

## COMPARACIÓN DE LA PRODUCCIÓN LOCAL Y SISTÉMICA DE MEDIADORES INFLAMATORIOS EN DISTINTOS GRUPOS CELULARES DE PACIENTES CON ENFERMEDAD PULMONAR OBSTRUCTIVA CRÓNICA

C. López Ramírez, J.L. López-Campos Bodineau.

Unidad Médico-Quirúrgica de Enfermedades Respiratorias. Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS). Hospital Universitario Virgen del Rocío/Universidad de Sevilla.

CIBER de Enfermedades Respiratorias (CIBERES). Instituto de Salud Carlos III, Madrid.

Premio Dr. Antona para la mejor Tesis Doctoral leída y aprobada en el año 2021 por un miembro de Neumosur.

**Palabras clave:** Enfermedad pulmonar obstructiva crónica, inflamación sistémica, Proteína C reactiva, Amiloide A sérico.

COMPARISON OF LOCAL AND SYSTEMIC PRODUCTION OF INFLAMMATORY MEDIATORS IN DIFFERENT CELL GROUPS OF PATIENTS WITH CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE

**Keywords:** Chronic obstructive pulmonary disease, systemic inflammation, C-reactive protein, serum amyloid A.

### INTRODUCCIÓN

La enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) es una enfermedad multidimensional, inflamatoria y progresiva que afecta no sólo a las vías respiratorias y los pulmones, sino también a la circulación pulmonar, a la musculatura respiratoria y a diversos órganos extrapulmonares. La afectación extrapulmonar resulta un aspecto esencial para evaluar el impacto global de la enfermedad en el individuo y entre ellos, los denominados efectos sistémicos de la EPOC son de descripción relativamente reciente<sup>1</sup>. Aunque en la actualidad es imposible determinar si se trata de una mera asociación de circunstancias o si la EPOC es per se la responsable de la afectación sistémica de muchos pacientes, lo bien cierto es que las guías de actuación clínica no se limitan exclusivamente al aspecto pulmonar de la EPOC.

La inflamación sistémica en la EPOC se define como un aumento de los niveles de marcadores inflamatorios de diferentes vías biológicas<sup>2</sup>. Dentro de estos biomarcadores inflamatorios sistémicos, destacan los RFA por ser unos de los más estudiados debido a su papel como nexo de fisiológico entre la respuesta inflamatoria local y sistémica<sup>3</sup>. Entre los RFA mayores se encuentran la proteína C reactiva (PCR) y el amiloide A sérico (AAS). Ambos reactantes tienen un papel relevante en la reacción aguda del ser humano ante diversas agresiones externas y curiosamente comparten estímulos secretores, con un patrón de aumento similar en el suero<sup>4</sup>. 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.

No obstante, la implicación final de los RFA en la patogenia de las manifestaciones sistémicas de la EPOC no ha sido completamente dilucidado, planteándose cuestiones no resueltas sobre su secreción, perpetuación en el tiempo e influencia final en un determinado efecto de la enfermedad en órganos diana distintos del pulmón.

El presente estudio se enmarca en el estudio de la EPOC como enfermedad con repercusión sistémica. Nuestra hipótesis sugiere que existe producción local de RFA en el tejido pulmonar y sistémica en sangre periférica de pacientes con EPOC frente a fumadores sanos, que indica una síntesis más elevada a nivel pulmonar, incluso comparándola con la síntesis fisiológica a nivel hepático. El objetivo de nuestro trabajo es comparar la expresión génica de RFA tanto a nivel local, en el parénquima pulmonar y tejido vascular de arteria pulmonar, como a nivel sistémico, en células sanguíneas y plasma, de pacientes con EPOC y fumadores sin la enfermedad. Posteriormente comparamos la síntesis de estos mediadores inflamatorios en células pulmonares con respecto a nivel hepático, principal síntesis en humanos, con objeto de determinar la contribución de cada uno a la inflamación sistémica.

Recibido: 15.09.2021 Aceptado: 16.03.2022

Dra. Cecilia López Ramírez.  
[ceclopam@gmail.com](mailto:ceclopam@gmail.com)

## MATERIAL Y MÉTODOS

**Objetivo 1:** expresión génica tisular y correlación con expresión proteica en suero.

Se diseñó un estudio analítico observacional de caso-control, en el que se compararon los niveles de expresión génica de PCR y AAS en muestras quirúrgicas de parénquima pulmonar, tejido vascular de arteria pulmonar y sangre periférica de pacientes con EPOC en fase estable frente a fumadores sin la enfermedad.

