



ESTUDIO DE LÍNEAS CELULARES DE FIBROBLASTOS DE ORIGEN PULMONAR COMO ORIGEN DE LA INFLAMACIÓN EN LA EPOC

E. Márquez-Martín¹, E. Arellano², V. Sánchez López², C. Marín², C. Calero-Acuña¹, F. Ortega Ruiz¹, J.L. López Campos¹.

¹Hospital Universitario Virgen del Rocío. Sevilla. Instituto de Biomedicina de Sevilla. Instituto de Salud Carlos III (CIBER-ES)

²Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBIS)

Estudio financiado por Beca Fundación Neumosur 10/2014.

Resumen: la EPOC se ha asociado a un nivel de inflamación sistémica que condiciona el pronóstico de manera importante. Sin embargo, el origen de la misma es desconocido. El objeto de este trabajo es ver la respuesta a la hipoxia para determinar el origen de la inflamación producida en la EPOC.

Se han empleado líneas celulares humanas de fibroblastos pulmonares, epiteliales bronquiales y hepatocitos sanos. Las células eran incubadas con IL-1 β o hipoxia durante 24 y 48 horas. Se usaron células no tratadas como controles para los experimentos de IL-1 β y células en condiciones de normoxia.

Se observa un aumento de IL8 de forma significativa respecto al grupo control al estimular los fibroblastos con IL-1. No existen diferencias significativas entre las células estimuladas con IL1 y las células expuestas a hipoxia.

Se observa igualmente un incremento de IL-8 en células epiteliales al ser estimuladas con IL-1 con respecto al control. Los hepatocitos estimulados con IL1 o hipoxia no incrementaron la respuesta inflamatoria con respecto a las células control.

Al comparar el incremento de IL-8 producido por las células estimuladas con IL-1 respecto al control observamos que los fibroblastos son los que mayor respuesta inflamatoria producen a las 24 horas, pero después a las 48 horas la respuesta de las epiteliales es más mantenida en el tiempo.

Los resultados de nuestro trabajo orientan a un origen pulmonar de la inflamación como respuesta a la hipoxia, siendo el fibroblasto la célula que parece tener un papel principal en el origen de esta inflamación.

Palabras clave: EPOC, inflamación, líneas celulares.

STUDY OF LUNG FIBROBLAST CELL LINES AS A SOURCE OF INFLAMMATION IN COPD

Abstract: COPD has been associated with systemic inflammation that has an important effect on prognosis. However, the source of this inflammation is unknown. The objective of this study is to look at the response to hypoxia to determine the source of the inflammation produced in COPD.

Healthy human lung fibroblast, bronchial epithelial and hepatocyte cell lines were used. The cells were incubated with IL-1 β or hypoxia for 24 and 48 hours. The controls were untreated cells in the IL-1 β experiments or normoxic cells.

A significant increase in IL-8 was observed with respect to the control group after stimulating fibroblasts with IL-1. There were no significant differences between cells stimulated with IL-1 and cells exposed to hypoxia.

An increase in IL-8 was also observed in epithelial cells after stimulation with IL-1 with respect to the control. Hepatocytes stimulated with IL-1 or hypoxia did not increase inflammatory response with respect to the control cells.

Upon comparing the increase in IL-8 produced by the cells stimulated with IL-1 with respect to the control, we observed that fibroblasts produced the greatest inflammatory response at 24 hours, but at 48 hours, the epithelial cell response was more maintained over time.

The results of our study point to the pulmonary origin of inflammation as a response to hypoxia, with fibroblasts being the cell that seems to play a major role in the source of this inflammation.

Keywords: COPD, inflammation, cell lines.

Recibido: 27.02.2020. Aceptado 06.04.2020

Dr. Márquez-Martín

eduardomarquezmartin@gmail.com

INTRODUCCIÓN

La EPOC ha dejado de ser considerada una enfermedad limitada al pulmón para ser vista hoy día como una enfermedad sistémica con afectación de múltiples órganos y sistemas. Estos efectos sistémicos incluyen la inflamación sistémica, las alteraciones nutricionales y el bajo peso, así como la disfunción de los músculos esqueléticos.

