



Inhibidores de fosfodiesterasa 4: un nuevo grupo farmacológico en el tratamiento de la inflamación crónica de las vías aéreas

Julio Cortijo Gimeno

Unidad de Docencia e Investigación. Consorcio Hospital General Universitario de Valencia.
Departamento de Farmacología. Facultad de Medicina y Odontología. Universitat de Valencia. Valencia. España

Introducción

Los inhibidores de la isoenzima fosfodiesterasa 4 (roflumilast [DAXAS®]) muestran acciones farmacológicas específicas: roflumilast y su metabolito activo (N-óxido roflumilast) producen la inhibición de la interacción de los neutrófilos con las células endoteliales y, por tanto, disminuyen su extravasación y muchas de sus funciones, previenen el desarrollo del enfisema inducido por el tabaco en modelos experimentales con animales de investigación.

La modificación de los diferentes mecanismos que orquestan el agrandamiento y destrucción alveolar, como la acumulación de células inflamatorias en el espacio alveolar, los procesos apoptóticos de las células endoteliales y la disminución del estrés oxidativo se ven afectados por la acción de roflumilast en modelos experimentales de enfisema.

También hay evidencia sustancial de que N-óxido roflumilast puede aliviar la producción de mucinas excesiva, aumentar la conductancia transmembrana de Cl⁻, y el aumento del batido ciliar, en el epitelio de la vía aérea. Estos efectos podrían contribuir a una mejora en los cambios de la EPOC relacionados con las vías aéreas pequeñas. Son necesarios más estudios para explorar si las acciones indicadas llevan al incremento del aclaramiento mucociliar in vivo.

En resumen, roflumilast –fármaco inhibidor selectivo de la isoenzima 4 de fosfodiesterasa– es el representante de un nuevo grupo farmacológico de interés potencial como agentes terapéuticos en patologías pulmonares (EPOC).

Nucleótidos cíclicos

Los nucleótidos cíclicos, adenosín monofosfato cíclico (AMPc) y guanosín monofosfato cíclico (GMPc), son segundos mensajeros de rutas de transducción de señales celulares, generándose por mediación de los enzimas adenilato y guanilato ciclasa, respectivamente.

En las células humanas, AMPc funciona activando la proteína quinasa A (PKA), también conocida como proteína quinasa A dependiente del AMPc. Como holoenzima tetramérica normalmente es inactiva, consistiendo en dos unidades catalizadoras, y dos unidades reguladoras. El AMPc se une a lugares específicos en las unidades reguladoras de la proteína quinasa, y causa la disociación entre las subunidades

reguladoras y catalizadoras, activando así las unidades catalizadoras y permitiéndoles que fosforilen las proteínas.

Las subunidades activas catalizan la transferencia del fosfato desde el ATP hacia residuos específicos de serina de los sustratos de proteínas. Las proteínas fosforiladas pueden actuar directamente en los canales iónicos de las células, pueden convertirse en enzimas activados o inhibidos o pueden unirse a las regiones promotor del ADN, causando el aumento de expresión de determinados genes.

Los niveles intracelulares de estos nucleótidos cíclicos son controlados por las fosfodiesterasas, enzimas hidrolasas que catalizan la ruptura de los enlaces fosfodiéster.

Enzimas fosfodiesterasas

Las fosfodiesterasas (PDE) de nucleótidos cíclicos integran una familia de enzimas que hidrolizan el enlace fosfato en 3'-ribose de los nucleótidos 3',5'-cíclicos monofosfato a los correspondientes derivados inactivos 5'-nucleosido monofosfato.

Los isoenzimas de la PDE contienen en su estructura tres dominios funcionales:

- 1) *Cuerpo catalítico* (estable): en la secuencia de las regiones catalíticas de las diferentes familias de PDE existe una considerable similitud (identidad $\geq 50\%$ a nivel de aminoácidos).
- 2) *Extremo N-terminal* (variable): tiene un papel regulador en varias familias de PDE, posee un dominio de unión a calmodulina en la PDE1.
- 3) *Extremo C-terminal* (variable): su papel funcional específico no está claro todavía. Al igual que para los extremos N-terminal, las secuencias de aminoácidos de estas regiones son altamente heterólogas, entre las diferentes familias de PDE.

Estos tres dominios están conectados por regiones "bisagra", cuya flexibilidad permite que los dominios N- o C- terminales se plieguen sobre la región catalítica modulando, de este modo, el acceso del sustrato a esta porción. Esto proporciona un mecanismo por medio del cual reguladores alostéricos pueden incrementar o disminuir la actividad enzimática alterando la estructura terciaria del enzima^{1,2}.