Todos los sujetos incluidos en el estudio eran pacientes que se encontraban en lista de espera para cirugía de resección pulmonar por sospecha de neoplasia pulmonar primaria e ingresaron de forma programada en la planta de la Unidad Médico-Quirúrgica de Enfermedades Respiratorias del Hospital Universitario Virgen del Rocío para la realización de la técnica quirúrgica prevista. Para su inclusión, los sujetos debían ser mayores de 40 años, estar clínicamente estables en los 2 meses previos a la intervención, valorando para ello la asistencia a servicios de urgencia, visita no programada al médico u hospitalización por descompensación respiratoria, según refiriera el paciente o constara en su historia clínica y el diagnóstico de EPOC se realizó en función de la normativa GOLD 2016, exigiéndose un consumo acumulado de tabaco >10 paq-año y teniendo una espirometría con una obstrucción crónica al flujo aéreo, realizada en fase estable.

Se excluyeron aquellos pacientes con historia de infecciones respiratorias agudas en los dos meses anteriores, una neoplasia diagnosticada previamente, haber recibido tratamiento con radioterapia y/o quimioterapia o la presencia de enfermedades crónicas o enfermedades inflamatorias, que pudiera estar asociada a una alteración de la expresión de RFA, como son la inmunosupresión, la aparición de algún evento isquémico agudo de cualquier naturaleza en los seis meses previos, insuficiencia cardíaca congestiva, padecer insuficiencia renal terminal, cirrosis hepática o artritis reumatoide entre otras.

El día de la intervención quirúrgica y previamente a ésta, a todos los pacientes, se realizó una analítica para la determinación de RFA mayores en sangre periférica. La cantidad de tiempo transcurrido entre la abertura de la capa cutánea y la extracción de la muestra anatómica se midió en todos los participantes, excluyendo los casos con un tiempo de > 2h debido al potencial incremento en los marcadores inflamatorios relacionada con la cirugía. Se seleccionó una porción de parénquima pulmonar, macroscópicamente normal y que estuviera lo más alejada posible de la lesión que había motivado la intervención,

de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> de superficie y 0,5 cm de espesor, así como de la arteria pulmonar reseca.

Para realizar los análisis de expresión génica para PCR y los 3 tipos de AAS humanos (AAS1, AAS2 y AAS4), tanto en los tejidos como en los leucocitos de sangre periférica se empleó una reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa cuantitativa (RT-qPCR), un método que consta de tres pasos: la extracción de ARN, transcripción inversa a ADN complementario (ADNc) y amplificación génica del fragmento de ADNc. Las determinaciones de PCR y AAS en plasma se realizaron mediante ELISA siguiendo las instrucciones del fabricante.

**Objetivo 2:** estudios en modelos celulares: RFA en células respiratorias y comparación con hepatocitos.

Para los estudios realizados "in vitro" se han empleado células epiteliales bronquiales (Nuli-1) y fibroblastos pulmonares humanos (MRC-5) procedentes de una línea comercial obtenidos de pacientes con EPOC (Lonza, Walkerville, MD) y hepatocitos humanos (CCRL 2706 y HEP3B) procedentes de líneas comerciales de la American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD). Las células se cultivaron en placas de 10 cm<sup>2</sup> de diámetro (Nunc, Dinamarca) manteniéndose en el medio de crecimiento adecuado a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> y saturación de humedad, durante un máximo de 48 horas para las condiciones a estudiar.

Tras un estudio de dosis respuesta, se eligió la dosis de 10ng/ml IL-1 como estímulo pro-inflamatorio. Las células se cultivaron durante 24 y 48 horas a esa concentración de IL-1. Cada experimento se repitió cuatro veces. En paralelo se recogieron muestras controles de cultivo sin tratar pero con el mismo tipo de medio de cultivo y durante el mismo periodo de incubación. En cada uno de los puntos, se midió la viabilidad con trypan-blue celular por el método de exclusión por Trypan-blue 0,4% (Sigma, GmbH, Alemania) y se contaron en una cámara hemocitómetro. Posteriormente, las células se centrifugaron a 1.000 rpm durante 5 minutos, alicuotamos el sobrenadante y se guardó a -80°C para determinar posteriormente proteínas mediante ELISA. El pellet se congeló en nitrógeno líquido y después se guardó a -80°C para posteriores determinaciones. De nuevo para los análisis de expresión génica se empleó RT-qPCR.

## ASPECTOS ÉTICOS

El protocolo de estudio fue aprobado por el Comité de Revisión Institucional del Hospital Virgen del Rocío, Sevilla, España (CEI código 2013/023), observándose las normas de la Declaración de Helsinki para estudios con seres humanos y se obtuvo consentimiento informado por escrito de cada participante previo a la inclusión en el estudio. Los registros clínicos se anonimizaron en la base de datos asignando un código numérico a través de un algoritmo. No se ingresó información personal que pudiera usarse directa o indirectamente para identificar a una persona.