Los mecanismos implicados en la perpetuación de la respuesta inflamatoria en los pulmones en pacientes que desarrollan EPOC, incluso después de dejar de fumar, no han sido establecidos en su totalidad y son esenciales para que podamos comprender los mecanismos patogénicos de la EPOC, pudiendo ser importante para el desarrollo de nuevas terapias. Se encuentra relación entre las enfermedades inflamatorias crónicas y el envejecimiento, y los procesos implicados en el envejecimiento pueden proporcionar un nuevo mecanismo en la patogenia de la EPOC. El origen de este mecanismo es desconocido, aunque distintos estudios apuntan a una posible carga genética en su inicio.

Esta situación está asociada no sólo a una respuesta inflamatoria anormal en el pulmón, sino también a una sistémica, que se manifiesta por un incremento en células y metabolitos inflamatorios en la circulación, como la proteína C reactiva (PCR), IL-6, IL-8 y TNF- α , entre otros. Estos marcadores están muy aumentados en los pacientes EPOC frente a sujetos fumadores y no fumadores. Además, el aumento de estas sustancias está relacionado con una mayor intensidad de los síntomas y peor calidad de vida.

Identificar el origen de esta inflamación sistémica sería un avance importante, ya que permitiría identificar dianas terapéuticas para evitar que la enfermedad progrese hacia otros órganos, evitando la aparición de una comorbilidad que tiene un importante impacto pronóstico. En este sentido, la hipótesis más extendida es que sería la inflamación generada en el pulmón, la que produciría un rebosamiento (denominado en la literatura como *spill-over*) de mediadores inflamatorios hacia el torrente sanguíneo, siendo el pulmón el origen de esta inflamación. Esta hipótesis no ha podido ser corroborada completamente. Aunque las proteínas originadas en el pulmón pueden ejercer efectos sistémicos, hay una falta de correlación entre las concentraciones de citoquinas de la vía aérea y las que se detectan en la circulación. Así, investigadores previos no han podido encontrar una asociación entre la carga inflamatoria del esputo inducido y la presente en el plasma.

El objeto de este trabajo es ver la respuesta a la hipoxia en cultivos celulares de células pulmonares y hepáticas para determinar el origen de la inflamación producida en enfermedades como la EPOC.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cultivos celulares: para la determinación de este trabajo se han empleado líneas celulares humanas de fibroblastos pulmonares (MRC-5) obtenidas de la ECACC (Salisbury, UK), epiteliales bronquiales (Nuli-1) y hepatocitos sanos (THLE-2) obtenidas de la ATCC (Rockville, MD, USA) Las células eran mantenidas en suspensión según las especificaciones del fabricante.

Estimulación de las células: las células eran crecidas hasta el 80% de confluencia, lavadas e incubadas con medio sin suero durante 24 horas; luego eran incubadas con 10 ng/mL IL-1 β (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) o hipoxia (1% O₂) durante 24 y 48 horas. Las concentraciones de IL-1 β se eligieron mediante un estudio de dosis respuesta. Se usaron células no tratadas como controles para los experimentos de IL-1 β y células en condiciones de normoxia (5% de O₂) Los experimentos fueron repetidos 5 veces.

Niveles de IL-8: se recogieron los sobrenadantes de los medios de las células estimuladas con IL-1, hipoxia y de los controles; se centrifugaron a 2.750g durante 5 minutos y luego se guardaron a -80°C hasta futuras determinaciones. Nosotros medimos los niveles de IL8 mediante ELISA (Quantikine®, R&D Systems) según las instrucciones del fabricante.

Análisis estadístico: para el análisis estadístico descriptivo se utilizaron la mediana y error estándar para variables continuas. Los niveles de interleucinas fueron analizados mediante el test de U- Mann Whitney. Todas las hipótesis se realizaron con un nivel de significancia de 5% (2 colas), usando el software de análisis estadístico, IBM SPSS, versión 20.0 (IBM Corporation, Armonk, NY, USA)

RESULTADOS

Estimulación de los fibroblastos con IL-1 e hipoxia: la línea celular de fibroblastos humanos (figura 1) se estimuló con IL-1 e hipoxia durante 24 y 48 horas. Posteriormente medimos los niveles de IL-8 en los sobrenadantes en las células, obteniendo como resultado un incremento significativo en los niveles de esta citoquina a ambos tiempos ($p = 0,016$ a las 24 horas y $p = 0,029$ a las 48 horas) en las células estimuladas con IL-1 comparadas con las células control (células no estimuladas) (figura

1) Los fibroblastos expuestos a condiciones de hipoxia incrementaron los niveles de IL-8 a las 48 horas comparados con las células expuestas a normoxia, pero este incremento no fue significativo ($p = 0,057$)

No encontramos diferencias significativas entre las células estimuladas con IL-1 o con hipoxia. Los fibroblastos estimulados con IL-1 tienen una respuesta mantenida en el tiempo (durante las 48 horas) mientras que cuando son expuestos a hipoxia, el incremento de IL-8 se produce a las 48 horas.