En la actualidad se han descrito 11 clases de isoenzimas (PDE1 a PDE11), basándose en sus características farmacológicas (tabla 1). El análisis del genoma humano ha identificado 21 genes, cada uno de los cuales da origen a una familia de PDE. Alguna de las 11 isoenzimas tiene más de un gen que la codifica; por ello, adicionamos una letra capital al número de la familia de isoenzimas (PDE4A), para identifi-

Autor para correspondencia.

Correo electrónico: cortijo_jul@gva.es (J. Cortijo).

Tabla 1
Características de distintas isoenzimas de PD

Familia isoenzima	Principal distribución tisular
PDE 1: Ca ²⁺ /CaM activada	Cerebro, músculo liso, corazón, testículos
PDE 2: GMPc estimulada	Corteza adrenal, cerebro, corazón, endotelio
PDE 3: GMPc inhibida	Corazón, músculo liso, tejido adiposo, plaquetas, linfocitos T, macrófagos, células dendríticas, endotelio
PDE 4: AMPc específica	Epitelio bronquial, músculo liso bronquial y vascular, endotelio, linfocitos T, monocitos, eosinófilos, basófilos, neutrófilos, sistema reproductivo, piel, neuronas.
PDE 5: GMPc específica	Músculo liso, plaquetas, fibroblasto de pulmón, cerebelo.
PDE 6 (fotorreceptor): GMPc específica	Retina
PDE 7: AMPc específica (alta afinidad)	Músculo esquelético, células inmunitarias, cerebro
PDE 8: AMPc específica (alta afinidad)	Células inmunitarias, hígado, riñón, testículos, tiroides
PDE 9: GMPc específica (alta afinidad)	Cerebro, riñón
PDE 10: Especificidad dual	Cerebro, testículos
PDE 11: Especificidad dual	Cerebro, próstata, testículos, músculo esquelético

car el gen que codifica a la subfamilia del isoenzima, denominando isoformas a las distintas subfamilias de un mismo isoenzima, formadas por transcripción y trasducción de diferentes genes.

A adicionalmente, hay que indicar, que los genes que codifican las PDE, pueden tener diferentes variantes de *splicing*. Para nombrar las diferentes variantes se añade un nuevo número arábigo a la numeración de la isoenzima de PDE (PDE4A1). En suma, todo este conjunto de isoenzimas, isoformas y variantes hace que se hayan identificado unas 100 diferentes PDE^{1,2}.

Como consecuencia del aumento del conocimiento de la biología de las PDE y de sus efectos farmacológicos, así como de los inhibidores de PDE, ha emergido un posible interés en su uso clínico. Este interés se ha centrado, de forma particular, en la isoenzima PDE4, por su amplia distribución tisular y por su papel regulador de las células inflamatorias y las células estructurales (músculo liso bronquial y vascular)³. En suma, los fármacos inhibidores de las fosfodiesterasas representan un nuevo grupo farmacológico con muy distintas actividades: EPOC, asma, fibrosis pulmonar (IPDE4); hipertensión pulmonar, disfunción eréctil (IPDE5); esquizofrenia (IPDE10), pero también en depresión, Alzheimer y otras disfunciones cognitivas.

Fisiopatología de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica

El término enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) fue acuñado para designar el espacio común correspondiente a diversas patologías respiratorias crónicas caracterizado por una disminución progresiva y con frecuencia irreversible del volumen de aire exhalado el primer segundo de una maniobra espiratoria forzada (VEMS).

Desde el punto de vista funcional, la EPOC se define por un aumento de la resistencia al flujo aéreo al que contribuyen:

- 1) La disminución de la luz bronquial por engrosamiento de la pared, y aumento de la producción de moco.
- 2) La contracción de la musculatura lisa de las vías aéreas.
- 3) La pérdida de elasticidad del parénquima pulmonar.

Se considera plausible que el proceso de deterioro se inicie por el daño epitelial e inflamación bronquial causados por el humo del tabaco, como sugieren los estudios anatomopatológicos. La liberación de mediadores a partir de células epiteliales, así como la inflamación

neurogénica causada por la exposición de terminaciones nerviosas aferentes, desencadena un círculo vicioso que conduce a la inflamación crónica con fibrosis de la pared de las vías aéreas, y destrucción de tabiques alveolares (enfisema centrolobulillar) o hipertrofia e hiperplasia del músculo liso. En la actualidad se hace énfasis en la importancia patológica del daño causado por radicales libres de oxígeno presentes en el humo del tabaco o liberado por macrófagos activados y otras células inflamatorias. Estas especies reactivas de oxígeno inactivan la α_1 -antitripsina (favorecen así el daño tisular por elastasa), causan peroxidación lipídica, daño a proteínas y ADN, activación del factor nuclear- κ B, y comprometen diversos mecanismos de defensa. En este sentido, en la EPOC existiría un desequilibrio entre el estrés oxidativo celular y las defensas antioxidantes endógenas. Las células inflamatorias que parecen ejercer un papel dominante en la EPOC son los neutrófilos, los linfocitos CD8 + y los macrófagos.

