

Original

Mecanismos moleculares de inflamación durante las agudizaciones de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica[☆]

Ana L. Kersul^a, Amanda Iglesias^{b,f}, Ángel Ríos^{b,e}, Aina Noguera^{c,f}, Aina Forteza^d, Enrique Serra^d, Alvar Agustí^{a,e,f} y Borja G. Cosío^{a,e,f,*}

^a Servicio de Neumología, Hospital Universitario Son Dureta, Palma de Mallorca, España

^b Unidad de Investigación, Hospital Universitario Son Dureta, Palma de Mallorca, España

^c Servicio de Análisis Clínicos, Hospital Universitario Son Dureta, Palma de Mallorca, España

^d Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Universitario Son Dureta, Palma de Mallorca, España

^e Fundación Caubet-Cimera

^f Ciber Enfermedades Respiratorias

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 22 de julio de 2010

Aceptado el 13 de diciembre de 2010

Palabras clave:

Exacerbación de EPOC

Inflamación

Acetilación de histonas

RESUMEN

Introducción: Las agudizaciones de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (AEPOC) se caracterizan por una respuesta inflamatoria pulmonar y sistémica, que persiste tiempo después de la resolución clínica. Los mecanismos de este proceso inflamatorio no son bien conocidos.

Objetivos: Investigar los cambios inflamatorios y sus mecanismos durante las agudizaciones de la EPOC.

Métodos: Se determinaron las concentraciones de células inflamatorias en sangre y esputo, óxido nítrico en aire exhalado (FeNO), proteína C reactiva (PCR) en plasma, citocinas (interleucinas [IL] 6, 8, 1β, 10, 12, TNF-α) y SLPI (inhibidor de la leucoproteasa), marcadores de estrés oxidativo, la actividad del factor nuclear kappa B (NF-κB) y de la enzima histona deacetilasa (HDAC) a 17 pacientes durante una AEPOC, en fase estable y a 17 controles fumadores y 11 no fumadores.

Resultados: Las AEPOC se caracterizaron por presentar niveles elevados de FeNO ($p < 0,05$), PCR en plasma ($p < 0,001$) e IL-8, IL-1β, IL-10 en esputo ($p < 0,05$) y mayor activación de NF-κB en macrófagos de esputo en comparación con EPOC estable y controles. Durante la fase estable persisten niveles elevados de estrés oxidativo, SLPI, IL-8, IL-6 y TNF-alfa, sin objetivarse cambios en la actividad HDAC ni en la cantidad de neutrófilos en esputo a pesar de presentar una mejoría significativa ($p < 0,05$) de la función pulmonar.

Conclusiones: Durante las AEPOC se observan cambios en marcadores inflamatorios pulmonares y sistémicos que no se resuelven por completo en fase estable. El tratamiento actual no permite modificar la actividad HDAC lo que limita sus efectos antiinflamatorios.

© 2010 SEPAR. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Molecular Mechanisms of Inflammation During Exacerbations of Chronic Obstructive Pulmonary Disease

ABSTRACT

Introduction: Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is characterised by an inflammatory and systemic response that increases during exacerbations of the disease (ECOPD), although the mechanisms of this inflammatory process are not well known.

Objectives: To explore the inflammatory changes and possible mechanisms during ECOPD.

Methods: We determined the inflammatory cell concentrations in blood and sputum, nitric oxide in exhaled air (FeNO), reactive C-reactive protein (CRP) in plasma, cytokines (IL-6, 8, 1β, 10, 12, TNF-α) and SLPI and total antioxidant activity (TAS) in blood and sputum, the activity of nuclear kappa B factor (NF-κB) and of the histone deacetylase enzymes (HDAC) in 17 patients during ECOPD, in stable phase and in 17 smoking controls and 11 non-smoking.

Results: ECOPD is characterised by higher levels of FeNO ($P < .05$), plasma CRP ($P < .001$) and IL-8, IL-1β, IL-10 in sputum ($P < .05$) compared with stable COPD and controls. The TAS levels in sputum were lower in the exacerbated than in stable phase ($P < .05$) although significantly higher than the controls ($P < .05$).

Keywords:

COPD exacerbation

Inflammation

Histone acetylation

[☆] Proyecto financiado por FIS 04/2146, ABEMAR, y beca SEPAR.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: borja.cosio@ssib.es (B.G. Cosío).

These findings were accompanied by a greater activation of NF- κ B in sputum macrophages during the ECOPD with no changes in the HDAC activity or in the number of neutrophils in sputum, and a statistically significant deterioration ($P < .05$) of lung function.