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se realizó con el programa SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences, IBM Corporation, Somers, NY, EE.UU*) versión 24.0. Los estadísticos descriptivos usados para las variables continuas fueron la media y la desviación estándar y frecuencias y porcentajes para las variables categóricas. Los estudios inferenciales se realizan con tests paramétricos, salvo que alguna de las variables incluidas en el análisis demuestre no seguir una distribución normal. En el estudio de la expresión de RFA, tanto a nivel de tejido como a nivel celular, entre pacientes EPOC y fumadores sanos se utilizó la prueba t de Student para datos independientes (test de Mann-Whitney en caso de no paramétrico), previa verificación de la igualdad de las varianzas con el test de Levene. Los datos categóricos se compararon con la prueba de  $\chi^2$ . Los valores de expresión génica relativa se evaluaron con el método 2- $\Delta\Delta C_t$ . En la estadística comparativa se aplicó el test de Wilcoxon para comparar los valores de expresión génica de acuerdo a la ubicación anatómica. Los datos categóricos se compararon con la prueba de  $\chi^2$ . Las asociaciones entre la expresión génica del tejido y los niveles plasmáticos de biomarcadores inflamatorios se analizaron con el coeficiente de correlación de Spearman. Se acepta un error alfa de 0,05.

## RESULTADOS

**Objetivo 1:** expresión génica tisular y correlación con expresión proteica en suero.

La muestra estaba compuesta de 102 sujetos, de los cuales 40 (39,2%) pacientes cumplían los criterios diagnósticos de EPOC y 62 eran fumadores sin la enfermedad. Las principales características de los participantes del estudio se resumen en la **Tabla 1**. La mayoría de los pacientes fueron varones, tanto en el grupo de casos (37 varones; 92,5%) como en el grupo control (48 varones; 77,4%).

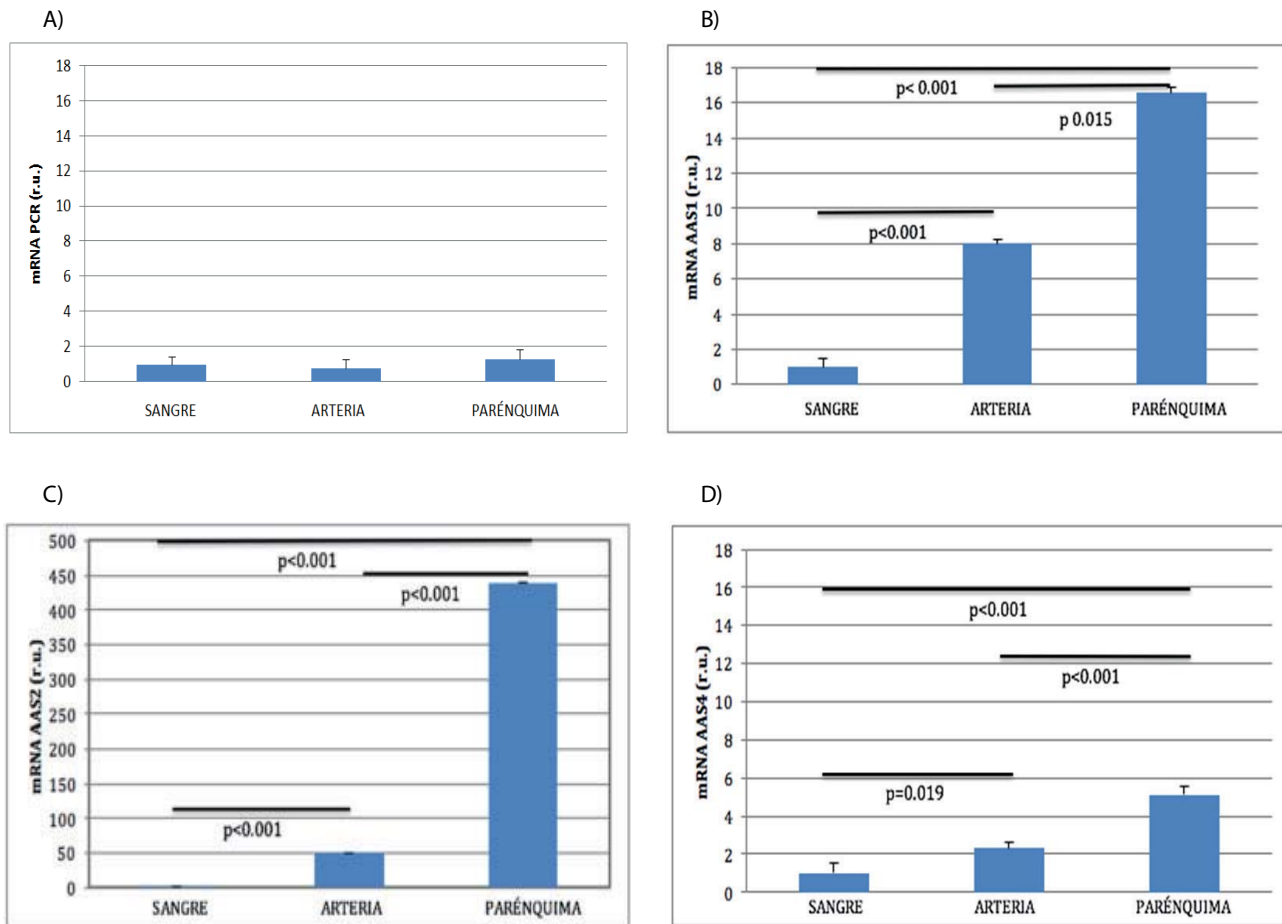
**Tabla 1.** Características generales de la población de estudio.

