1302.

Buist, A. S., M. A. McBurnie, W. M. Vollmer, S. Gillespie, P. Burney, D. M. Mannino, A. M. Menezes, S. D. Sullivan, T. A. Lee, K. B. Weiss, R. L. Jensen, G. B. Marks, A. Gulsvik, E. Nizankowska-Mogilnicka and B. C. R. Group (2007). "International variation in the prevalence of COPD (the BOLD Study): a population-based prevalence study." Lancet **370**(9589): 741-750.

Burge, P. S., P. M. Calverley, P. W. Jones, S. Spencer, J. A. Anderson and T. K. Maslen (2000). "Randomised, double blind, placebo controlled study of fluticasone propionate in patients with moderate to severe chronic obstructive pulmonary disease: the ISOLDE trial." BMJ **320**(7245): 1297-1303.

Burge, S. and J. A. Wedzicha (2003). "COPD exacerbations: definitions and classifications." Eur Respir J Suppl **41**: 46s-53s.

Calverley, P. M., J. A. Anderson, B. Celli, G. T. Ferguson, C. Jenkins, P. W. Jones, J. C. Yates, J. Vestbo and T. investigators (2007). "Salmeterol and fluticasone propionate and survival in chronic obstructive pulmonary disease." N Engl J Med **356**(8): 775-789.

Calle Rubio, M., B. M. Chacón and J. L. Rodríguez Hermosa (2010). "Exacerbación de la EPOC." Archivos de Bronconeumología **46**(Supl.7): 21-25.

Campbell, E. J., M. A. Campbell and C. A. Owen (2000). "Bioactive proteinase 3 on the cell surface of human neutrophils: quantification, catalytic activity, and susceptibility to inhibition." J Immunol **165**(6): 3366-3374.

Cantin AM, F. G., Hubbard RC, and Crystal RG (1999). "Antioxidant macromolecules in the epithelial lining fluid of the normal human lower respiratory tract." J Clin Invest **14**.

Capelli, A., A. Di Stefano, I. Gnemmi, P. Balbo, C. G. Cerutti, B. Balbi, M. Lusuardi and C. F. Donner (1999). "Increased MCP-1 and MIP-1beta in bronchoalveolar lavage fluid of chronic bronchitics." Eur Respir J **14**(1): 160-165.

Caramori, G., P. Casolari and I. Adcock (2013). "Role of transcription factors in the pathogenesis of asthma and COPD." Cell Commun Adhes **20**(1-2): 21-40.

Caramori G, R. M., Casolari P, Bellettato C, Casoni G, Boschetto P, Chung KF, Barnes PJ, Adcock IM, Ciaccia A, Fabbri LM, Papi A. (2003). "Nuclear localisation of p65 in sputum macrophages but not in sputum neutrophils during COPD exacerbations." Thorax **58**.

Carter AB, M. M., Hunninghake GW. (1998). "Lipopolysaccharide-induced NF-kappaB activation and cytokine release in human alveolar macrophages is PKC-independent and TK- and PC-PLC-dependent." Am J Respir Cell Mol Biol **18**.

Cataldo, D., C. Munaut, A. Noel, F. Frankenne, P. Bartsch, J. M. Foidart and R. Louis (2000). "MMP-2- and MMP-9-linked gelatinolytic activity in the sputum from patients with asthma and chronic obstructive pulmonary disease." Int Arch Allergy Immunol **123**(3): 259-267.

Celli, B. R. and P. J. Barnes (2007). "Exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease." Eur Respir J **29**(6): 1224-1238.

Comhair, S. A. and S. C. Erzurum (2002). "Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **283**(2): L246-255.

Cosío, A. G. N. A. a. B. G. (2006). Emphysema, General. CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE. G. J. L. S. D. Shapiro.

Cosio, A. K. y. B. (2008). Mecanismos de exacerbación de la EPOC: Biomarcadores. Medicina Respiratoria. J. Sanchís. **1**.

Cosio, B. G., A. Iglesias, A. Rios, A. Noguera, E. Sala, K. Ito, P. J. Barnes and A. Agusti (2009). "Low-dose theophylline enhances the anti-inflammatory effects of steroids during exacerbations of COPD." Thorax **64**(5): 424-429.

Cosio, B. G., A. Torrego and I. M. Adcock (2005). "[Molecular mechanisms of glucocorticoids]." Arch Bronconeumol **41**(1): 34-41.

Cosio, B. G., L. Tsaprouni, K. Ito, E. Jazrawi, I. M. Adcock and P. J. Barnes (2004). "Theophylline restores histone deacetylase activity and steroid responses in COPD macrophages." J Exp Med **200**(5): 689-695.

Cosio, M. G., J. Majo and M. G. Cosio (2002). "Inflammation of the airways and lung parenchyma in COPD: role of T cells." Chest **121**(5 Suppl): 160S-165S.

Crooks, S. W., D. L. Bayley, S. L. Hill and R. A. Stockley (2000). "Bronchial inflammation in acute bacterial exacerbations of chronic bronchitis: the role of leukotriene B4." Eur Respir J **15**(2): 274-280.

Crothers, K., L. Huang, J. L. Goulet, M. B. Goetz, S. T. Brown, M. C. Rodriguez-Barradas, K. K. Oursler, D. Rimland, C. L. Gibert, A. A. Butt and A. C. Justice (2011). "HIV infection and risk for incident pulmonary diseases in the combination antiretroviral therapy era." Am J Respir Crit Care Med **183**(3): 388-395.

Culpitt, S. V., C. de Matos, R. E. Russell, L. E. Donnelly, D. F. Rogers and P. J. Barnes (2002). "Effect of theophylline on induced sputum inflammatory indices and neutrophil chemotaxis in chronic obstructive pulmonary disease." Am J Respir Crit Care Med **165**(10): 1371-1376.

Culpitt, S. V., W. Maziak, S. Loukidis, J. A. Nightingale, J. L. Matthews and P. J. Barnes (1999). "Effect of high dose inhaled steroid on cells, cytokines, and proteases in induced sputum in chronic obstructive pulmonary disease." Am J Respir Crit Care Med **160**(5 Pt 1): 1635-1639.

Culpitt, S. V., D. F. Rogers, P. Shah, C. De Matos, R. E. Russell, L. E. Donnelly and P. J. Barnes (2003). "Impaired inhibition by dexamethasone of cytokine release by alveolar macrophages from patients with chronic obstructive pulmonary disease." Am J Respir Crit Care Med **167**(1): 24-31.

Chaudhuri, N., S. K. Dower, M. K. Whyte and I. Sabroe (2005). "Toll-like receptors and chronic lung disease." Clin Sci (Lond) **109**(2): 125-133.

Chen, L., W. Fischle, E. Verdin and W. C. Greene (2001). "Duration of nuclear NF-kappaB action regulated by reversible acetylation." Science **293**(5535): 1653-1657.

Chorostowska-Wynimko, J., J. Kus and E. Skopinska-Rozewska (2007). "Theophylline inhibits free oxygen radicals production by human monocytes via phosphodiesterase inhibition." J Physiol Pharmacol **58 Suppl 5**(Pt 1): 95-103.

Chung, K. F. (2001). "Cytokines in chronic obstructive pulmonary disease." Eur Respir J Suppl **34**: 50s-59s.

David, G., M. A. Neptune and R. A. DePinho (2002). "SUMO-1 modification of histone deacetylase 1 (HDAC1) modulates its biological activities." J Biol Chem **277**(26): 23658-23663.