Estimulación de células epiteliales con IL-1 e hipoxia: las células epiteliales estimuladas con IL-1 aumentaron los niveles de IL-8 a las 24 y 48 horas con respecto al control ($p = 0,029$) (figura 2) Cuando fueron estimuladas con hipoxia hay un pequeño incremento de los niveles de IL-8 a las 48 horas cuando se comparan con las células expuestas a normoxia, pero estos cambios no son significativos ($p = 0,057$)

Las células epiteliales tienen mayor respuesta inflamatoria cuando son estimuladas con IL-1 que en condiciones de hipoxia.

Estimulación de hepatocitos con IL-1 e hipoxia: los hepatocitos estimulados con IL-1 o hipoxia no incrementaron la respuesta inflamatoria con respecto a las células control (sin estimular) (figura 3)

Comparación de fibroblastos pulmonares, epiteliales bronquiales y hepatocitos estimulados con IL-1 e hipoxia: comparamos el incremento de IL-8 producido por las células estimuladas con IL-1 durante 24 y 48 horas con respecto a las células sin estimular (figura 4) y observamos que los fibroblastos pulmonares y las células epiteliales producen mayor respuesta inflamatoria que los hepatocitos. Los fibroblastos son los que tienen mayor incremento de IL-8 a las 24 horas, pero después a las 48 horas la respuesta de las epiteliales es más mantenida en el tiempo.

Las únicas células que producen un incremento cuando son expuestas a condiciones de hipoxia durante 48 horas con respecto a las células en normoxia son los fibroblastos (figura 5)