El arsenal terapéutico empleado para su tratamiento es compartido casi en su totalidad con el utilizado para el tratamiento del asma, con matizaciones bien conocidas como el menor papel de los corticoides. Sin embargo, la investigación farmacológica en EPOC tiene ahora gran vigencia, como demuestra una serie de revisiones recientemente aparecidas⁴⁻⁷.

Fármacos inhibidores de la isoenzima PDE4

El hecho de que el aumento del AMPc en las células inflamatorias sanguíneas se asocia, generalmente, con la supresión de los mediadores inflamatorios y que el isoenzima predominante en estas células, es el PDE4 (con sus cuatro isoformas PDE4A-D y mas de 20 variantes por *splicing*), ha sido la base para intentar desarrollar fármacos inhibidores de las PDE4 para el tratamiento de diferentes enfermedades inflamatorias⁸. Investigaciones recientes han demostrado la existencia de PDE4 en bronquio humano⁹ y en células inflamatorias (monocitos/macrófagos, linfocitos T, eosinófilos y neutrófilos)¹⁰⁻¹², así como la capacidad de los inhibidores de PDE4 para interferir la transducción de señales en células inflamatorias^{13,14}.

Aunque desde los primeros estudios experimentales se advirtió claramente la capacidad de los inhibidores selectivos de PDE4 para interferir los procesos de tráfico celular (la entrada de eosinófilos en lavado broncoalveolar), no ha sido sino recientemente que se han iniciado los estudios más concretos in vitro e in vivo para conocer mejor cuáles son las moléculas de adhesión interferidas por estos fármacos. Se sabe que los fármacos que aumentan los niveles de AMPc son capaces de inhibir la inducción por citocinas de E-selectina, β 2 integrinas y VCAM-1 en diversos tipos celulares. En concreto, rolipram (inhibidor PDE4 arquetipo), suprime la expresión y liberación de E-selectina en células endoteliales umbilicales humanas activadas por TNF- α . La inhibición de PDE4 también inhibe la inducción de la expresión de E-selectina en células endoteliales de la microvasculatura pulmonar humana, y la inhibición PDE3/PDE4 inhibe VCAM-1, pero no ICAM-1¹⁵. De hecho, roflumilast reduce la adhesión y migración de los leucocitos (principalmente neutrófilos) de las vénulas postcapilares mesentéricas, así como la expresión de E- y P-selectina en las propias vénulas mesentéricas y el CD11b en la superficie de los neutrófilos de sangre periférica de rata, en un modelo in vivo, estimulada por LPS¹⁶.

En línea con estas evidencias experimentales, se han desarrollado un gran número de inhibidores específicos de isoenzimas del PDE4:

- *Primera generación de inhibidores de PDE4.* Fármacos bien caracterizados farmacológicamente (el arquetípico "rolipram"), pero abandonados en las fases de desarrollo clínico, por los inconvenientes derivados de sus efectos adversos en humanos (principalmente náusea y emesis). Estos fármacos se caracterizan por su elevada afinidad por el denominado "sitio de alta afinidad para rolipram", presente en el córtex cerebral de rata e implicado en los efectos adversos gastrointestinales.

- Segunda generación de inhibidores selectivos de PDE4, los cuales mantienen una elevada potencia en el sitio catalítico de la enzima PDE4, pero, en cambio, exhiben menor afinidad por el "sitio de alta afinidad para rolipram". Esta característica les proporciona una menor frecuencia de efectos adversos gastrointestinales que los de primera generación.

Roflumilast como representante de los IPDE4 selectivos

Farmacocinética

Se administra por vía oral con una biodisponibilidad del 79% y una vida media de 15,7 horas, lo cual le permite ser administrado una vez al día. Roflumilast, es rápidamente metabolizado por el citocromo P450 (CYP3A4 y CYP1A2) a su metabolito activo: N-óxido roflumilast (NOR). Este metabolito es de 2 a 3 veces menos potente en la inhibición de PDE4 (CI₅₀ = 0,9 nM), siendo selectivo de este isoenzima. En el hombre, se considera que el 90% del efecto de roflumilast es atribuible al metabolito y el 10% al fármaco original. La administración de 500 µg una vez al día en voluntarios sanos, resulta una concentración plasmática de NOR libre de 1-2 nM, durante 24 horas, y con una unión a proteínas plasmáticas del 97%¹⁷.

Un inhibidor selectivo de la isoenzima PDE4

Roflumilast (Daxas®), es uno de los más potentes inhibidores de la PDE4 (CI₅₀ = 0,2 nM). Su potencia y selectividad ha sido comprobada en distintos tipos de células^{18,19}.