Conclusions: Changes were observed in different pulmonary and systemic inflammatory markers during ECOPD, that were not completely resolved during stability. However, current treatment does not allow the modification of HDAC activity, which limits its anti-inflammatory effects.

© 2010 SEPAR. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción

La enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) se caracteriza por la presencia de una reacción inflamatoria crónica en respuesta a la exposición prolongada al humo del tabaco¹. Los pacientes con EPOC presentan con frecuencia agudizaciones de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (AEPOC). Las AEPOC constituyen un problema socio-sanitario de primera magnitud por su influencia negativa sobre la calidad de vida^{2,3}, la función pulmonar^{4,5} y el pronóstico de estos enfermos^{6,7} además de su coste social y económico.

La patogenia de los episodios de AEPOC es poco conocido. Existen diversos estudios que demuestran que los episodios de AEPOC se caracterizan por el aumento de diversos marcadores inflamatorios, incluyendo el número de neutrófilos y macrófagos en la vía aérea y la concentración de citocinas, particularmente IL-6 e IL-8^{8,9}, lo que sugiere que el «mecanismo patogénico» fundamental de los episodios de AEPOC es un «brote inflamatorio» pulmonar, con independencia de su causa «desencadenante» (infección, contaminación atmosférica u otros).

Los mecanismos moleculares de esta respuesta inflamatoria son poco conocidos. La activación del factor nuclear kappa B (NF- κ B) juega un papel central en la respuesta inflamatoria en general, y se ha postulado que en la de la EPOC en particular^{10–12}. En condiciones normales, NF- κ B está localizado en el citoplasma de la célula y constituido por dos sub-unidades (p65, p50) que son inactivadas por la unión de la proteína I- κ B. La fosforilación de la subunidad inhibitoria (I- κ B) permite la translocación al núcleo de p65 y p50, su unión a zonas específicas del genoma y la activación de la expresión de diversos genes pro-inflamatorios (TNF- α , IL-8, GM-CSF, iNOS, IL-1 β).

En el núcleo, el ADN se encuentra combinado con un grupo de proteínas denominadas histonas¹³. El nivel de acetilación de estas histonas (medida como actividad histona acetil-transferasa, [HAT]) 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 histona deacetilasas (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. Los glucocorticoides, potentes fármacos antiinflamatorios, inhiben la actividad HAT mediada por NF- κ B y reclutan histona deacetilasas (HDAC)^{14–16} que revierten el proceso de acetilación de histonas e impiden el acceso de factores de transcripción (NF- κ B entre otros) al ADN y la transcripción de proteínas inflamatorias. Importantes factores patogénicos en la EPOC, como el estrés oxidativo y el humo del tabaco disminuyen la actividad HDAC de los macrófagos alveolares^{17–19} y potencian la persistencia del proceso inflamatorio. Se ha sugerido que estos efectos moleculares pueden contribuir a explicar la aparente córtico-resistencia observada en pacientes con EPOC estable²⁰. La

alteración de estos mecanismos durante las AEPOC no ha sido explorada.

Diversos estudios sugieren que la resolución de la inflamación puede tardar meses tras el episodio que agudización⁴. En este estudio pretendemos explorar la hipótesis de que la respuesta inflamatoria tras la agudización es atenuada en parte tras la inhibición de la transcripción inflamatoria dependiente de NF- κ B pero no se resuelve por completo debido, al menos en parte, a la persistencia de una actividad HDAC disminuida.

El objetivo de este estudio fue describir los cambios inflamatorios pulmonares y sistémicos durante las agudizaciones de la EPOC y explorar los mecanismos moleculares relacionados con dichos cambios.

Métodos

Se reclutaron pacientes con diagnóstico de AEPOC durante las primeras 24 horas de ingreso en el servicio de Urgencias. Estos pacientes tenían diagnóstico de EPOC, definida como un cociente FEV₁/FVC < 70% determinado durante estabilidad de acuerdo a los criterios GOLD, una historia de tabaquismo > 15 paquetes/año y diagnóstico de AEPOC 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 > 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.

Diseño

Al ingreso todos los pacientes recibieron tratamiento de acuerdo a las guías internacionales, que incluía broncodilatadores nebulizados (beta-agonistas y anticolinérgicos), glucocorticoides sistémicos (orales o intravenosos) y antibióticos a todos los pacientes que cumplieran al menos dos de los siguientes criterios:

- a) aumento de la disnea habitual del enfermo;
- b) fiebre;
- c) aumento del volumen de esputo, y
- d) aumento del grado de purulencia del esputo²¹.