Dayal, H. H., S. Khuder, R. Sharrar and N. Trieff (1994). "Passive smoking in obstructive respiratory disease in an industrialized urban population." Environ Res **65**(2): 161-171.

de Boer, W. I., J. K. Sont, A. van Schadewijk, J. Stolk, J. H. van Krieken and P. S. Hiemstra (2000). "Monocyte chemoattractant protein 1, interleukin 8, and chronic airways inflammation in COPD." J Pathol **190**(5): 619-626.

de Godoy, I., M. Donahoe, W. J. Calhoun, J. Mancino and R. M. Rogers (1996). "Elevated TNF-alpha production by peripheral blood monocytes of weight-losing COPD patients." Am J Respir Crit Care Med **153**(2): 633-637.

de Marco, R., S. Accordini, A. Marcon, I. Cerveri, J. M. Anto, T. Gislason, J. Heinrich, C. Janson, D. Jarvis, N. Kuenzli, B. Leynaert, J. Sunyer, C. Svanes, M. Wjst, P. Burney and S. European Community Respiratory Health (2011). "Risk factors for chronic obstructive pulmonary disease in a European cohort of young adults." Am J Respir Crit Care Med **183**(7): 891-897.

de Ruijter, A. J., A. H. van Gennip, H. N. Caron, S. Kemp and A. B. van Kuilenburg (2003). "Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family." Biochem J **370**(Pt 3): 737-749.

Debigare, R., K. Marquis, C. H. Cote, R. R. Tremblay, A. Michaud, P. LeBlanc and F. Maltais (2003). "Catabolic/anabolic balance and muscle wasting in patients with COPD." Chest **124**(1): 83-89.

DeForge, L. E., A. M. Preston, E. Takeuchi, J. Kenney, L. A. Boxer and D. G. Remick (1993). "Regulation of interleukin 8 gene expression by oxidant stress." J Biol Chem **268**(34): 25568-25576.

Dekhuijzen, P. N., K. K. Aben, I. Dekker, L. P. Aarts, P. L. Wielders, C. L. van Herwaarden and A. Bast (1996). "Increased exhalation of hydrogen peroxide in patients with stable and unstable chronic obstructive pulmonary disease." Am J Respir Crit Care Med **154**(3 Pt 1): 813-816.

del Puerto-Nevado, L., S. Pérez-Rial, Á. Girón-Martínez and G. Peces-Barba (2010). "Papel de la inflamación en la etiopatogenia de la EPOC." Archivos de Bronconeumología **46**(Supl.11): 2-7.

Demedts, I. K., G. G. Brusselle, K. R. Bracke, K. Y. Vermaelen and R. A. Pauwels (2005). "Matrix metalloproteinases in asthma and COPD." Curr Opin Pharmacol **5**(3): 257-263.

Demedts, I. K., A. Morel-Montero, S. Lebecque, Y. Pacheco, D. Cataldo, G. F. Joos, R. A. Pauwels and G. G. Brusselle (2006). "Elevated MMP-12 protein levels in induced sputum from patients with COPD." Thorax **61**(3): 196-201.

Di Francia, M., D. Barbier, J. L. Mege and J. Orehek (1994). "Tumor necrosis factor-alpha levels and weight loss in chronic obstructive pulmonary disease." Am J Respir Crit Care Med **150**(5 Pt 1): 1453-1455.

Di Stefano A, C. A., Lusuardi M, Balbo P, Vecchio C, Maestrelli P, Mapp CE, Fabbri LM, Donner CF, Saetta M. (1998). "Severity of airflow limitation is associated with severity of airway inflammation in smokers." Am J Respir Crit Care Med. **158**.

Di Stefano, A., G. Caramori, T. Oates, A. Capelli, M. Lusuardi, I. Gnemmi, F. Ioli, K. F. Chung, C. F. Donner, P. J. Barnes and I. M. Adcock (2002). "Increased expression of nuclear factor-kappaB in bronchial biopsies from smokers and patients with COPD." Eur Respir J **20**(3): 556-563.

Di Stefano, A., P. Maestrelli, A. Roggeri, G. Turato, S. Calabro, A. Potena, C. E. Mapp, A. Ciaccia, L. Covacev, L. M. Fabbri and M. Saetta (1994). "Upregulation of adhesion molecules in the bronchial mucosa of subjects with chronic obstructive bronchitis." Am J Respir Crit Care Med **149**(3 Pt 1): 803-810.

DiMango, E., A. J. Ratner, R. Bryan, S. Tabibi and A. Prince (1998). "Activation of NF-kappaB by adherent Pseudomonas aeruginosa in normal and cystic fibrosis respiratory epithelial cells." J Clin Invest **101**(11): 2598-2605.

Donaldson, G. C., T. Seemungal, D. J. Jeffries and J. A. Wedzicha (1999). "Effect of temperature on lung function and symptoms in chronic obstructive pulmonary disease." Eur Respir J **13**(4): 844-849.

Driessler, F., K. Venstrom, R. Sabat, K. Asadullah and A. J. Schottelius (2004). "Molecular mechanisms of interleukin-10-mediated inhibition of NF-kappaB activity: a role for p50." Clin Exp Immunol **135**(1): 64-73.

Drost, E. M., K. M. Skwarski, J. Sauleda, N. Soler, J. Roca, A. Agusti and W. MacNee (2005). "Oxidative stress and airway inflammation in severe exacerbations of COPD." Thorax **60**(4): 293-300.

Eisner, M. D., J. Balmes, P. P. Katz, L. Trupin, E. H. Yelin and P. D. Blanc (2005). "Lifetime environmental tobacco smoke exposure and the risk of chronic obstructive pulmonary disease." Environ Health **4**(1): 7.

Finlay, G. A., L. R. O'Driscoll, K. J. Russell, E. M. D'Arcy, J. B. Masterson, M. X. FitzGerald and C. M. O'Connor (1997). "Matrix metalloproteinase expression and production by alveolar macrophages in emphysema." Am J Respir Crit Care Med **156**(1): 240-247.

Finlay, G. A., K. J. Russell, K. J. McMahon, M. D'Arcy E, J. B. Masterson, M. X. FitzGerald and C. M. O'Connor (1997). "Elevated levels of matrix metalloproteinases in bronchoalveolar lavage fluid of emphysematous patients." Thorax **52**(6): 502-506.

Fischer, B. M. and J. A. Voynow (2002). "Neutrophil elastase induces MUC5AC gene expression in airway epithelium via a pathway involving reactive oxygen species." Am J Respir Cell Mol Biol **26**(4): 447-452.

Fischle, W., V. Kiermer, F. Dequiedt and E. Verdin (2001). "The emerging role of class II histone deacetylases." Biochem Cell Biol **79**(3): 337-348.

Floreani, A. A., T. A. Wyatt, J. Stoner, S. D. Sanderson, E. G. Thompson, D. Allen-Gipson and A. J. Heires (2003). "Smoke and C5a induce airway epithelial intercellular adhesion molecule-1 and cell adhesion." Am J Respir Cell Mol Biol **29**(4): 472-482.

Fujimoto, K., M. Yasuo, K. Urushibata, M. Hanaoka, T. Koizumi and K. Kubo (2005). "Airway inflammation during stable and acutely exacerbated chronic obstructive pulmonary disease." Eur Respir J **25**(4): 640-646.

Garcia-Aymerich, J., E. Monso, R. M. Marrades, J. Escarrabill, M. A. Felez, J. Sunyer, J. M. Anto and E. Investigators (2001). "Risk factors for hospitalization for a chronic obstructive pulmonary disease exacerbation. EFRAM study." Am J Respir Crit Care Med **164**(6): 1002-1007.

Gaut, J. P., J. Byun, H. D. Tran, W. M. Lauber, J. A. Carroll, R. S. Hotchkiss, A. Belaouaj and J. W. Heinecke (2002). "Myeloperoxidase produces nitrating oxidants in vivo." J Clin Invest **109**(10): 1311-1319.

Gearing, A. J., P. Beckett, M. Christodoulou, M. Churchill, J. Clements, A. H. Davidson, A. H. Drummond, W. A. Galloway, R. Gilbert, J. L. Gordon and et al. (1994). "Processing of tumour necrosis factor-alpha precursor by metalloproteinases." Nature **370**(6490): 555-557.

Gerritsen, W. B., J. Asin, P. Zanen, J. M. van den Bosch and F. J. Haas (2005). "Markers of inflammation and oxidative stress in exacerbated chronic obstructive pulmonary disease patients." Respir Med **99**(1): 84-90.