Estudios posteriores con PDE1-11 recombinantes, confirman que este fármaco y su metabolito activo no afecta a ningún PDE que no sea la isoenzima 4 y que es igual de potente y selectivo de la isoformas y variantes por *splicing* de la PDE4, con la excepción de la PDE4C que es inhibida a concentraciones superiores¹⁹.

Un potente antiinflamatorio

Roflumilast y N óxido roflumilast tienen efecto antiinflamatorio y antirremodelado de amplio espectro, actuando tanto sobre células estructurales (fibroblastos, músculo liso, epitelio) como sobre células inflamatorias (macrófagos, neutrófilos, células T, eosinófilos).

Los inhibidores de PDE4 inhiben la extravasación de células inflamatorias, en especial los neutrófilos, en los modelos in vivo. Reducen, por tanto, el proceso que precede a la acumulación de neutrófilos en el lavado broncoalveolar (BAL): la adhesión de las células inflamatorias al endotelio vascular, seguida de una migración transendotelial y a lo largo de las células intersticiales, para finalmente salir a través de la pared de células epiteliales^{20,21}.

Este efecto se ha comprobado para roflumilast, en un modelo de video microscopía intravital realizado en rata in vivo, utilizando LPS como estímulo en las vénulas poscapilares mesentéricas. La adición del LPS produce un incremento sustancial en el rodamiento y adhesión de los leucocitos a las células endoteliales para, posteriormente, generar el proceso de migración a través de la barrera endotelial. El pretratamiento con roflumilast por vía oral disminuye de forma dosis dependiente la adhesión y migración leucocitaria en un 85%. Igualmente disminuye la expresión de E-selectina y P-selectina en las vénulas y el CD11b en neutrófilos periféricos, a dosis de 120 µg/kg¹⁶.

Tomando todas estas evidencias experimentales juntas, se puede postular que roflumilast y su metabolito activo (N-óxido roflumilast) producen la inhibición de la interacción de los neutrófilos con las células endoteliales y, por tanto, disminuyen su extravasación y muchas de sus funciones. Esto explicaría por qué roflumilast mitiga la migración de neutrófilos a las vías aéreas que se observa en modelos animales in vivo, después de la aplicación del LPS o la exposición al humo de tabaco.

Un inhibidor del estrés oxidativo

Un efecto clásico de los inhibidores de PDE4 es la reducción de radicales del anión superóxido de neutrófilos humanos estimulados con el fMLP²². Roflumilast y RNO inhiben (máximo 70%) la producción de anión superóxido de neutrófilos de sangre periférica humana, estimulados por fMLP. La inhibición 50% se logra con 4 nM y 8 nM, respectivamente²². En células A549 (línea celular de epitelio de la vía aérea humana), RNO (1 µM) abolió la formación de ROS por TGF-β1, y a 2 nM ejerció un efecto mitad del máximo²³.

En protocolos in vivo, roflumilast (5 mg/kg/día) reduce (aproximadamente un 30%) el contenido de hidroperóxido en el BAL, 14 días después de la administración de bleomicina intratraqueal en ratones²⁴.

En conclusión, roflumilast y su metabolito activo suprimen el estrés oxidativo en cultivos celulares in vitro y en estudios in vivo en animales, pudiendo estos hechos experimentales justificar los efectos favorables del inhibidor de PDE4 en el tratamiento de la EPOC.

Un inhibidor del remodelado pulmonar

Vías aéreas

La administración de bleomicina intratraqueal en animales de laboratorio, produce un remodelado que ocurre en un corto periodo de tiempo (14 días), apareciendo depósitos de colágeno en las zonas fibróticas, acompañados de espacios alveolares agrandados y fragmentación del septo alveolar²⁵. En este modelo experimental, se han estudiado dos protocolos de tratamiento con roflumilast: el preventivo (el fármaco se administra a partir del mismo día que se administra la bleomicina) y el curativo (el fármaco se administra pasada la fase inflamatoria y antes de comenzar la fase fibrótica). En el protocolo preventivo, la administración oral de roflumilast (1 y 5 mg/Kg/día durante 14 días en ratones y 21 días en ratas) disminuye la cantidad de hidroxiprolina en el pulmón en un 47%, con una diferencia clara en las preparaciones histológicas. La expresión del colágeno α1 también se reduce en un 83%. En el protocolo terapéutico también se inhibe un 80% la producción de colágeno α1²⁴. En contraposición a lo dicho, la dexametasona que modificó la expresión del colágeno α1 en el protocolo preventivo, se mostró inefectiva en el terapéutico.

En base a estos resultados, podemos afirmar que roflumilast y N-óxido roflumilast reducen las respuestas fibróticas en el pulmón, inducidas por la administración intratraqueal de bleomicina, tanto en el protocolo terapéutico como en el preventivo^{24,26}.