Si el paciente aceptaba participar en el estudio, durante las primeras 24 horas de ingreso se realizaba espirometría, gasometría arterial, FeNO y se obtenía una muestra de esputo inducido y sangre.

A los tres meses del alta hospitalaria se programaba una visita ambulatoria en fase estable. Se consideró estabilidad clínica si el paciente no había tenido síntomas de agudización (cambios en la disnea, tos y expectoración) ni necesidad de cambiar su tratamiento habitual. Si el paciente hubiera presentado otro episodio de AEPOC, se citaba tres meses más tarde. Durante la visita ambulatoria se repetían todas las pruebas realizadas durante la hospitalización.

A los controles reclutados en el laboratorio de pruebas funcionales respiratorias, tras aceptar participar en el estudio se les realizó espirometría, gasometría arterial, FeNO y se obtuvo una muestra de esputo inducido y sangre.

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 al ingreso y en fase estable²². Los valores de referencia espirométricos usados fueron los de la población mediterránea. Si se disponía de PFR previas se las utilizaba para confirmar el diagnóstico.

Medición del óxido nítrico en aire exhalado

La medición de óxido nítrico en aire exhalado (FeNO) se realizó con un analizador (Sievers Instruments Inc. Model 280NOA, Boulder, CO, EE. UU.) conectado a un tubo de teflón, siguiendo las recomendaciones del *European Respiratory Task Force*, continuando con una metodología previamente descrita en nuestro grupo²³.

Muestras de esputo y preparación

La inducción del esputo y su procesamiento se realizó siguiendo una metodología estandarizada en nuestro laboratorio y previamente descrita²⁴. Brevemente, el esputo obtenido fue incubado con 0.01 M DTT en *Hank's Buffer SALT Solution* (HBSS), a 4 °C durante 15 minutos, diluido con HBSS, y entonces era filtrado a través de una malla de nylon de 50 µm para quitar la mucosidad y detritus, sin remover células y se centrifugaba a 790 × g 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. Para obtener el recuento celular se realizan citocentrífugados de la suspensión celular y se realiza tinción con Diff-Quick (*International Medical Equipment*, San Marcos, CA 92069, EE. UU.). 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 (*multiwell primaria surface modified polystyrene*, Falcon 35.3846) a una densidad de 1 × 10⁶ células/pocillo en 2 ml 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 (*Nuclear extract kit*, Active Motif, Carlsbad, CA 92008, EE. UU.).

Determinación de citocinas

La concentración de citocinas (TNF-α, IL-6, and IL-8) se determinó en el sobrenadante por citometría de flujo (CBA, *Human inflammation Kit*, BD Biosciences, San Jose, CA, EE. UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante. La sensibilidad de la prueba, expresada por el fabricante fue la siguiente: 3,6 pg/ml para IL-8, 2,5 pg/ml para IL-6, y 3,7 pg/ml para TNF-α. La determinación de inhibidor de

la peptidasa secretoria de los leucocitos (SLPI) se realizó mediante ELISA específico (R&D systems, Minneapolis, MN, EE. UU.).

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 grupo²⁵.

Actividad de enzimas histona deacetilasas (HDAC)

Se midió la actividad HDAC en extractos nucleares de macrófagos del esputo mediante una prueba no-isotópica usando un derivado fluorescente derivado de la epsilon-acetil lisina (HDAC *fluorescent Activity Assay Kit*, BIOMOL, Plymouth, PA, EE. UU.) utilizando las instrucciones del fabricante.

Actividad del factor nuclear kappa B (NF-κB)

En extractos nucleares de macrófagos del esputo se midió la activación NF-κB usando el Kit de ensayo TransAM NF-κB p65 Transcription Factor (*Active Motif*, Carlsbad, CA, EE. UU.) utilizando las instrucciones del fabricante.

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.

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, FeNO, 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 Prisma GraphPad (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EE. UU.).

Resultados

Datos clínicos

Se reclutaron 17 pacientes con diagnóstico previo de EPOC durante una agudización, 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 1*. Cinco pacientes (29%) con AEPOC 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.

Marcadores de inflamación pulmonar

El patrón celular del esputo muestra un predominio neutrofílico en pacientes con EPOC durante la agudización pero que también

Tabla 1
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
N.º pacientes con AEPOC previas	9	0	0
N.º pacientes recibiendo CSI	13	0	0

Valores expresados como media ± desviación estándar.

CSI: corticosteroides inhalados; FEV₁: volumen espiratorio forzado en el primer segundo en fase estable; IMC: índice de masa corporal.