Figura 1

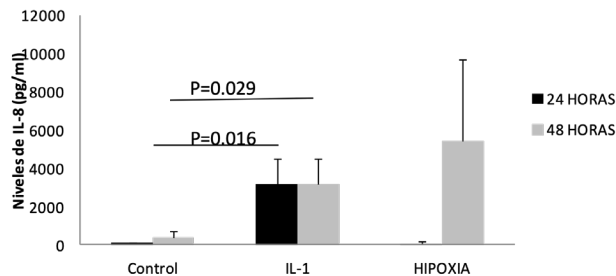


Figura 2

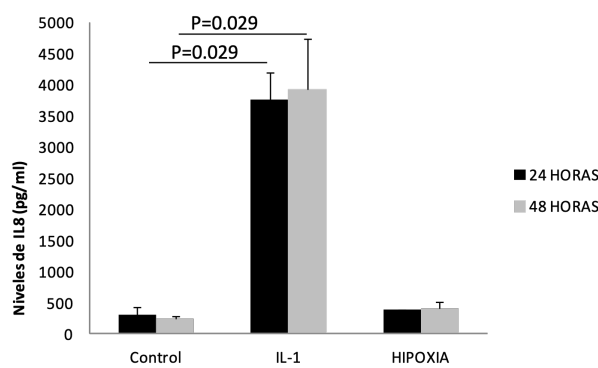


Figura 3

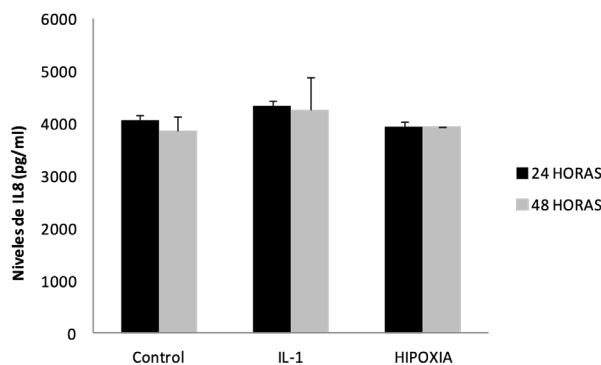


Figura 4

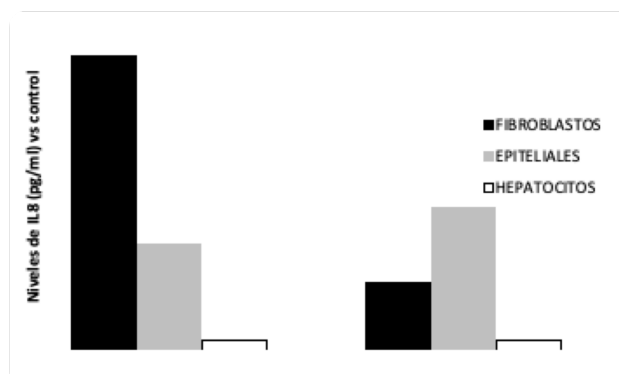
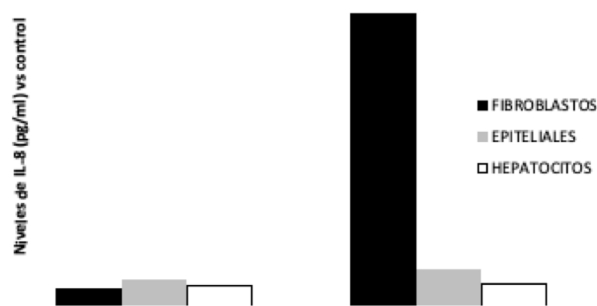


Figura 5



DISCUSIÓN

Los resultados de nuestro trabajo orientan a un origen pulmonar de la inflamación como respuesta a la hipoxia, siendo el fibroblasto la célula que parece tener un papel principal en el origen de esta inflamación, con mayor sensibilidad a la hipoxia, aunque la célula epitelial mantiene durante más tiempo esta respuesta inflamatoria.

Los mecanismos inflamatorios en la EPOC a nivel de la mucosa bronquial se ha investigado en estudios realizados sobre muestras de esputo, biopsias de pared bronquial, lavado broncoalveolar y muestras de tejidos pulmonares resecaados, que muestran, de forma uniforme, un aumento del número de células inflamatorias, donde ejercen papel principal los macrófagos, los neutrófilos y los linfocitos T con una preponderancia del subtipo CD8, .

Además, conocemos los efectos que tiene la EPOC a nivel sistémico, si bien no hay una definición precisa de la inflamación sistémica en la EPOC. Su reconocimiento se ha basado en estudios que han demostrado un aumento de la concentración plasmática de diversos marcadores

inflamatorios (TNF- α , IL-6, IL-8, proteína C reactiva [PCR], fibrinógeno y leucocitos) en los pacientes con EPOC estable comparados con los de una población normal. Sin embargo, cuando se realiza un análisis individualizado, se observa que un porcentaje importante (40 - 50 %) de los pacientes no presenta un aumento de estos biomarcadores.

La correlación entre las concentraciones de citoquinas de la vía aérea y las que se detectan en la circulación no han sido aún correlacionadas. Así, investigadores previos no han podido encontrar una asociación entre la carga inflamatoria del esputo inducido y la presente en el plasma.

En este sentido, nuestro grupo ha avanzado en el estudio de esta última cuestión en los últimos años. De todos los mediadores descritos en la EPOC, seleccionamos el reactante de fase aguda mayor proteína C-reativa (PCR) por ser el más estudiado y sobre el que se han descrito el mayor número de efectos sistémicos asociados. Incluimos también en nuestros estudios al amiloide A sérico (AAS), por ser el otro reactante de fase aguda mayor en el ser humano que comparte estímulos de secreción con la PCR. Ambos mediadores son sintetizados por el hígado y se elevan en respuesta a las mismas citoquinas, principalmente interleucina (IL)-6, IL-1 y factor de necrosis tumoral α . Debido a esta conexión entre ambos biomarcadores, se hace necesario su estudio conjunto para verificar que los efectos atribuidos a una molécula no son consecuencia de la actuación de la otra.