Circulación pulmonar

La hipertensión pulmonar (HP) se desarrolla en la enfermedad pulmonar obstructiva crónica en estado avanzado²⁷. Roflumilast inhibe, en protocolos preventivos, la HP inducida por hipoxia crónica (después de 15 días) y por monocrotalina (después de 21 días) en ratas²⁸, y por bleomicina (después de 14 días) en ratones²⁴.

Utilizando como estímulo la monocrotalina, roflumilast (1,5 mg/kg/día) inhibe en un 70% en incremento de neo-muscularización de las arteriolas pulmonares, la hipertrofia ventricular y la presión arterial pulmonar. En el caso de emplear la hipoxia crónica, roflumilast (a dosis de 1,5 mg/kg/día) solo inhibe un 38% la presión arterial pulmonar, aunque mantiene la capacidad para disminuir el incremento de neo-muscularización (80% inhibición) y la hipertrofia ventricular (65%)²⁸.

En el modelo de HP inducida por la administración intratraqueal de bleomicina en ratones, el tratamiento con roflumilast (1 y 5 mg/kg/día) muestra sus efectos inhibitorios en la remodelación vascular pulmonar y la hipertrofia del ventrículo derecho²⁴.

En conjunto, estos resultados sugieren que roflumilast disminuye la remodelación arterial pulmonar y HP en diferentes modelos in vivo, efectos que pueden atribuirse a sus numerosas acciones en casi toda las células implicadas en la HP, tales como músculo liso arteriopulmo-

nar, células endoteliales, células inflamatorias como los linfocitos CD8+, y fibroblastos.

Un antienfisematoso

Roflumilast, oral a 5 mg/kg/día, ha demostrado su efectividad reduciendo el enfisema pulmonar en ratones expuestos al humo del tabaco durante 7 meses. La dosis más alta del inhibidor de PDE4, abolió casi totalmente el agrandamiento alveolar secundario a la exposición crónica de humo, e inhibió la pérdida de desmosina pulmonar total (un aminoácido elastina específico) y del área de la superficie interior pulmonar²⁹.

El potencial de roflumilast para proteger la formación del enfisema inducido por tabaco, es similar a los efectos vistos con otros inhibidores de PDE4, GPD-1116³⁰ y Bay 19-8004³¹.

Se han descrito numerosos mecanismos de la enfermedad enfisematosa. Quizás la hipótesis más común relaciona el enfisema con un desequilibrio de la actividad proteasa/antiproteasa. Roflumilast y su metabolito activo inhiben la degradación del neutrófilo humano in vitro³². Otro de los mecanismos postulado para el enfisema es la muerte de las células endoteliales y de las células epiteliales alveolares, Roflumilast y RNO (con una eficacia máxima 40%, EC50 de 0,9 nM) previno la muerte celular en el cultivo de células endoteliales de la vena umbilical humana^{33,34}.

Un importante factor que contribuye al enfisema es el estrés oxidativo³⁵. Roflumilast y sus metabolitos activos reducen la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) en numerosas células, como neutrófilos, músculo liso de arteria pulmonar y epitelio de vía aérea^{18,36}.

En resumen, roflumilast previene el desarrollo del enfisema inducido por el tabaco en modelos experimentales con animales de investigación. La modificación de los diferentes mecanismos que orquestan el agrandamiento y destrucción alveolar, como la acumulación de las células inflamatorias en el espacio alveolar, los procesos apoptóticos de las células endoteliales y la disminución del estrés oxidativo se ven afectadas por los efectos de roflumilast en los modelos experimentales de enfisema.

Un mucorregulador

La obstrucción de la vía aérea pequeña en la EPOC está asociada con un funcionamiento defectuoso del aclaramiento mucociliar³⁷. El sistema mucociliar es una defensa innata del organismo y, por consiguiente, la inefectividad de este sistema en la vía aérea pequeña favorece la colonización bacteriana, con la consecuente inflamación adicional y daño ciliar, produciéndose una perpetuación del mal funcionamiento del aparato mucociliar³⁸. El funcionamiento defectuoso del aclaramiento mucociliar puede ser secundario al proceso inflamatorio de las vías aéreas pequeñas, producido por el humo del tabaco, ya que él mismo puede promover un aumento de las células caliciformes y disminuir las células ciliadas del epitelio bronquial³⁸.

Roflumilast produjo un aumento concentración-dependiente en el batido ciliar en las células del epitelio bronquial, en anillos intactos de bronquio principal y los bronquiolos periféricos de rata. En este estudio, 10 nM y 1 μM de roflumilast aumentaron el batido ciliar en un 20-25% y 68%, respectivamente³⁹.

En otro estudio, roflumilast (1 μM) aumentó el batido ciliar, en un 40%, de células epiteliales nasales cultivadas. El inhibidor de PDE4 revertió la pérdida de actividad de las células ciliadas, secundaria a la exposición al extracto de humo de tabaco⁴⁰.