Tabla 2
Patrón celular de esputo

	AEPOC	Estable	Fumador	No fumador
PMN (%)	47,96 (6,86)	45,93 (8,59)	9,69 (4,5) [†]	1,92 (0,71) ^{* †}
MCF (%)	14 (9,96)	21,68 (6,46)	72,39 (11,61) ^{* †}	75,94(2,35) ^{* †}
LINFOS (%)	38,02 (3,09)	31,93 (5,29) [‡]	17,9 (7,29) ^{* †}	22,07(3,02) ^{* †}

Porcentaje de células expresado como media ± desviación estándar.

* p < 0,001 respecto a AEPOC.

† p < 0,001 respecto a estable.

‡ p < 0,05 respecto a AEPOC.

persiste durante la fase estable, mientras que los controles muestran un predominio de macrófagos y linfocitos (tabla 2).

Los pacientes EPOC agudizados presentaron niveles más elevados de FeNO que se reducen significativamente durante la fase estable (p < 0,05), no observándose diferencias entre los individuos en fase estable y controles, tanto fumadores como no fumadores (fig. 1).

Durante las AEPOC también encontramos niveles significativamente elevados de citocinas inflamatorias IL-8, IL-1β, IL-6 y TNF-α en esputo (fig. 2). IL-8 e IL-1β 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-1β disminuyeron hasta niveles similares a los controles. Las citocinas 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 (fig. 3).

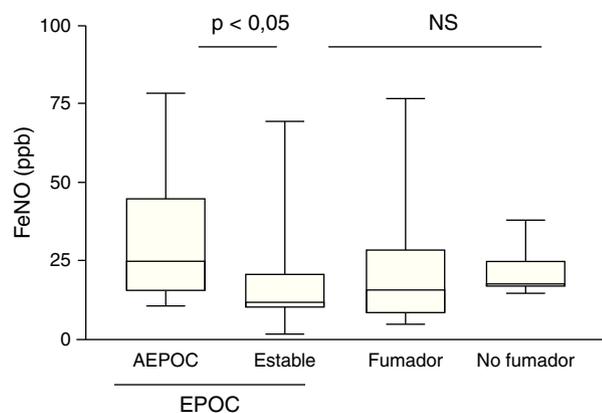


Figura 1. Diferencias en la fracción exhalada de óxido nítrico (FeNO) entre pacientes con agudización de EPOC (AEPOC) y fase estable en comparación con controles fumadores y no fumadores.

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 3).

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, 1β, 10, 12, TNF-α medidos en los diferentes grupos.

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) (fig. 4).

La agudización de EPOC se relacionó con una mayor actividad NF-κB en macrófagos de esputo que disminuye en fase estable (p < 0,05) y que fue mayor que los controles no fumadores (p < 0,01) (fig. 4). 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 (r² = 0,38, p < 0,05) (fig. 5). No se encontraron correlaciones significativas entre los niveles de activación de NF-κB o de estrés oxidativo con el resto de parámetros inflamatorios.

Función pulmonar

Los pacientes con EPOC presentaron una recuperación significativa de la función pulmonar a los tres meses de la agudización