Durante nuestros estudios sobre el origen de la inflamación sistémica, en un primer proyecto piloto, observamos que el hígado no es el único responsable de la síntesis de PCR y AAS, sino que el pulmón también es capaz de realizar esta síntesis. Además, observamos que esta síntesis está aumentada en los pacientes con EPOC frente a fumadores sin la enfermedad y que existe una diferente expresión según la localización anatómica entre bronquio y parénquima. Según nuestros resultados, el parénquima es responsable de manera más importante de su síntesis¹⁵.

Posteriormente, nos planteamos reproducir estos hallazgos en una muestra más amplia y avanzar en la caracterización de los tipos celulares que eran responsables de esta síntesis, constatando no sólo que el tejido pulmonar es capaz de sintetizar estos mediadores, sino evaluando qué tipo celular es responsable de la producción de dichos marcadores inflamatorios al estudiar de forma aislada los distintos tipos celulares que componen el pulmón: fibroblastos, macrófagos, células epiteliales y células dendríticas. Esto nos ha permitido entender

el patrón de síntesis de marcadores inflamatorios en diversos tipos celulares del aparato respiratorio mostrando que todos los tipos celulares son capaces de sintetizar ambos mediadores, con un predominio de las células epiteliales¹⁶. Este dato es importante ya que la producción de marcadores de reactantes de fase aguda había sido atribuida al hígado como principal órgano de respuesta ante un daño externo. Sin embargo, según nuestros datos, el pulmón es también capaz de activar la síntesis de dichas moléculas en pacientes con EPOC. Con los resultados del presente trabajo podemos refrendar esta hipótesis, al aumentar la producción de IL-8b, tanto las células epiteliales como los fibroblastos, pero no los hepatocitos.

Los resultados de este trabajo corroboran los datos alcanzados en trabajos anteriores, mostrando cómo son las células pulmonares las que parecen tener el principal papel en el origen de la inflamación y siendo especialmente los fibroblastos de la mucosa bronquial los que reaccionan de forma especial al estímulo hipóxico.

El papel del fibroblasto como respuesta a la hipoxia ha sido estudiado, demostrándose los mecanismos moleculares que inducen su proliferación mediada por la hipoxia, estando implicados los factores inducidos por la hipoxia (HIF)¹⁷

Igualmente, las células epiteliales bronquiales se han considerado un controlador esencial de las respuestas inflamatorias, inmunes y regenerativas a los alérgenos, virus y contaminantes ambientales, que contribuyen a la patogénesis de enfermedades como el asma o la EPOC. Las células epiteliales expresan receptores de reconocimiento de patrones que detectan estímulos ambientales y secretan señales de peligro endógenas, que activan las células dendríticas y unen inmunidad innata y adaptativa. La inflamación epitelial domina la fisiopatología en estas enfermedades¹⁸.

Los trabajos antes referenciados mostraban una síntesis compartida de varios tipos celulares, lo que sugiere una escasa especificidad que podría estar en relación con factores como la poca especificidad de los mediadores estudiados; la no inclusión de células endoteliales vasculares en el estudio; la no experimentación con inductores de la síntesis o no disponer de una comparación de la producción pulmonar con la producción hepática.

En este planteamiento nos quedaba por evaluar la posibilidad de que fuera debido a la falta de inclusión de células endovasculares y sanguíneas, ya que IL-1 es un marcador inflamatorio que se libera por el endotelio ante un estímulo hipóxico,

si bien ya habíamos demostrado que la principal captación por inmunohistoquímica se encuentra en la pared vascular de los vasos pulmonares¹⁹. La posibilidad de que, aunque exista producción de biomarcadores inflamatorios en los vasos, estos no se correlacionen con la concentración sérica de los mismos hace que hayamos planteado la posibilidad de analizar directamente la fuente principal de biomarcadores sistémicos, el hígado, y relacionarlo con la expresión en células sanguíneas con objeto de evaluar si la síntesis de estos biomarcadores está alterada en pacientes con EPOC frente a fumadores o exfumadores sin la enfermedad. Los resultados de este trabajo apoyan esta teoría.

Por tanto, con los resultados de este trabajo podemos concluir que estudiando cultivos celulares de células pulmonares y hepáticas sometidas a estímulos inflamatorios y de hipoxia, parece que la inflamación como respuesta a la hipoxia tiene un origen pulmonar, siendo el fibroblasto la célula que parece tener un papel principal en el origen de esta inflamación, con mayor sensibilidad a la hipoxia, aunque la célula epitelial mantiene durante más tiempo esta respuesta inflamatoria.