Gilmour, P. S., I. Rahman, K. Donaldson and W. MacNee (2003). "Histone acetylation regulates epithelial IL-8 release mediated by oxidative stress from environmental particles." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **284**(3): L533-540.

Godoy, I., A. O. Campana, R. R. Geraldo, C. R. Padovani and S. A. Paiva (2003). "Cytokines and dietary energy restriction in stable chronic obstructive pulmonary disease patients." Eur Respir J **22**(6): 920-925.

Gompertz, S., D. L. Bayley, S. L. Hill and R. A. Stockley (2001). "Relationship between airway inflammation and the frequency of exacerbations in patients with smoking related COPD." Thorax **56**(1): 36-41.

Grootendorst, D. C. and K. F. Rabe (2004). "Mechanisms of bronchial hyperreactivity in asthma and chronic obstructive pulmonary disease." Proc Am Thorac Soc **1**(2): 77-87.

Grunstein, M. (1997). "Histone acetylation in chromatin structure and transcription." Nature **389**(6649): 349-352.

Guttridge, D. C., C. Albanese, J. Y. Reuther, R. G. Pestell and A. S. Baldwin, Jr. (1999). "NF-kappaB controls cell growth and differentiation through transcriptional regulation of cyclin D1." Mol Cell Biol **19**(8): 5785-5799.

H, O. (2002). "Neutrophil elastase inhibitors as treatment for COPD." Expert Opin Investig Drugs. **7**(11).

Hageman, G. J., I. Larik, H. J. Pennings, G. R. Haenen, E. F. Wouters and A. Bast (2003). "Systemic poly(ADP-ribose) polymerase-1 activation, chronic inflammation, and oxidative stress in COPD patients." Free Radic Biol Med **35**(2): 140-148.

Halbert, R. J., J. L. Natoli, A. Gano, E. Badamgarav, A. S. Buist and D. M. Mannino (2006). "Global burden of COPD: systematic review and meta-analysis." Eur Respir J **28**(3): 523-532.

Hashimoto, S., A. Kobayashi, K. Kooguchi, Y. Kitamura, H. Onodera and H. Nakajima (2000). "Upregulation of two death pathways of perforin/granzyme and FasL/Fas in septic acute respiratory distress syndrome." Am J Respir Crit Care Med **161**(1): 237-243.

Hayden, M. S. and S. Ghosh (2008). "Shared principles in NF-kappaB signaling." Cell **132**(3): 344-362.

Hellermann, G. R., S. B. Nagy, X. Kong, R. F. Lockey and S. S. Mohapatra (2002). "Mechanism of cigarette smoke condensate-induced acute inflammatory response in human bronchial epithelial cells." Respir Res **3**: 22.

Hidi, R., S. Timmermans, E. Liu, C. Schudt, G. Dent, S. T. Holgate and R. Djukanovic (2000). "Phosphodiesterase and cyclic adenosine monophosphate-dependent inhibition of T-lymphocyte chemotaxis." Eur Respir J **15**(2): 342-349.

Hill, A. T., D. Bayley and R. A. Stockley (1999). "The interrelationship of sputum inflammatory markers in patients with chronic bronchitis." Am J Respir Crit Care Med **160**(3): 893-898.

Hill AT, C. E., Hill SL, Bayley DL, and Stockley RA (2000). "Association between airway bacterial load and markers of airway inflammation in patients with stable chronic bronchitis." Am J Med **109**.

Hirano, T., T. Yamagata, M. Gohda, Y. Yamagata, T. Ichikawa, S. Yanagisawa, K. Ueshima, K. Akamatsu, M. Nakanishi, K. Matsunaga, Y. Minakata and M. Ichinose (2006). "Inhibition of reactive nitrogen species production in COPD airways: comparison of inhaled corticosteroid and oral theophylline." Thorax **61**(9): 761-766.

Hogg, J. C., F. Chu, S. Utokaparch, R. Woods, W. M. Elliott, L. Buzatu, R. M. Cherniack, R. M. Rogers, F. C. Sciurba, H. O. Coxson and P. D. Pare (2004). "The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease." N Engl J Med **350**(26): 2645-2653.

Holm, A. F., T. Godthelp, W. J. Fokkens, E. A. Severijnen, P. G. Mulder, T. M. Vroom and E. Rijntjes (1999). "Long-term effects of corticosteroid nasal spray on nasal inflammatory cells in patients with perennial allergic rhinitis." Clin Exp Allergy **29**(10): 1356-1366.

Huang Q, L. D., Majewski P, Schulte LC, Korn JM, Young RA, Lander ES, Hacohen N. (2001). "The plasticity of dendritic cell responses to pathogens and their components." Science **294**.

Hunninghake, G. M., M. H. Cho, Y. Tesfaigzi, M. E. Soto-Quiros, L. Avila, J. Lasky-Su, C. Stidley, E. Melen, C. Soderhall, J. Hallberg, I. Kull, J. Kere, M. Svartengren, G. Pershagen, M. Wickman, C. Lange, D. L. Demeo, C. P. Hersh, B. J. Klanderman, B. A. Raby, D. Sparrow, S. D. Shapiro, E. K. Silverman, A. A. Litonjua, S. T. Weiss and J. C. Celedon (2009). "MMP12, lung function, and COPD in high-risk populations." N Engl J Med **361**(27): 2599-2608.

Hurst, J. R., G. C. Donaldson, T. M. Wilkinson, W. R. Perera and J. A. Wedzicha (2005). "Epidemiological relationships between the common cold and exacerbation frequency in COPD." Eur Respir J **26**(5): 846-852.

Hurst, J. R., W. R. Perera, T. M. Wilkinson, G. C. Donaldson and J. A. Wedzicha (2006). "Exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease: pan-airway and systemic inflammatory indices." Proc Am Thorac Soc **3**(6): 481-482.

Hurst, J. R., J. Vestbo, A. Anzueto, N. Locantore, H. Mullerova, R. Tal-Singer, B. Miller, D. A. Lomas, A. Agustí, W. Macnee, P. Calverley, S. Rennard, E. F. Wouters, J. A. Wedzicha and C. L. t. I. P. S. E. I. Evaluation of (2010). "Susceptibility to exacerbation in chronic obstructive pulmonary disease." N Engl J Med **363**(12): 1128-1138.

Ichinose, M., H. Sugiura, S. Yamagata, A. Koarai and K. Shirato (2000). "Increase in reactive nitrogen species production in chronic obstructive pulmonary disease airways." Am J Respir Crit Care Med **162**(2 Pt 1): 701-706.

liboshi, H., J. Ashitani, S. Katoh, A. Sano, N. Matsumoto, H. Mukae and M. Nakazato (2007). "Long-term treatment with theophylline reduces neutrophils, interleukin-8 and tumor necrosis factor-alpha in the sputum of patients with chronic obstructive pulmonary disease." Pulm Pharmacol Ther **20**(1): 46-51.

Ito, K. (2007). "Impact of post-translational modifications of proteins on the inflammatory process." Biochem Soc Trans **35**(Pt 2): 281-283.

Ito, K., P. J. Barnes and I. M. Adcock (2000). "Glucocorticoid receptor recruitment of histone deacetylase 2 inhibits interleukin-1beta-induced histone H4 acetylation on lysines 8 and 12." Mol Cell Biol **20**(18): 6891-6903.

Ito, K., K. F. Chung and I. M. Adcock (2006). "Update on glucocorticoid action and resistance." J Allergy Clin Immunol **117**(3): 522-543.

Ito, K., M. Ito, W. M. Elliott, B. Cosio, G. Caramori, O. M. Kon, A. Barczyk, S. Hayashi, I. M. Adcock, J. C. Hogg and P. J. Barnes (2005). "Decreased histone deacetylase activity in chronic obstructive pulmonary disease." N Engl J Med **352**(19): 1967-1976.

Ito, K., E. Jazrawi, B. Cosio, P. J. Barnes and I. M. Adcock (2001). "p65-activated histone acetyltransferase activity is repressed by glucocorticoids: mifepristone fails to recruit HDAC2 to the p65-HAT complex." J Biol Chem **276**(32): 30208-30215.