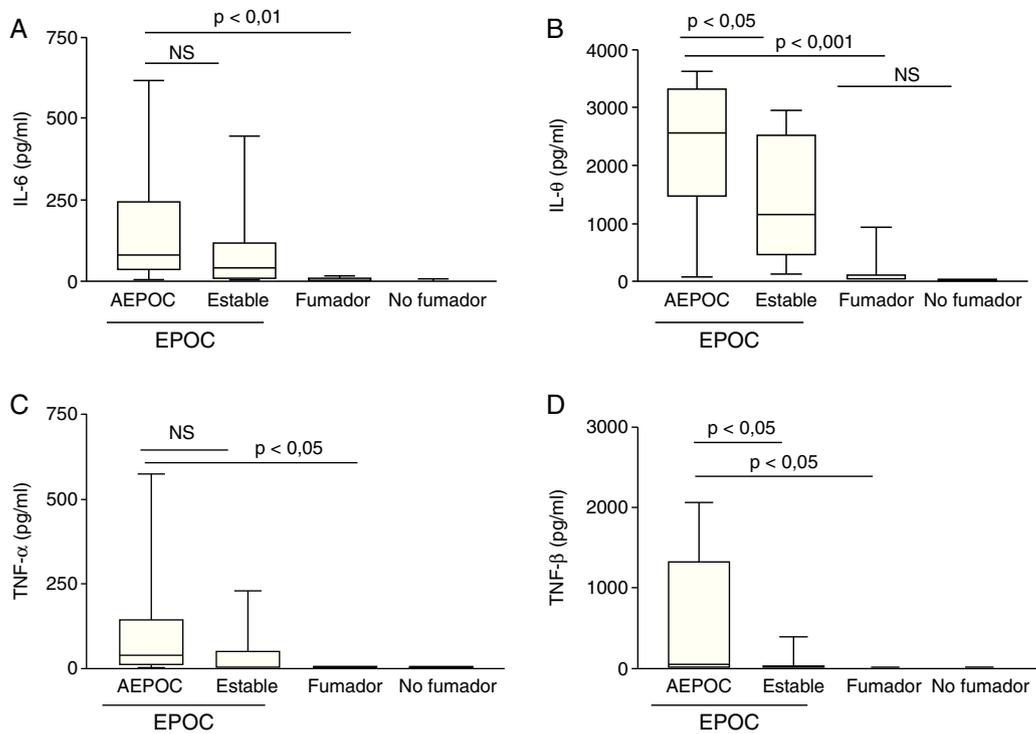


Figura 2. Diferencias en la concentración en esputo de diferentes marcadores inflamatorios: interleucina 6 (IL-6, Panel A), interleucina 8 (IL-8, Panel B), factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α, Panel C) e interleucina 1 beta (IL-1β, Panel D).

Tabla 3
Marcadores inflamatorios sistémicos

	AEPOC	Estable	Fumador	No fumador
Leu totales ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	12,14 (0,97)	8,59 (0,61) [‡]	7,70 (0,49) [‡]	6,28 (0,56) ^{* †}
PMN total ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	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 ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	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 ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	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 AEPOC.

† p < 0,001 respecto a estable.

‡ p < 0,05 respecto a AEPOC.

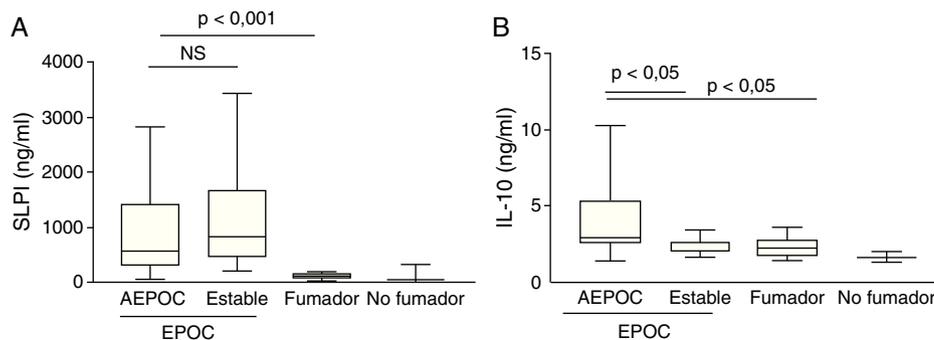


Figura 3. Concentración en esputo de citocinas anti-inflamatorias: inhibidor de las leucoproteasas del suero (SLPI, Panel A) e interleucina 10 (IL-10, Panel B).

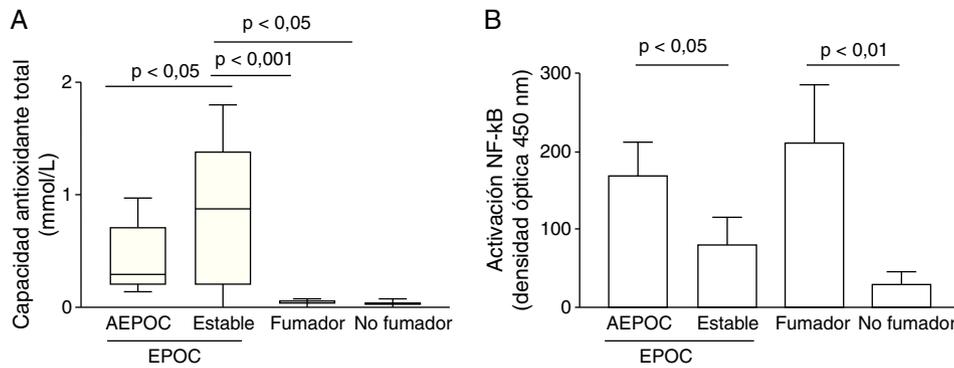


Figura 4. Niveles de estrés oxidativo en esputo medidos por la capacidad antioxidante total (Panel A). Diferencias en los niveles de activación del factor nuclear kappa B (NF-κB, Panel B) en extractos nucleares de macrófagos de esputo.