BIBLIOGRAFÍA

1. Peces-Barba G, Barberá JA, Agusti A et al. Guía de práctica clínica de diagnóstico y tratamiento de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica. Normativa SEPAR-ALAT. Arch Bronconeumol. 2008; 44: 271-81.
2. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease (2019 report) 2019 [accessed 2019 Aug 12]. Available from: <https://goldcopd.org/wp-content/uploads/2018/11/GOLD-2019-v1.7-FINAL-14Nov2018-WMS.pdf>.
3. Barnes PJ, Shapiro SD, Pauwels RA. Chronic obstructive pulmonary disease: molecular and cellular mechanisms. Eur Respir J 2003; 22(4): 672-88.
4. Sunyer J, Pistelli R, Plana E et al. Systemic inflammation, genetic susceptibility and lung function. Eur Respir J 2008; 32(1): 92-7.
5. Sode BF, Dahl M, Nordestgaard BG. Myocardial infarction and other co-morbidities in patients

- with chronic obstructive pulmonary disease: a Danish nationwide study of 7.4 million individuals. *Eur Heart J*. 2011; 32(19): 2.365-75.
6. Sinden NJ, Stockley RA. Systemic inflammation and comorbidity in COPD: a result of 'overspill' of inflammatory mediators from the lungs? Review of the evidence. *Thorax*. 2010; 65(10): 930-6.
 7. Vernooy JH, Kucukaycan M, Jacobs JA et al. 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*. 2002; 166: 1.218-1.224.
 8. Hogg JC. Pathophysiology of airflow limitation in chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet*. 2004; 364: 709-21.
 9. Hogg JC, Chu F, Utokaparch B et al. The natures of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *New Engl J Med*. 2004; 350: 2.645-53.
 10. Gan WQ, Man SF, Senthilselvan A et al. Association between chronic obstructive pulmonary disease and systemic inflammation: a systematic review and a meta-analysis. *Thorax*. 2004; 59: 574-80.
 11. Agustí A. EPOC e inflamación sistémica. Una vía de enlace para la comorbilidad. *Arch Bronconeumol*. 2009; 45: 14-7.
 12. [Núñez B](#), [Sauleda J](#), [García-Aymerich J](#) et al. Ausencia de correlación entre marcadores de inflamación pulmonar y sistémica en pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica: un análisis bi-compartimental simultáneo. *Archivos de Bronconeumología* 2016; 52(7): 361-367.
 13. Kaptoge S, Di Angelantonio E et al. Emerging Risk Factors Collaboration, C-reactive protein concentration and risk of coronary heart disease, stroke, and mortality: an individual participant meta-analysis. *Lancet* 2010; 375(9.709): 132-40.
 14. Steel DM, Whitehead AS. The major acute phase reactants: C-reactive protein, serum amyloid P component and serum amyloid A protein. *Immunol Today* 1994; 15(2): 81-8.
 15. Rojano B, Arellano E, López Porras M et al. Expresión local de reactantes de fase aguda en la enfermedad pulmonar obstructiva crónica. *Rev Esp Patol Torac* 2010; 22(4): 252-258.
 16. Calero C, Arellano E, Lopez-Villalobos JL et al. Differential expression of C-Reactive protein and Serum amyloid A in different cell types in the lung tissue of chronic obstructive pulmonary disease patients. *BMC Pulmonary Medicine* 2014 14:95.
 17. Senavirathna LK, Huang C, Yang X et al. Hypoxia induces pulmonary fibroblast proliferation through NFAT signaling. *Sci Rep*. 2018; 8(1): 2.709.
 18. Li CL, Xu ZB, Fan XL et al. MicroRNA-21 Mediates the Protective Effects of Mesenchymal Stem Cells Derived from iPSCs to Human Bronchial Epithelial Cell Injury Under Hypoxia. *Cell Transplant*. 2018; 27(3): 571–583.
 19. López-Campos JL, Calero C, Rojano B et al. C-reactive protein and serum amyloid a overexpression in lung tissues of chronic obstructive pulmonary disease patients: a case-control study. *Int J Med Sci*. 2013 Jun 8; 10(8): 938-47.