Ito, K., S. Lim, G. Caramori, B. Cosio, K. F. Chung, I. M. Adcock and P. J. Barnes (2002). "A molecular mechanism of action of theophylline: Induction of histone deacetylase activity to decrease inflammatory gene expression." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(13): 8921-8926.

Ito, K., S. Lim, G. Caramori, K. F. Chung, P. J. Barnes and I. M. Adcock (2001). "Cigarette smoking reduces histone deacetylase 2 expression, enhances cytokine expression, and inhibits glucocorticoid actions in alveolar macrophages." FASEB J **15**(6): 1110-1112.

Ito, K., S. Yamamura, S. Essilfie-Quaye, B. Cosio, M. Ito, P. J. Barnes and I. M. Adcock (2006). "Histone deacetylase 2-mediated deacetylation of the glucocorticoid receptor enables NF-kappaB suppression." J Exp Med **203**(1): 7-13.

JG, D. J. a. B. (2003). "Inhibition of proteinase 3 by [alpha]1-antitrypsin in vitro predicts very fast inhibition in vivo." Am J Respir Cell Mol Biol **29**.

Johnston, S. L., A. Papi, P. J. Bates, J. G. Mastronarde, M. M. Monick and G. W. Hunninghake (1998). "Low grade rhinovirus infection induces a prolonged release of IL-8 in pulmonary epithelium." J Immunol **160**(12): 6172-6181.

Jones, C. E. and K. Chan (2002). "Interleukin-17 stimulates the expression of interleukin-8, growth-related oncogene-alpha, and granulocyte-colony-stimulating factor by human airway epithelial cells." Am J Respir Cell Mol Biol **26**(6): 748-753.

Josse, C., J. R. Boelaert, M. Best-Belpomme and J. Piette (2001). "Importance of post-transcriptional regulation of chemokine genes by oxidative stress." Biochem J **360**(Pt 2): 321-333.

Kagoshima, M., B. Cosio and I. M. Adcock (2003). "How signaling pathways interact with gene transcription." Monaldi Arch Chest Dis **59**(1): 30-37.

Kagoshima, M., K. Ito, B. Cosio and I. M. Adcock (2003). "Glucocorticoid suppression of nuclear factor-kappa B: a role for histone modifications." Biochem Soc Trans **31**(Pt 1): 60-65.

Kanazawa H, S. S., Hirata K, Yoshikawa J. (2003). "Imbalance between levels of nitrogen oxides and peroxy nitrite inhibitory activity in chronic obstructive pulmonary disease." Thorax. **58**.

Kanner, R. E., J. E. Connett, M. D. Altose, A. S. Buist, W. W. Lee, D. P. Tashkin and R. A. Wise (1994). "Gender difference in airway hyperresponsiveness in smokers with mild COPD. The Lung Health Study." Am J Respir Crit Care Med **150**(4): 956-961.

Keatings VM, B. P. (1997). "Granulocyte activation markers in induced sputum: comparison between chronic obstructive pulmonary disease, asthma, and normal subjects." Am J Respir Crit Care Med **155**.

Keatings, V. M., P. D. Collins, D. M. Scott and P. J. Barnes (1996). "Differences in interleukin-8 and tumor necrosis factor-alpha in induced sputum from patients with chronic obstructive pulmonary disease or asthma." Am J Respir Crit Care Med **153**(2): 530-534.

Keatings, V. M., A. Jatakanon, Y. M. Worsdell and P. J. Barnes (1997). "Effects of inhaled and oral glucocorticoids on inflammatory indices in asthma and COPD." Am J Respir Crit Care Med **155**(2): 542-548.

Khair, O. A., J. L. Devalia, M. M. Abdelaziz, R. J. Sapsford, H. Tarraf and R. J. Davies (1994). "Effect of Haemophilus influenzae endotoxin on the synthesis of IL-6, IL-8, TNF-alpha and expression of ICAM-1 in cultured human bronchial epithelial cells." Eur Respir J **7**(12): 2109-2116.

Kharitonov, S., K. Alving and P. J. Barnes (1997). "Exhaled and nasal nitric oxide measurements: recommendations. The European Respiratory Society Task Force." Eur Respir J **10**(7): 1683-1693.

Kobayashi, M., Y. Nasuhara, T. Betsuyaku, E. Shibuya, Y. Tanino, M. Tanino, K. Takamura, K. Nagai, T. Hosokawa and M. Nishimura (2004). "Effect of low-dose theophylline on airway inflammation in COPD." Respirology **9**(2): 249-254.

Kobayashi, Y., H. Wada, C. Rossios, D. Takagi, C. Charron, P. J. Barnes and K. Ito (2013). "A novel macrolide/fluoroketolide, solithromycin (CEM-101), reverses corticosteroid insensitivity via phosphoinositide 3-kinase pathway inhibition." Br J Pharmacol **169**(5): 1024-1034.

Kohansal, R., P. Martinez-Camblor, A. Agusti, A. S. Buist, D. M. Mannino and J. B. Soriano (2009). "The natural history of chronic airflow obstruction revisited: an analysis of the Framingham offspring cohort." Am J Respir Crit Care Med **180**(1): 3-10.

Kusano, K., C. Miyaura, M. Inada, T. Tamura, A. Ito, H. Nagase, K. Kamoi and T. Suda (1998). "Regulation of matrix metalloproteinases (MMP-2, -3, -9, and -13) by interleukin-1 and interleukin-6 in mouse calvaria: association of MMP induction with bone resorption." Endocrinology **139**(3): 1338-1345.

Lacraz, S., L. P. Nicod, R. Chicheportiche, H. G. Welgus and J. M. Dayer (1995). "IL-10 inhibits metalloproteinase and stimulates TIMP-1 production in human mononuclear phagocytes." J Clin Invest **96**(5): 2304-2310.

Lagente, V., B. Manoury, S. Nenan, C. Le Qument, C. Martin-Chouly and E. Boichot (2005). "Role of matrix metalloproteinases in the development of airway inflammation and remodeling." Braz J Med Biol Res **38**(10): 1521-1530.

Lange P, N. J., Appleyard M, Jensen G, Schnohr P. (1990). "Ventilatory function and chronic mucus hypersecretion as predictors of death from lung cancer." Am Rev Respir Dis **141**(3).

Lim, S., N. Roche, B. G. Oliver, W. Mattos, P. J. Barnes and K. F. Chung (2000). "Balance of matrix metalloprotease-9 and tissue inhibitor of metalloprotease-1 from alveolar macrophages in cigarette smokers. Regulation by interleukin-10." Am J Respir Crit Care Med **162**(4 Pt 1): 1355-1360.

Liu, H., S. C. Lazarus, G. H. Caughey and J. V. Fahy (1999). "Neutrophil elastase and elastase-rich cystic fibrosis sputum degranulate human eosinophils in vitro." Am J Physiol **276**(1 Pt 1): L28-34.

Look, D. C., C. L. Chin, L. J. Manzel, E. E. Lehman, A. L. Humlicek, L. Shi, T. D. Starner, G. M. Denning, T. F. Murphy and S. Sethi (2006). "Modulation of airway inflammation by Haemophilus influenzae isolates associated with chronic obstructive pulmonary disease exacerbation." Proc Am Thorac Soc **3**(6): 482-483.

Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent." J Biol Chem **193**(1): 265-275.

Lukacs, N. W. (2001). "Role of chemokines in the pathogenesis of asthma." Nat Rev Immunol **1**(2): 108-116.

MacNee, W. (2001). "Oxidative stress and lung inflammation in airways disease." Eur J Pharmacol **429**(1-3): 195-207.

MacNee, W. (2003). "Acute exacerbations of COPD." Swiss Med Wkly **133**(17-18): 247-257.

Maestrelli, P., C. Paska, M. Saetta, G. Turato, Y. Nowicki, S. Monti, B. Formichi, M. Miniati and L. M. Fabbri (2003). "Decreased haem oxygenase-1 and increased inducible nitric oxide synthase in the lung of severe COPD patients." Eur Respir J **21**(6): 971-976.