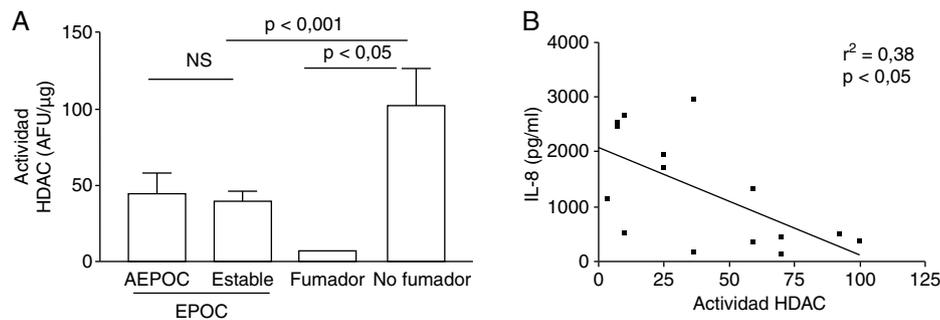


Figura 5. Reducción de la actividad HDAC en pacientes fumadores y pacientes con EPOC (Panel A). Esta reducción está inversamente correlacionada con los niveles de interleucina 8 en esputo (IL-8, Panel B).

(p < 0,05) (fig. 6) sin encontrarse correlación con los parámetros de inflamación pulmonar. No hubo cambios significativos en la FVC.

Discusión

En nuestro estudio encontramos que durante las AEPOC 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-κB. 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-κB (mediante localización nuclear por inmunocitoquímica pero sin estudiar su actividad real)²⁶ y el papel del estrés oxidativo durante las agudizaciones²⁷ que daría lugar a una mayor liberación de citocinas que inducen mayor expresión de moléculas de adhesión endotelial como el TNF-α, y quimiocinas 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 agudización⁹. 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 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 clínicos²⁴.

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^{8,28-30}. En nuestro estudio demostramos que, con independencia de la presencia de gérmenes en el esputo de los pacientes agudizados, existe un aumento de la

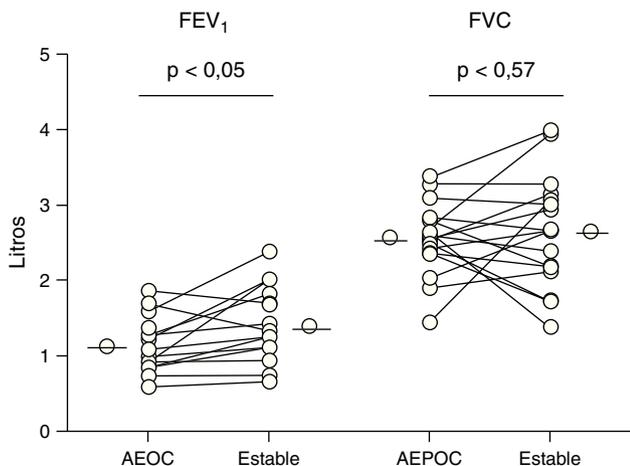


Figura 6. Diferencias en volumen espirado en el primer segundo (FEV₁) y capacidad vital forzada (FVC) durante la agudización y durante la fase estable.

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 traqueo-bronquial y de neutrófilos en la luz de las vías respiratorias. Este patrón celular se modifica en las exacerbaciones donde predominan eosinófilos y neutrófilos²⁸. Esta evidencia permite asumir que la inflamación de la vía aérea está amplificada, 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 cardiovascular³¹. Los mecanismos de este proceso inflamatorio no son bien conocidos, y aquí demostramos que el estrés oxidativo y la activación del factor NF- κ B, vía inflamatoria donde convergen diferentes estímulos tanto infecciosos como de otra índole, juegan un papel predominante. Sin embargo, el mecanismo molecular que regula la transcripción de genes inflamatorios en el núcleo celular, que basalmente está disminuida en la EPOC³² y que es responsable de la corticorresistencia observada en el proceso inflamatorio de la EPOC estable³³, 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- α . Perera et al³⁴ 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 pueden ir en la misma línea. Pinto-Plata et al³⁵ intentaron relacionar citocinas 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.

Implicaciones clínicas

La persistencia del proceso inflamatorio tras la exacerbación tiene una traducción clínica relevante. De hecho, es posible que la alta tasa de reingresos en las primeras semanas tras una agudización pueda estar en relación con la persistencia del proceso inflamatorio³⁴. El mecanismo responsable puede tener relación con la falta de activación de la actividad HDAC. Por tanto, fármacos dirigidos a potenciar la actividad HDAC tendrían una traducción clínica relevante ya que al reducir el proceso inflamatorio neutrofilico no sensible al tratamiento corticoideo, podrían reducir la tasa de reingresos y de agudizaciones de estos pacientes. Obviamente, son necesarios ensayos clínicos aleatorizados para confirmar estas implicaciones clínicas propuestas.