	Controles (n=62)	Pacientes con EPOC (n=40)	Valor p*
Hombres (n)	48 (77,4%)	37 (92,5%)	0,046
Edad (años)	64,4 ± 13,5	67,4 ± 8,01	NS
Tabaquismo activo	17 (27,4%)	13 (32,5%)	NS
Consumo acumulado (paq-año)	43,5 ± 34,7	69,7 ± 33,1	0,001
Índice Charlson-edad	4,9 ± 2,2	5,7 ± 1,7	NS
FVC (%)	98,7 ± 20,45	91,6 ± 19	NS
FEV <sub>1</sub> (%)	94,0 ± 19,89	69,0 ± 18,4	< 0,001
FEV <sub>1</sub> /FVC (%)	77,1 ± 6,9	59,0 ± 9,7	< 0,001

Predominaban los pacientes exfumadores en ambos grupos, a excepción de 17 fumadores activos en el grupo control (27,4%) y 13 fumadores activos en el grupo de pacientes EPOC (32,5%). Ningún paciente fumó el día previo a la intervención. Hubo diferencia estadísticamente significativa entre el consumo acumulado en paquetes-año entre ambos grupos, siendo 69,7 en los casos frente a 43,5 en los controles. En cuanto a las comorbilidades los pacientes con EPOC demostraron tener un índice de Charlson mayor, pero sin alcanzar esta diferencia la significación estadística. La distribución de pacientes por estadios GOLD era: 11 (27,5%) pacientes en estadio GOLD I, 24 (60%) en estadio GOLD II, 5 (12,5%) en estadio GOLD III y ningún paciente en estadio GOLD IV.

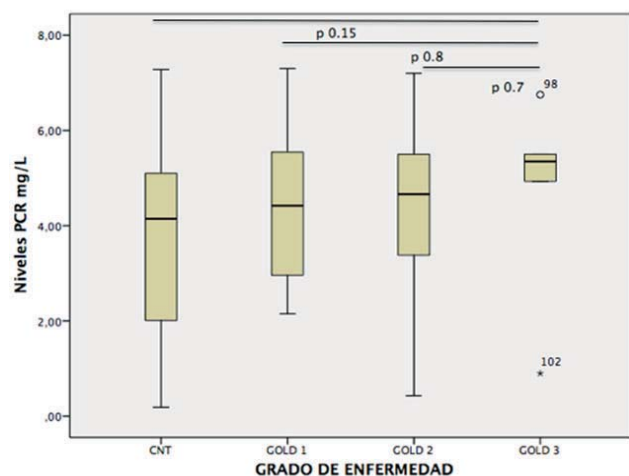
Al analizar la expresión génica de PCR y AAS en el parénquima pulmonar, tejido vascular de arteria pulmonar y leucocitos de sangre periférica, observamos que los tres tipos de muestras expresaban ambos biomarcadores. Se constata que el parénquima pulmonar es la principal fuente de RFA en pacientes con EPOC en comparación con arteria pulmonar y la circulación periférica (**Figura 1**). La expresión de AAS fue significativamente mayor en el parénquima pulmonar que en la arteria pulmonar (100% más alto para AAS1 y AAS4,  $p = 0,015$  y  $p < 0,001$ , respectivamente; 8 veces mayor para AAS2,  $p < 0,001$ ) y leucocitos de sangre periférica (16 veces más altos para AAS1, 439 veces mayor para AAS2, y 5 veces mayor para AAS4;  $p < 0,001$ ). En comparación con los leucocitos de sangre periférica, la expresión de AAS fue significativamente mayor en la arteria pulmonar (8 veces mayor para AAS1,  $p < 0,001$ ; 50 veces más altos para AAS2,  $p < 0,001$ ; y 2,3 veces más alta para AAS4,  $p = 0,019$ ) (**Figuras 1B,C,D**). Sin embargo, no se observaron diferencias en la expresión de la PCR entre el parénquima pulmonar, la arteria pulmonar y leucocitos de sangre periférica (**Figura 1A**).