Majo J, G. H., Cosio MG. (2001). "Lymphocyte population and apoptosis in the lungs of smokers and their relation to emphysema." Eur Respir J Suppl **5**(17).

Majori, M., M. Corradi, A. Caminati, G. Cacciani, S. Bertacco and A. Pesci (1999). "Predominant TH1 cytokine pattern in peripheral blood from subjects with chronic obstructive pulmonary disease." J Allergy Clin Immunol **103**(3 Pt 1): 458-462.

Mannino, D. M., D. M. Homa, L. J. Akinbami, E. S. Ford and S. C. Redd (2002). "Chronic obstructive pulmonary disease surveillance--United States, 1971-2000." MMWR Surveill Summ **51**(6): 1-16.

Mathers, C. D. and D. Loncar (2006). "Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030." PLoS Med **3**(11): e442.

McCloskey, S. C., B. D. Patel, S. J. Hinchliffe, E. D. Reid, N. J. Wareham and D. A. Lomas (2001). "Siblings of patients with severe chronic obstructive pulmonary disease have a significant risk of airflow obstruction." Am J Respir Crit Care Med **164**(8 Pt 1): 1419-1424.

Menezes, A. M., P. C. Hallal, R. Perez-Padilla, J. R. Jardim, A. Muino, M. V. Lopez, G. Valdivia, M. Montes de Oca, C. Talamo, J. Pertuze, C. G. Victora and T. Latin American Project for the Investigation of Obstructive Lung Disease (2007). "Tuberculosis and airflow obstruction: evidence from the PLATINO study in Latin America." Eur Respir J **30**(6): 1180-1185.

Menezes, A. M., R. Perez-Padilla, J. R. Jardim, A. Muino, M. V. Lopez, G. Valdivia, M. Montes de Oca, C. Talamo, P. C. Hallal, C. G. Victora and P. Team (2005). "Chronic obstructive pulmonary disease in five Latin American cities (the PLATINO study): a prevalence study." Lancet **366**(9500): 1875-1881.

Meyer, T., J. Carlstedt-Duke and D. B. Starr (1997). "A weak TATA box is a prerequisite for glucocorticoid-dependent repression of the osteocalcin gene." J Biol Chem **272**(49): 30709-30714.

Mio, T., D. J. Romberger, A. B. Thompson, R. A. Robbins, A. Heires and S. I. Rennard (1997). "Cigarette smoke induces interleukin-8 release from human bronchial epithelial cells." Am J Respir Crit Care Med **155**(5): 1770-1776.

Miravittles, M. (2007). "Tratamiento farmacológico de las agudizaciones infecciosas de la EPOC." Archivos de Bronconeumología **43**(Supl.4): 18-26.

Mocchegiani, E., R. Giacconi and L. Costarelli (2011). "Metalloproteases/anti-metalloproteases imbalance in chronic obstructive pulmonary disease: genetic factors and treatment implications." Curr Opin Pulm Med **17 Suppl 1**: S11-19.

Molet, S., C. Belleguic, H. Lena, N. Germain, C. P. Bertrand, S. D. Shapiro, J. M. Planquois, P. Delaval and V. Lagente (2005). "Increase in macrophage elastase (MMP-12) in lungs from patients with chronic obstructive pulmonary disease." Inflamm Res **54**(1): 31-36.

Monso, E., J. Ruiz, A. Rosell, J. Manterola, J. Fiz, J. Morera and V. Ausina (1995). "Bacterial infection in chronic obstructive pulmonary disease. A study of stable and exacerbated outpatients using the protected specimen brush." Am J Respir Crit Care Med **152**(4 Pt 1): 1316-1320.

Morfín Maciel, B. M. and B. M. Castillo Morfín (2010). "[Theophylline, a new look to an old drug]." Revista Alergia Mexico (Tecamachalco, Puebla, Mexico: 1993) **57**(4): 112-122.

Mostafa Mtairag, E., S. Chollet-Martin, M. Oudghiri, N. Laquay, M. P. Jacob, J. B. Michel and L. J. Feldman (2001). "Effects of interleukin-10 on monocyte/endothelial cell adhesion and MMP-9/TIMP-1 secretion." Cardiovasc Res **49**(4): 882-890.

Mroz, R. M., J. Noparlik, E. Chyczewska, J. J. Braszko and A. Holownia (2007). "Molecular basis of chronic inflammation in lung diseases: new therapeutic approach." J Physiol Pharmacol **58 Suppl 5**(Pt 2): 453-460.

Mukaida, N. (2003). "Pathophysiological roles of interleukin-8/CXCL8 in pulmonary diseases." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **284**(4): L566-577.

Murphy, T. F., A. L. Brauer, A. T. Schiffmacher and S. Sethi (2004). "Persistent colonization by Haemophilus influenzae in chronic obstructive pulmonary disease." Am J Respir Crit Care Med **170**(3): 266-272.

Nabeyrat, E., G. E. Jones, P. S. Fenwick, P. J. Barnes and L. E. Donnelly (2003). "Mitogen-activated protein kinases mediate peroxynitrite-induced cell death in human bronchial epithelial cells." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **284**(6): L1112-1120.

Nadel, J. A. (2000). "Role of neutrophil elastase in hypersecretion during COPD exacerbations, and proposed therapies." Chest **117**(5 Suppl 2): 386S-389S.

Nakamura, H., K. Yoshimura, N. G. McElvaney and R. G. Crystal (1992). "Neutrophil elastase in respiratory epithelial lining fluid of individuals with cystic fibrosis induces interleukin-8 gene expression in a human bronchial epithelial cell line." J Clin Invest **89**(5): 1478-1484.

Nichol, K. L., L. Baken and A. Nelson (1999). "Relation between influenza vaccination and outpatient visits, hospitalization, and mortality in elderly persons with chronic lung disease." Ann Intern Med **130**(5): 397-403.

Nichol, K. L., L. Baken, J. Wuorenma and A. Nelson (1999). "The health and economic benefits associated with pneumococcal vaccination of elderly persons with chronic lung disease." Arch Intern Med **159**(20): 2437-2442.

Nocker, R. E., D. F. Schoonbrood, E. A. van de Graaf, C. E. Hack, R. Lutter, H. M. Jansen and T. A. Out (1996). "Interleukin-8 in airway inflammation in patients with asthma and chronic obstructive pulmonary disease." Int Arch Allergy Immunol **109**(2): 183-191.

O'Donnell, D. E., S. Aaron, J. Bourbeau, P. Hernandez, D. D. Marciniuk, M. Balter, G. Ford, A. Gervais, R. Goldstein, R. Hodder, A. Kaplan, S. Keenan, Y. Lacasse, F. Maltais, J. Road, G. Rocker, D. Sin, T. Sinuff and N. Voduc (2007). "Canadian Thoracic Society recommendations for management of chronic obstructive pulmonary disease - 2007 update." Can Respir J **14 Suppl B**: 5B-32B.

O'Shaughnessy, T. C., T. W. Ansari, N. C. Barnes and P. K. Jeffery (1997). "Inflammation in bronchial biopsies of subjects with chronic bronchitis: inverse relationship of CD8+ T lymphocytes with FEV1." Am J Respir Crit Care Med **155**(3): 852-857.

Ohnishi, K., M. Takagi, Y. Kurokawa, S. Satomi and Y. T. Kontinen (1998). "Matrix metalloproteinase-mediated extracellular matrix protein degradation in human pulmonary emphysema." Lab Invest **78**(9): 1077-1087.

Olson, T. S. and K. Ley (2002). "Chemokines and chemokine receptors in leukocyte trafficking." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **283**(1): R7-28.

Owen, C. A., M. A. Campbell, S. S. Boukedes and E. J. Campbell (1997). "Cytokines regulate membrane-bound leukocyte elastase on neutrophils: a novel mechanism for effector activity." Am J Physiol **272**(3 Pt 1): L385-393.