Roflumilast y otros inhibidores de PDE4 aumentan la actividad del CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*), que es uno de los determinantes de la secreción transepitelial de Cl⁻, que asegura un correcto batido ciliar y transporte de moco. Así lo demuestran una serie de experimentos con células del epitelio bronquial humano, cultivadas en forma polarizada, en una membrana porosa para evaluar el efecto de RNO⁴¹. En este caso, el inhibidor de la PDE4 aumentó la conductancia del Cl⁻, efecto que se abolió por el inhibidor selectivo (CFTR-172) de la conductancia del Cl⁻.

La mucina producida en las células epiteliales de vías aéreas cultivadas (A549) o en tejido bronquial humano fragmentado, por estímulo con el factor de crecimiento epitelial (EGF), es consecuencia de la expresión del gen MUC5AC. Así, en células A549 cultivadas, roflumilast produce una reducción concentración-dependiente en el aumento de la transcripción del MUC5AC y de la proteína mucina producida por EGF. Así, La cantidad de mucina producida tras estímulo por EGF, se redujo aproximadamente un 30% y 60% con 10 nM y 1 μM de roflumilast, respectivamente⁴².

En experimentos in vivo, roflumilast a 1 y 5 mg/kg/día, disminuyó el aumento de la transcripción del MUC5AC pulmonar y la producción de proteína, en ratones sometidos a un estímulo con bleomicina intratraqueal²⁴. Así, el aumento obtenido (2,7 veces) en la proteína de MUC5AC pulmonar estaba reducido un 30% y 55%, respectivamente. En otra serie de experimentos, roflumilast (1,2 mg/kg/día) redujo un 90% el incremento en el número de células caliciformes de epitelio bronquial, provocado por una exposición intratraqueal única a LPS en ratas⁴³.

En resumen, hay evidencia sustancial de que en el epitelio de la vía aérea RNO puede aliviar la producción excesiva de mucinas, aumentar la conductancia transmembrana de Cl⁻, y aumentar la frecuencia del batido ciliar. Estos efectos podrían contribuir a una mejora en los cambios que la EPOC provoca en las vías aéreas pequeñas. No obstante, son necesarios más estudios que exploren si las acciones indicadas llevan al incremento del aclaramiento mucociliar in vivo.

Una cuestión importante es si estos resultados farmacológicos tienen traducción en la clínica. A este respecto, existen estudios en humanos que muestran la existencia de un paralelismo de acciones farmacológicas entre datos preclínicos y clínicos. Así, en el BAL de voluntarios sanos, que se les había aplicado intrabronquialmente endotoxina⁴⁴ y en el esputo inducido en pacientes de EPOC⁴⁵, ambos tratados con roflumilast, se encontró una disminución de neutrófilos y eosinófilos, así como de marcadores solubles de inflamación (IL-8, elastasa, proteína catiónica de eosinófilo y α₂-macroglobulina). Igualmente, la mejora de la función pulmonar y la reducción del número de exacerbaciones ha sido descrita en los pacientes tratados con roflumilast en los ensayos clínicos realizados^{46,47}.

Bibliografía

- Conti M, Beavo J. Biochemistry and physiology of cyclic nucleotide phosphodiesterases: Essential components in Cyclic nucleotide signaling. *Annu Rev Biochem.* 2007; 76:481-511.
- Omori K, Kotera J. Overview of PDEs and their regulation. *Circ Res.* 2007; 100: 309-327.
- Halpin D. ABCD of the phosphodiesterase family: interaction and differential activity in COPD. *International J of COPD.* 2008;3(4) 543-561.
- Gordon E, Lazarus SC. Management of chronic obstructive pulmonary disease: moving beyond the asthma algorithm. *J Allergy Clin Immunol.* 2009;124(5):873-80.
- Bourbeau J, Johnson M. New and controversial therapies for chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc.* 2009;6(6):553-4.
- Stockley RA, Mannino D, Barnes PJ. Burden and pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc.* 2009;6(6):524-6.
- Barnes PJ, Celli BR. Systemic manifestations and comorbidities of COPD. *Eur Respir J.* 2009;33:1165-85.
- Pagès L, Gavalda A, Lehner MD. PDE4 inhibitors: a review of current developments (2005-2009). *Expert Opin Ther Pat.* 2009;19(11):1501-19.
- Cortijo J, Bou J, Beleta J, Cardelus I, Llenas J, Morcillo E, et al. Investigation into the role of phosphodiesterase IV in bronchorelaxation, including studies with human bronchus. *Br J Pharmacol.* 1993;108:562-568.
- Cortijo J, Villagrasa V, Navarrete C, Sanz C, Berto L, Michel A, et al. Effects of SCA40 on human isolated bronchus and human polymorphonuclear leukocytes: comparison with rolipram, SKF94120 and levcromakalim. *Br J Pharmacol.* 1996;119: 99-106.
- Cortijo J, Marti-Cabrera M, Berto L, Anton F, Carrasco E, Grau M, et al. Pharmacological activity of PF-904 in guinea pig in vivo, and on human bronchus and neutrophils in vitro. *Eur J Pharmacol.* 1997a; 333:69-78.
- Cortijo J, Pons R, Dasi F, Marin N, Martinez-Losa M, Advenier C, et al. Bronchodilator and anti-inflammatory activities of SCA40: studies in human isolated bronchus, human eosinophils, and in the guinea-pig in vivo. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 1997b;356:806-814.