Limitaciones potenciales

El objetivo de este estudio fue describir los mecanismos moleculares potenciales que juegan un papel en el proceso inflamatorio subyacente en la EPOC. Se ha estudiado la microbiología de esputo como posible causa de agudización, pero el papel preciso de factores

proinflamatorios distintos a la infección bacteriana como la contaminación ambiental, cambios de temperatura o las infecciones víricas no ha sido determinado. Del mismo modo la proporción de cultivos con BPP es bajo (29%), sin encontrarse diferencias con los pacientes con cultivo negativo, lo cual puede sugerir que el mecanismo molecular último es el mismo. La baja proporción de pacientes colonizados en fase estable (12%) no justificaría el efecto observado sobre la falta de activación de la actividad HDAC ni la persistencia de parámetros elevados.

Un número importante de pacientes (76%) estaba recibiendo tratamiento con corticoides inhalados, por lo que el efecto que este tratamiento puede haber tenido sobre los parámetros inflamatorios no se puede determinar. Otra limitación es el número bajo de controles no fumadores analizados. El tamaño muestral no permite hacer asociaciones con parámetros clínicos pero es suficiente para detectar cambios significativos en diversos parámetros inflamatorios.

Conclusiones

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. En el mecanismo molecular de los cambios inflamatorios pulmonares participan el estrés oxidativo y el factor nuclear NF- κ B. La mayor activación del factor nuclear NF- κ B observada durante la agudización disminuye en fase estable en probable relación con el tratamiento glucocorticoideo, no siendo así el mecanismo último de regulación de la transcripción inflamatoria, la actividad HDAC, que podría ser responsable de la persistencia de la inflamación neutrofilica tras la agudización.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos

Los autores agradecen la colaboración de los doctores del servicio de Urgencias: Dr. Joan Vidal, Dr. Javier García y Dr. Jordi Puiguríguer, por su cooperación durante el reclutamiento, al Dr. Alberto Fuster por su ayuda en la realización del ensayo de TAS y a la Dra. Catalina Crespi por su asistencia con el *Cytometric Bead Array*.

Bibliografía

1. Rabe KF, Hurd S, Anzueto A, Barnes PJ, Buist SA, Calverley P, et al. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007;176:532-55.
2. Seemungal TA, Donaldson GC, Paul EA, Bestall JC, Jeffries DJ, Wedzicha JA. Effect of exacerbation on quality of life in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998;157:1418-22.
3. Spencer S, Jones PW. Time course of recovery of health status following an infective exacerbation of chronic bronchitis. *Thorax*. 2003;58:589.
4. Seemungal TA, Donaldson GC, Bhowmik A, Jeffries DJ, Wedzicha JA. Time course and recovery of exacerbations in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;161:1608-13.
5. Donaldson GC, Seemungal TA, Bhowmik A, Wedzicha JA. Relationship between exacerbation frequency and lung function decline in chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax*. 2002;57:847-52.
6. Almagro P, Calbo E, Ochoa DE, Barreiro B, Quintana S, Heredia JL, et al. Mortality after hospitalization for COPD. *Chest*. 2002;121:1441-8.
7. Soler-Cataluna JJ, Martínez-García MA, Román SP, Salcedo E, Navarro M, Ochando R. Severe acute exacerbations and mortality in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax*. 2005;60:925-31.
8. Bhowmik A, Seemungal TA, Sapsford RJ, Wedzicha JA. Relation of sputum inflammatory markers to symptoms and lung function changes in COPD exacerbations. *Thorax*. 2000 February;55:114-20.
9. Fujimoto K, Yasuo M, Urushibata K, Hanaoka M, Koizumi T, Kubo K. Airway inflammation during stable and acutely exacerbated chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J*. 2005;25:640-6.