PA, H. P. a. S. (2000). "Regulation of immunologic homeostasis in peripheral tissues by dendritic cells: the respiratory tract as a paradigm." J Allergy Clin Immunol **105**.

Papi, A., C. M. Bellettato, F. Braccioni, M. Romagnoli, P. Casolari, G. Caramori, L. M. Fabbri and S. L. Johnston (2006). "Infections and airway inflammation in chronic obstructive pulmonary disease severe exacerbations." Am J Respir Crit Care Med **173**(10): 1114-1121.

Papi, A. and S. L. Johnston (1999). "Rhinovirus infection induces expression of its own receptor intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) via increased NF-kappaB-mediated transcription." J Biol Chem **274**(14): 9707-9720.

Papi A, R. M., Baraldo S, Braccioni F, Guzzinati I, Saetta M, Ciaccia A, Fabbri LM (2000). "Partial reversibility of airflow limitation and increased exhaled NO and sputum eosinophilia in chronic obstructive pulmonary disease." Am J Respir Crit Care Med. **162**(5).

Patel IS, S. T., Wilks M, Lloyd-Owen SJ, Donaldson GC, Wedzicha JA. (2002). "Relationship between bacterial colonisation and the frequency, character, and severity of COPD exacerbations." Thorax **57**(9).

Pelaia, G., A. Vatrella, G. Cuda, R. Maselli and S. A. Marsico (2003). "Molecular mechanisms of corticosteroid actions in chronic inflammatory airway diseases." Life Sci **72**(14): 1549-1561.

Pena, V. S., M. Miravittles, R. Gabriel, C. A. Jimenez-Ruiz, C. Villasante, J. F. Masa, J. L. Viejo and L. Fernandez-Fau (2000). "Geographic variations in prevalence and underdiagnosis of COPD: results of the IBERPOC multicentre epidemiological study." Chest **118**(4): 981-989.

Perera, W. R., J. R. Hurst, T. M. Wilkinson, R. J. Sapsford, H. Mullerova, G. C. Donaldson and J. A. Wedzicha (2007). "Inflammatory changes, recovery and recurrence at COPD exacerbation." Eur Respir J **29**(3): 527-534.

Peterson, C. L. (2002). "HDAC's at work: everyone doing their part." Mol Cell **9**(5): 921-922.

Pinto-Plata, V. M., G. Livnat, M. Girish, H. Cabral, P. Masdin, P. Linacre, R. Dew, L. Kenney and B. R. Celli (2007). "Systemic cytokines, clinical and physiological changes in patients hospitalized for exacerbation of COPD." Chest **131**(1): 37-43.

Pitsiou, G., G. Kyriazis, O. Hatzizisi, P. Argyropoulou, E. Mavrofridis and D. Patakas (2002). "Tumor necrosis factor-alpha serum levels, weight loss and tissue oxygenation in chronic obstructive pulmonary disease." Respir Med **96**(8): 594-598.

Prause, O., M. Laan, J. Lotvall and A. Linden (2003). "Pharmacological modulation of interleukin-17-induced GCP-2-, GRO-alpha- and interleukin-8 release in human bronchial epithelial cells." Eur J Pharmacol **462**(1-3): 193-198.

Prescott, E., P. Lange and J. Vestbo (1999). "Socioeconomic status, lung function and admission to hospital for COPD: results from the Copenhagen City Heart Study." Eur Respir J **13**(5): 1109-1114.

Pryor, W. A. and K. Stone (1993). "Oxidants in cigarette smoke. Radicals, hydrogen peroxide, peroxyxynitrate, and peroxyxynitrite." Ann N Y Acad Sci **686**: 12-27; discussion 27-18.

Punturieri, A., S. Filippov, E. Allen, I. Caras, R. Murray, V. Reddy and S. J. Weiss (2000). "Regulation of elastolytic cysteine proteinase activity in normal and cathepsin K-deficient human macrophages." J Exp Med **192**(6): 789-799.

Qiu, Y., J. Zhu, V. Bandi, R. L. Atmar, K. Hattotuwa, K. K. Guntupalli and P. K. Jeffery (2003). "Biopsy neutrophilia, neutrophil chemokine and receptor gene expression in severe exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease." Am J Respir Crit Care Med **168**(8): 968-975.

Qureshi, H., A. Sharafkhaneh and N. A. Hanania (2014). "Chronic obstructive pulmonary disease exacerbations: latest evidence and clinical implications." Ther Adv Chronic Dis **5**(5): 212-227.

Rabe, K. F., S. Hurd, A. Anzueto, P. J. Barnes, S. A. Buist, P. Calverley, Y. Fukuchi, C. Jenkins, R. Rodriguez-Roisin, C. van Weel, J. Zielinski and D. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung (2007). "Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary." Am J Respir Crit Care Med **176**(6): 532-555.

Rabe, K. F., H. Magnussen and G. Dent (1995). "Theophylline and selective PDE inhibitors as bronchodilators and smooth muscle relaxants." Eur Respir J **8**(4): 637-642.

Rahman, I. (2003). "Oxidative stress, chromatin remodeling and gene transcription in inflammation and chronic lung diseases." J Biochem Mol Biol **36**(1): 95-109.

Rahman, I., D. Morrison, K. Donaldson and W. MacNee (1996). "Systemic oxidative stress in asthma, COPD, and smokers." Am J Respir Crit Care Med **154**(4 Pt 1): 1055-1060.

Rao, N. V., N. G. Wehner, B. C. Marshall, W. R. Gray, B. H. Gray and J. R. Hoidal (1991). "Characterization of proteinase-3 (PR-3), a neutrophil serine

proteinase. Structural and functional properties." J Biol Chem **266**(15): 9540-9548.

Read, R. C., R. Wilson, A. Rutman, V. Lund, H. C. Todd, A. P. Brain, P. K. Jeffery and P. J. Cole (1991). "Interaction of nontypable *Haemophilus influenzae* with human respiratory mucosa in vitro." J Infect Dis **163**(3): 549-558.

Retamales, I., W. M. Elliott, B. Meshi, H. O. Coxson, P. D. Pare, F. C. Sciruba, R. M. Rogers, S. Hayashi and J. C. Hogg (2001). "Amplification of inflammation in emphysema and its association with latent adenoviral infection." Am J Respir Crit Care Med **164**(3): 469-473.

Roca, J., J. Sanchis, A. Agusti-Vidal, F. Segarra, D. Navajas, R. Rodriguez-Roisin, P. Casan and S. Sans (1986). "Spirometric reference values from a Mediterranean population." Bull Eur Physiopathol Respir **22**(3): 217-224.

Roca, M., A. Verduri, L. Corbetta, E. Clini, L. M. Fabbri and B. Beghe (2013). "Mechanisms of acute exacerbation of respiratory symptoms in chronic obstructive pulmonary disease." Eur J Clin Invest **43**(5): 510-521.

Rodriguez-Roisin, R. (2000). "Toward a consensus definition for COPD exacerbations." Chest **117**(5 Suppl 2): 398S-401S.

Rose, C. E., Jr., S. S. Sung and S. M. Fu (2003). "Significant involvement of CCL2 (MCP-1) in inflammatory disorders of the lung." Microcirculation **10**(3-4): 273-288.

Rosell, A., E. Monso, N. Soler, F. Torres, J. Angrill, G. Riise, R. Zalacain, J. Morera and A. Torres (2005). "Microbiologic determinants of exacerbation in chronic obstructive pulmonary disease." Arch Intern Med **165**(8): 891-897.

Roth, S. Y., J. M. Denu and C. D. Allis (2001). "Histone acetyltransferases." Annu Rev Biochem **70**: 81-120.

Russell, R. E., S. V. Culpitt, C. DeMatos, L. Donnelly, M. Smith, J. Wiggins and P. J. Barnes (2002). "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 **26**(5): 602-609.

Russell, R. E., A. Thorley, S. V. Culpitt, S. Dodd, L. E. Donnelly, C. Demattos, M. Fitzgerald and P. J. Barnes (2002). "Alveolar macrophage-mediated elastolysis: roles of matrix metalloproteinases, cysteine, and serine proteases." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **283**(4): L867-873.