13. Cortijo J, Naline E, Ortiz JL, Berto L, Girard V, Malbezin M, et al. Effects of fenspiride on human bronchial cyclic nucleotide phosphodiesterase isoenzymes: functional and biochemical study. *Eur J Pharmacol.* 1998;341:79-86.
14. Cortijo J, Villagrasa V, Pons R, Berto L, Martí-Cabrera M, Martínez-Losa M, et al. Bronchodilator and anti-inflammatory activities of glaucine: *In vitro* studies in human airway smooth muscle and polymorphonuclear leukocytes. *Br J Pharmacol.* 1999;127:1641-51.
15. Sanz MJ, Cortijo J, Morcillo EJ. PDE4 inhibitors as new anti-inflammatory drugs: effects on cell trafficking and cell adhesion molecules expression. *Pharmacol Ther.* 2005;106(3):269-97.
16. Sanz MJ, Cortijo J, Taha MA, Cerda-Nicolas M, Schatton E, Burgbacher B, et al. Roflumilast inhibits leukocyte-endothelial cell interactions, expression of adhesion molecules and microvascular permeability. *Br J Pharmacol.* 2007;152:481-92.
17. Bethke TD, Bohmer GM, Hermann R, Hauns B, Fux R, Morike K, et al. Dose-proportional intraindividual single- and repeated-dose pharmacokinetics of roflumilast, an oral, once-daily phosphodiesterase 4 inhibitor. *J Clin Pharmacol.* 2007;47:26-36.
18. Hatzelmann A, Schudt C. Anti-inflammatory and immunomodulatory potential of the novel PDE4 inhibitor roflumilast *in vitro*. *J Pharmacol Exp Ther.* 2001;297:267-79.
19. Hatzelmann A, Morcillo EJ, Lungarella G, Adnot S, Sanjar S, Beume. The preclinical pharmacology of roflumilast—a selective, oral phosphodiesterase 4 inhibitor in development for chronic obstructive pulmonary disease. *Pulm Pharmacol Ther.* 2010;23(4):235-56.
20. Ortiz JL, Cortijo J, Valles JM, Morcillo EJ. Rolipram inhibits PAF-induced airway microvascular leakage in guinea-pig: a comparison with milrinone and theophylline. *Fund Clin Pharmacol.* 1992;6:247-249.
21. Ortiz JL, Valles JM, Martí-Cabrera M, Cortijo J, Morcillo EJ. Effects of selective phosphodiesterase inhibitors on platelet-activating factor- and antigen-induced airway hyperreactivity, eosinophil accumulation, and microvascular leakage in guinea pigs. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 1996;353:200-206.
22. Hatzelmann A, Schudt C. Antiinflammatory and immunomodulatory potential of the novel PDE4 inhibitor roflumilast *in vitro*. *J Pharmacol Exp Ther.* 2001;297:267-79.
23. Milara J, Cortijo J, Mata M, Donet E, Mauricio M, Morcillo EJ. The PDE4 inhibitor roflumilast N-oxide partly reversed TGFβ1-induced changes in collagen I and E-cadherin expression in human airway epithelial cells. *Eur Respir J Suppl.* 2008a;639s: P3648.
24. Cortijo J, Iranzo A, Milara X, Mata M, Cerdá-Nicolás M, Ruiz-Saurí A, et al. Roflumilast, a phosphodiesterase 4 inhibitor, alleviates bleomycin-induced lung injury. *Br J Pharmacol.* 2009;156(3):534-44.
25. Borzone G, Moreno R, Urrea R, Meneses M, Oyarzun M, Lisboa C. Bleomycin-induced chronic lung damage does not resemble human idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;163:1648-53.
26. Chaudhary NI, Schnapp A, Park JE. Pharmacologic differentiation of inflammation and fibrosis in the rat bleomycin model. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006;173:769-76.
27. Chaouat A, Naeije R, Weitzenblum E. Pulmonary hypertension in COPD. *Eur Respir J.* 2008;32:1371-85.
28. Izikki M, Raffestin B, Klar J, Hatzelmann A, Marx D, Tenor H, et al. Effects of roflumilast, a phosphodiesterase-4 inhibitor, on hypoxia- and monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 2009;330:54-62.
29. Martorana PA, Beume R, Lucattelli M, Wollin L, Lungarella G. Roflumilast fully prevents emphysema in mice chronically exposed to cigarette smoke. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005;172:848-53.
30. Tran Mori H, Nose T, Ishitani K, Kasagi S, Souma S, Akiyoshi T, et al. Phosphodiesterase 4 inhibitor GPD-1116 markedly attenuates the development of cigarette smoke-induced emphysema in senescence-accelerated mice P1 strain. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2008;294:L196-L204.