10. Di Stefano A, Caramori G, Oates T, Capelli A, Lusuardi M, Gnemmi I, et al. Increased expression of nuclear factor- κ B in bronchial biopsies from smokers and patients with COPD. *Eur Respir J*. 2002;20:556–63.
11. Bowie A, O'Neill LA. Oxidative stress and nuclear factor- κ B activation: a reassessment of the evidence in the light of recent discoveries. *Biochem Pharmacol*. 2000;59:13–23.
12. Barnes PJ. Chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med*. 2000;343:269–80.
13. Grunstein M. Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature*. 1997;389:349–52.
14. Ito K, Barnes PJ, Adcock IM. Glucocorticoid receptor recruitment of histone deacetylase 2 inhibits interleukin-1 β -induced histone H4 acetylation on lysines 8 and 12. *Mol Cell Biol*. 2000;20:6891–903.
15. Ito K, Jazwari E, Cosio B, Barnes PJ, Adcock IM. p65-activated histone acetyltransferase activity is repressed by glucocorticoids: Mifepristone fails to recruit HDAC2 to the p65/HAT complex. *J Biol Chem*. 2001;276:30208–15.
16. Cosio BG, Torrego A, Adcock IM. Molecular mechanisms of glucocorticoids. *Arch Bronconeumol*. 2005;41:34–41.
17. Ito K, Lim S, Caramori G, Chung KF, Barnes PJ, Adcock IM. Cigarette smoking reduces histone deacetylase 2 expression, enhances cytokine expression, and inhibits glucocorticoid actions in alveolar macrophages. *FASEB J*. 2001;15:1110–2.
18. Cosio BG, Jazrawi E, Barnes PJ, Adcock IM. Oxidative stress augments cytokine production in different cell lines. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;165:A88. Ref Type: Abstract.
19. Cosio BG, Jazrawi E, Ito K, Barnes PJ, Adcock IM. Cigarette smoke decreases steroid responsiveness in monocytes: the role of histone deacetylases. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;167:A804.
20. Barnes PJ, Ito K, Adcock IM. Corticosteroid resistance in chronic obstructive pulmonary disease: inactivation of histone deacetylase. *Lancet*. 2004;363:731–3.
21. Carrera M, Sala E, Cosio BG, Agusti AG. Hospital treatment of chronic obstructive pulmonary disease exacerbations: an evidence-based review. *Arch Bronconeumol*. 2005;41:220–9.
22. Standardization of Spirometry, 1994 Update. American Thoracic Society. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995;152:1107–36.
23. Agusti AG, Villaverde JM, Togoires B, Bosch M. Serial measurements of exhaled nitric oxide during exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J*. 1999;14:523–8.
24. Cosio BG, Iglesias A, Ríos A, Noguera A, Sala E, Ito K, et al. Low-dose theophylline enhances the anti-inflammatory effects of steroids during exacerbations of COPD. *Thorax*. 2009;64:424–9.
25. Barcelo A, Barbe F, de la PM, Vila M, Pérez G, Pierola J, et al. Antioxidant status in patients with sleep apnoea and impact of continuous positive airway pressure treatment. *Eur Respir J*. 2006;27:756–60.
26. Caramori G, Romagnoli M, Casolari P, Bellettato C, Casoni G, Boschetto P, et al. Nuclear localisation of p65 in sputum macrophages but not in sputum neutrophils during COPD exacerbations. *Thorax*. 2003;58:348–51.
27. Drost EM, Skwarski KM, Saulea J, Soler N, Roca J, Agusti A, et al. Oxidative stress and airway inflammation in severe exacerbations of COPD. *Thorax*. 2005 April;60:293–300.
28. Saetta M, Turato G, Maestrelli P, Mapp CE, Fabbri LM. Cellular and structural bases of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;163:1304–9.
29. Gompertz S, Bayley DL, Hill SL, Stockley RA. Relationship between airway inflammation and the frequency of exacerbations in patients with smoking related COPD. *Thorax*. 2001;56:36–41.
30. Wedzicha JA, Seemungal TA. COPD exacerbations: defining their cause and prevention. *Lancet*. 2007;370:786–96.
31. Hurst JR, Perera WR, Wilkinson TM, Donaldson GC, Wedzicha JA. Exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease: pan-airway and systemic inflammatory indices. *Proc Am Thorac Soc*. 2006;3:481–2.
32. Ito K, Ito M, Elliott WM, Cosio B, Caramori G, Kon OM, et al. Decreased histone deacetylase activity in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med*. 2005;352:1967–76.
33. Cosio BG, Tsaprouni L, Ito K, Jazrawi E, Adcock IM, Barnes PJ. Theophylline Restores Histone Deacetylase Activity and Steroid Responses in COPD Macrophages. *J Exp Med*. 2004;200:689–95.
34. Perera WR, Hurst JR, Wilkinson TM, Sapsford RJ, Mullerova H, Donaldson GC, et al. Inflammatory changes, recovery and recurrence at COPD exacerbation. *Eur Respir J*. 2007;29:527–34.
35. Pinto-Plata VM, Livnat G, Girish M, Cabral H, Masdin P, Linacre P, et al. Systemic cytokines, clinical and physiological changes in patients hospitalized for exacerbation of COPD. *Chest*. 2007;131:37–43.