Saetta, M., S. Baraldo, L. Corbino, G. Turato, F. Braccioni, F. Rea, G. Cavallero, G. Tropeano, C. E. Mapp, P. Maestrelli, A. Ciaccia and L. M. Fabbri (1999). "CD8+ve cells in the lungs of smokers with chronic obstructive pulmonary disease." Am J Respir Crit Care Med **160**(2): 711-717.

Saetta, M., A. Di Stefano, P. Maestrelli, G. Turato, C. E. Mapp, M. Pieno, G. Zanguochi, G. Del Prete and L. M. Fabbri (1996). "Airway eosinophilia and expression of interleukin-5 protein in asthma and in exacerbations of chronic bronchitis." Clin Exp Allergy **26**(7): 766-774.

Saetta, M., A. Di Stefano, P. Maestrelli, G. Turato, M. P. Ruggieri, A. Roggeri, P. Calcagni, C. E. Mapp, A. Ciaccia and L. M. Fabbri (1994). "Airway eosinophilia in chronic bronchitis during exacerbations." Am J Respir Crit Care Med **150**(6 Pt 1): 1646-1652.

Saetta, M., A. Di Stefano, G. Turato, F. M. Facchini, L. Corbino, C. E. Mapp, P. Maestrelli, A. Ciaccia and L. M. Fabbri (1998). "CD8+ T-lymphocytes in

peripheral airways of smokers with chronic obstructive pulmonary disease." Am J Respir Crit Care Med **157**(3 Pt 1): 822-826.

Saetta, M., G. Turato, P. Maestrelli, C. E. Mapp and L. M. Fabbri (2001). "Cellular and structural bases of chronic obstructive pulmonary disease." Am J Respir Crit Care Med **163**(6): 1304-1309.

Sapey, E., A. Ahmad, D. Bayley, P. Newbold, N. Snell, P. Rugman and R. A. Stockley (2009). "Imbalances between interleukin-1 and tumor necrosis factor agonists and antagonists in stable COPD." J Clin Immunol **29**(4): 508-516.

Schafroth Torok, S. and J. D. Leuppi (2007). "Bronchial hyper-responsiveness and exhaled nitric oxide in chronic obstructive pulmonary disease." Swiss Med Wkly **137**(27-28): 385-391.

Scheinman, R. I., P. C. Cogswell, A. K. Lofquist and A. S. Baldwin, Jr. (1995). "Role of transcriptional activation of I kappa B alpha in mediation of immunosuppression by glucocorticoids." Science **270**(5234): 283-286.

Schulz C, K. K., Wolf K, Schroll S, Köhler M, Pfeifer M. (2004). "Activation of bronchial epithelial cells in smokers without airway obstruction and patients with COPD." Chest. **125**.

Seemungal, T., R. Harper-Owen, A. Bhowmik, I. Moric, G. Sanderson, S. Message, P. MacCallum, T. W. Meade, D. J. Jeffries, S. L. Johnston and J. A. Wedzicha (2001). "Respiratory viruses, symptoms, and inflammatory markers in acute exacerbations and stable chronic obstructive pulmonary disease." Am J Respir Crit Care Med **164**(9): 1618-1623.

Seemungal, T. A., G. C. Donaldson, A. Bhowmik, D. J. Jeffries and J. A. Wedzicha (2000). "Time course and recovery of exacerbations in patients with chronic obstructive pulmonary disease." Am J Respir Crit Care Med **161**(5): 1608-1613.

Seemungal, T. A., R. Harper-Owen, A. Bhowmik, D. J. Jeffries and J. A. Wedzicha (2000). "Detection of rhinovirus in induced sputum at exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease." Eur Respir J **16**(4): 677-683.

Sethi, S., N. Evans, B. J. Grant and T. F. Murphy (2002). "New strains of bacteria and exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease." N Engl J Med **347**(7): 465-471.

Shapiro, S. D. (1999). "The macrophage in chronic obstructive pulmonary disease." Am J Respir Crit Care Med **160**(5 Pt 2): S29-32.

Shapiro, S. D. and E. P. Ingenito (2005). "The pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease: advances in the past 100 years." Am J Respir Cell Mol Biol **32**(5): 367-372.

Shuto, T., H. Xu, B. Wang, J. Han, H. Kai, X. X. Gu, T. F. Murphy, D. J. Lim and J. D. Li (2001). "Activation of NF-kappa B by nontypeable Hemophilus influenzae is mediated by toll-like receptor 2-TAK1-dependent NIK-IKK alpha /beta-I kappa B alpha and MKK3/6-p38 MAP kinase signaling pathways in epithelial cells." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(15): 8774-8779.

Slevogt, H., B. Schmeck, C. Jonat, J. Zahlten, W. Beermann, V. van Laak, B. Opitz, S. Dietel, P. D. N'Guessan, S. Hippenstiel, N. Suttorp and J. Seybold (2006). "Moraxella catarrhalis induces inflammatory response of bronchial epithelial cells via MAPK and NF-kappaB activation and histone deacetylase activity reduction." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **290**(5): L818-826.

Smith CA, H. D. (1997). "Association between polymorphism in gene for microsomal epoxide hydrolase and susceptibility to emphysema." Lancet **350**(9078).

Soler, N., S. Ewig, A. Torres, X. Filella, J. Gonzalez and A. Zaubet (1999). "Airway inflammation and bronchial microbial patterns in patients with stable chronic obstructive pulmonary disease." Eur Respir J **14**(5): 1015-1022.

Sommerhoff, C. P., J. A. Nadel, C. B. Basbaum and G. H. Caughey (1990). "Neutrophil elastase and cathepsin G stimulate secretion from cultured bovine airway gland serous cells." J Clin Invest **85**(3): 682-689.

Song, W., J. Zhao and Z. Li (2001). "Interleukin-6 in bronchoalveolar lavage fluid from patients with COPD." Chin Med J (Engl) **114**(11): 1140-1142.

Soriano, J. B., M. Miravittles, L. Borderias, E. Duran-Tauleria, F. Garcia Rio, J. Martinez, T. Montemayor, L. Munoz, L. Pineiro, G. Sanchez, J. Serra, J. J. Soler-Cataluna, A. Torres, J. Luis Viejo, V. Sobradillo-Pena and J. Ancochea (2010). "[Geographical variations in the prevalence of COPD in Spain: relationship to smoking, death rates and other determining factors]." Arch Bronconeumol **46**(10): 522-530.

Stamenkovic, I. (2003). "Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases." J Pathol **200**(4): 448-464.

Sterk, P. J., L. M. Fabbri, P. H. Quanjer, D. W. Cockcroft, P. M. O'Byrne, S. D. Anderson, E. F. Juniper and J. L. Malo (1993). "Airway responsiveness. Standardized challenge testing with pharmacological, physical and sensitizing stimuli in adults. Report Working Party Standardization of Lung Function Tests, European Community for Steel and Coal. Official Statement of the European Respiratory Society." Eur Respir J Suppl **16**: 53-83.

Stockley, R. A. (1996). "Cellular mechanisms in the pathogenesis of COPD." Eur respir j **39**.

Stoller, J. K. and L. S. Aboussouan (2005). "Alpha1-antitrypsin deficiency." Lancet **365**(9478): 2225-2236.

Sugiura, H., M. Ichinose, M. Tomaki, H. Ogawa, A. Koarai, T. Kitamuro, Y. Komaki, T. Akita, H. Nishino, S. Okamoto, T. Akaike and T. Hattori (2004). "Quantitative assessment of protein-bound tyrosine nitration in airway secretions from patients with inflammatory airway disease." Free Radic Res **38**(1): 49-57.

Szulakowski, P., A. J. Crowther, L. A. Jimenez, K. Donaldson, R. Mayer, T. B. Leonard, W. MacNee and E. M. Drost (2006). "The effect of smoking on the transcriptional regulation of lung inflammation in patients with chronic obstructive pulmonary disease." Am J Respir Crit Care Med **174**(1): 41-50.