31. Fox JC, Spicer D, Henning R, Meshi B, Shrad MT, Hogg JC. Efficacy of the PDE4 inhibitor, BAY 19-8004, in tobacco smoke models of COPD in the guinea pig. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003;167:A91.
32. Jones NA, Boswell-Smith V, Lever R, Page CP. The effect of selective phosphodiesterase isoenzyme inhibition on neutrophil function *in vitro*. *Pulm Pharmacol Ther.* 2005;18:93-101.
33. Kasahara Y, Tuder RM, Cool CD, Lynch DA, Flores SC, Voelkel NF. Endothelial cell death and decreased expression of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor 2 in emphysema. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;163:737-44.
34. Namkoong S, Kim CK, Cho YL, Kim JH, Lee H, Ha KS, et al. Forskolin increases angiogenesis through the coordinated cross-talk of PKA-dependent VEGF expression and Epac-mediated PI3K/Akt/eNOS signaling. *Cell Signal.* 2009;21:906-15.
35. Foronjy RF, Mirochnitchenko O, Propokenko O, Lemaitre V, Jia Y, Inouye M, et al. Superoxide dismutase expression attenuates cigarette smoke- or elastase-generated emphysema in mice. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006;173:623-31.
36. Muzaffar S, Shukla N, Angelini GD, Jeremy JY. Roflumilast N-oxide inhibits NADPH oxidase expression and activity in human pulmonary artery smooth muscle cells. *Proc Br Pharmacol Soc.* 2008;6:027P.
37. Hogg JC, Chu F, Utokaparch S, Woods R, Elliott WM, Buzatu L, et al. The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med.* 2004;350:2645-53.
38. Agusti AG. COPD, a multicomponent disease: implications for management. *Respir Med.* 2005;99:670-82.
39. Wohlsten A, Wollin L, Marx D, Beume R. Effect of roflumilast and other cAMP elevating agents on airway beat ciliary frequency in proximal and distal airways in rat precision cut lung slices. Fifth International Multidisciplinary Conference on Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD5), June 28-30, Birmingham, UK, 2006: Poster P25.
40. Milara J, Cortijo J, Armengot M, Banuls P, Gabarda E, Morcillo E. Effect of roflumilast, a PDE4 inhibitor on ciliary beat frequency in human nasal epithelial cells. *Eur Respir J Suppl.* 2008;639s:P3651.
41. Pedemonte N, Galiotta L. Stimulation of CFTR-dependent chloride secretion by roflumilast. *Eur Respir J Suppl.* 2008;644s:P3672.
42. Mata M, Sarria B, Buenestado A, Cortijo J, Cerda M, Morcillo EJ. Phosphodiesterase 4 inhibition decreases MUC5AC expression induced by epidermal growth factor in human airway epithelial cells. *Thorax.* 2005;60:144-52.
43. Weidenbach A, Braun C, Lehner MD, Schwoebel F, Beume R, Barsig J. Therapeutic effect of roflumilast on LPS- and OVA-induced goblet cell hyperplasia in rats. *Eur Respir J Suppl.* 2007;E315.
44. Hohlfeld JM, Schoenfeld K, Lavae-Mokhtari M, Schaumann F, Mueller M, Bredembroeker D, et al. Roflumilast attenuates pulmonary inflammation upon segmental endotoxin challenge in healthy subjects: a randomized placebo-controlled trial. *Pulm Pharmacol Ther.* 2008;21:616-23.
45. Grootendorst DC, Gauw SA, Verhoosel RM, Sterk PJ, Hospers JJ, Bredembroeker D, et al. Reduction in sputum neutrophil and eosinophil numbers by the PDE4 inhibitor roflumilast in patients with COPD. *Thorax.* 2007;62:1081-7.
46. Fabbri LM, Calverley PM, Izquierdo-Alonso JL, Bundschuh DS, Brose M, Martinez, et al. M2-127 and M2-128 study groups. Roflumilast in moderate-to-severe chronic obstructive pulmonary disease treated with longacting bronchodilators: two randomised clinical trials. *Lancet.* 2009;374(9691):695-703.
47. Calverley PM, Rabe KF, Goehring UM, Kristiansen S, Fabbri LM, Martinez FJ. M2-124 and M2-125 study groups. Roflumilast in symptomatic chronic obstructive pulmonary disease: two randomised clinical trials. *Lancet.* 2009;374(9691):685-94.