Takeyama, K., C. Agusti, I. Ueki, J. Lausier, L. O. Cardell and J. A. Nadel (1998). "Neutrophil-dependent goblet cell degranulation: role of membrane-bound elastase and adhesion molecules." Am J Physiol **275**(2 Pt 1): L294-302.

Takizawa, H., M. Tanaka, K. Takami, T. Ohtoshi, K. Ito, M. Satoh, Y. Okada, F. Yamasawa, K. Nakahara and A. Umeda (2001). "Increased expression of transforming growth factor-beta1 in small airway epithelium from tobacco smokers and patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD)." Am J Respir Crit Care Med **163**(6): 1476-1483.

Tetley, T. D. (2005). "Inflammatory cells and chronic obstructive pulmonary disease." Curr Drug Targets Inflamm Allergy **4**(6): 607-618.

Tockman, M. S., N. R. Anthonisen, E. C. Wright and M. G. Donithan (1987). "Airways obstruction and the risk for lung cancer." Ann Intern Med **106**(4): 512-518.

Tomita, K., P. J. Barnes and I. M. Adcock (2003). "The effect of oxidative stress on histone acetylation and IL-8 release." Biochem Biophys Res Commun **301**(2): 572-577.

Tomita, K., G. Caramori, S. Lim, K. Ito, T. Hanazawa, T. Oates, I. Chiselita, E. Jazrawi, K. F. Chung, P. J. Barnes and I. M. Adcock (2002). "Increased p21(CIP1/WAF1) and B cell lymphoma leukemia-x(L) expression and reduced apoptosis in alveolar macrophages from smokers." Am J Respir Crit Care Med **166**(5): 724-731.

Tomita, K., H. Chikumi, H. Tokuyasu, H. Yajima, Y. Hitsuda, Y. Matsumoto and T. Sasaki (1999). "Functional assay of NF-kappaB translocation into nuclei by laser scanning cytometry: inhibitory effect by dexamethasone or theophylline." Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol **359**(4): 249-255.

Traves SL, S. S., Barnes PJ, Donnelly LE. (2004). "Specific CXC but not CC chemokines cause elevated monocyte migration in COPD: a role for CXCR2." J Leukoc Biol **76**(2).

Tzanakis, N., G. Chrysofakis, M. Tsoumakidou, D. Kyriakou, J. Tsiligianni, D. Bouros and N. M. Siafakas (2004). "Induced sputum CD8+ T-lymphocyte subpopulations in chronic obstructive pulmonary disease." Respir Med **98**(1): 57-65.

Urnov, F. D. and A. P. Wolffe (2001). "Chromatin remodeling and transcriptional activation: the cast (in order of appearance)." Oncogene **20**(24): 2991-3006.

van der Vliet, A., J. P. Eiserich, M. K. Shigenaga and C. E. Cross (1999). "Reactive nitrogen species and tyrosine nitration in the respiratory tract: epiphenomena or a pathobiologic mechanism of disease?" Am J Respir Crit Care Med **160**(1): 1-9.

Verdone, L., E. Agricola, M. Caserta and E. Di Mauro (2006). "Histone acetylation in gene regulation." Brief Funct Genomic Proteomic **5**(3): 209-221.

Vernooy, J. H., M. Kucukaycan, J. A. Jacobs, N. H. Chavannes, W. A. Buurman, M. A. Dentener and E. F. Wouters (2002). "Local and systemic inflammation in patients with chronic obstructive pulmonary disease: soluble tumor necrosis factor receptors are increased in sputum." Am J Respir Crit Care Med **166**(9): 1218-1224.

Vestbo, J., S. S. Hurd, A. G. Agusti, P. W. Jones, C. Vogelmeier, A. Anzueto, P. J. Barnes, L. M. Fabbri, F. J. Martinez, M. Nishimura, R. A. Stockley, D. D. Sin and R. Rodriguez-Roisin (2013). "Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary." Am J Respir Crit Care Med **187**(4): 347-365.

Wang, B., P. P. Cleary, H. Xu and J. D. Li (2003). "Up-regulation of interleukin-8 by novel small cytoplasmic molecules of nontypeable Haemophilus influenzae via p38 and extracellular signal-regulated kinase pathways." Infect Immun **71**(10): 5523-5530.

Watanabe, T., H. Jono, J. Han, D. J. Lim and J. D. Li (2004). "Synergistic activation of NF-kappaB by nontypeable Haemophilus influenzae and tumor necrosis factor alpha." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(10): 3563-3568.

Wedzicha, J. A. and G. C. Donaldson (2003). "Exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease." Respir Care **48**(12): 1204-1213; discussion 1213-1205.

Wedzicha, J. A. and T. A. Seemungal (2007). "COPD exacerbations: defining their cause and prevention." Lancet **370**(9589): 786-796.

Wedzicha, J. A., T. A. Seemungal, P. K. MacCallum, E. A. Paul, G. C. Donaldson, A. Bhowmik, D. J. Jeffries and T. W. Meade (2000). "Acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease are accompanied by elevations of plasma fibrinogen and serum IL-6 levels." Thromb Haemost **84**(2): 210-215.

White, A. J., S. Gompertz and R. A. Stockley (2003). "Chronic obstructive pulmonary disease . 6: The aetiology of exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease." Thorax **58**(1): 73-80.

Wilkinson, T. M., J. R. Hurst, W. R. Perera, M. Wilks, G. C. Donaldson and J. A. Wedzicha (2006). "Effect of interactions between lower airway bacterial and rhinoviral infection in exacerbations of COPD." Chest **129**(2): 317-324.

Willemsse BW, t. H. N., Rutgers B, Lesman-Leegte IG, Timens W, Postma DS. (2004). "Smoking cessation improves both direct and indirect airway hyperresponsiveness in COPD." Eur Respir J Suppl **24**(3).

Williams L, B. L., Smith A, Foxwell B. (2004). "Signal transducer and activator of transcription 3 is the dominant mediator of the anti-inflammatory effects of IL-10 in human macrophages." J Immunol **172**(1).

Witko-Sarsat V, H.-M. L., Schuster A, Nusbaum P, Ueki I, Canteloup S, Lenoir G, Descamps-Latscha B, Nadel JA. (1999). "Proteinase 3, a potent secretagogue in airways, is present in cystic fibrosis sputum." Am J Respir Cell Mol Biol **20**(4).

Wright JL, L. R., Churg A. (2005). "Pulmonary hypertension in chronic obstructive pulmonary disease: current theories of pathogenesis and their implications for treatment." Thorax **60**(7).

Xanthoudakis S, C. T. (1996). "Redox regulation of AP-1: a link between transcription factor signaling and DNA repair." Adv Exp Med Biol **387**.

Xiao, W. (2004). "Advances in NF-kappaB signaling transduction and transcription." Cell Mol Immunol **1**(6): 425-435.

Yamamoto, C., T. Yoneda, M. Yoshikawa, A. Fu, T. Tokuyama, K. Tsukaguchi and N. Narita (1997). "Airway inflammation in COPD assessed by sputum levels of interleukin-8." Chest **112**(2): 505-510.

Yan, K., C. M. Salome and A. J. Woolcock (1985). "Prevalence and nature of bronchial hyperresponsiveness in subjects with chronic obstructive pulmonary disease." Am Rev Respir Dis **132**(1): 25-29.

Yasui, K., B. Hu, T. Nakazawa, K. Agematsu and A. Komiyama (1997). "Theophylline accelerates human granulocyte apoptosis not via phosphodiesterase inhibition." J Clin Invest **100**(7): 1677-1684.

Yoshida, T. and R. M. Tudor (2007). "Pathobiology of cigarette smoke-induced chronic obstructive pulmonary disease." Physiol Rev **87**(3): 1047-1082.

Zhong, H., M. J. May, E. Jimi and S. Ghosh (2002). "The phosphorylation status of nuclear NF-kappa B determines its association with CBP/p300 or HDAC-1." Mol Cell **9**(3): 625-636.