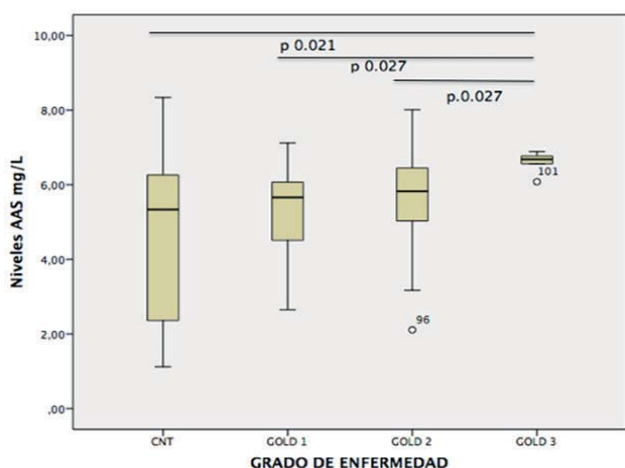
**Figura 1:** Comparación de los niveles de expresión génica de distintos RFA , PCR (A) y subtipos de AAS (B,C,D) en diferentes tejidos (células de la sangre, arteria pulmonar y parénquima pulmonar) de los pacientes con EPOC.



Con respecto a los niveles plasmáticos, los pacientes con EPOC tenían una carga inflamatoria periférica más alta en comparación con los fumadores sanos (Figura 2). Se identificó una asociación positiva significativa entre los niveles de PCR en plasma y los niveles de AAS ( $r = 0,617$ ,  $p < 0,001$ ). Sin embargo, no hubo correlación significativa entre los niveles plasmáticos de PCR y su expresión génica en el parénquima pulmonar ( $r = -0,127$ ,  $p < 0,4$ ), la arteria pulmonar ( $r = -0,049$ ,  $p < 0,7$ ) y leucocitos de sangre periférica ( $r = -0,271$ ,  $p < 0,09$ ). Tampoco hubo correlación significativa entre los niveles plasmáticos de AAS y su expresión génica en el parénquima pulmonar ( $r = -0,207$ ,  $p < 0,56$ ), arteria pulmonar ( $r = -0,037$ ,  $p < 0,054$ ) y leucocitos en sangre periférica ( $r = -0,117$ ,  $p < 0,29$ ).

**Figura 2:** Concentraciones plasmáticas de PCR y AAS en los fumadores sanos (controles, CNT) y los pacientes con diferentes estadios de la EPOC.





Abreviaturas: PCR: Proteína C reactiva; AAS: Amiloide A sérico

**Objetivo 2.** Estudios en modelos celulares: RFA en células respiratorias y comparación con hepatocitos.

Tras 24 y 48 horas de incubación en medio de cultivo con IL-1 podemos observar como las células epiteliales, fibroblastos pulmonares y hepatocitos humanos responden al estímulo de esta citoquina proinflamatoria, sintetizando ambos RFA implicados en la inflamación sistémica de la EPOC (AAS y PCR) (tabla 2).

Si nos centramos a nivel pulmonar, al comparar la expresión génica de los diferentes subtipos de AAS, destaca a nivel de fibroblastos la mayor expresión de AAS2 frente a células epiteliales y de forma significativa frente al resto de marcadores (p = 0,029). Esta diferencia es a favor de fibroblastos para los tres tipos de AAS y su determinación a las 24 horas (p = 0,029 para AAS1; p = 0,029 para AAS4), lo cual podría dar un mayor protagonismo al papel de los fibroblastos en la respuesta inflamatoria.

**Tabla 2:** Expresión génica de AAS y PCR de células epiteliales, fibroblastos y hepatocitos frente a controles

		Hepatocitos (CRL2706)		Hepatocitos (HEP3B)		Epiteliales (Nuli-1)		Fibroblastos (MRC-5)	
		24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h
PCR	Control	1 (0)	1 (0)	1 (0)	1 (0)	1 (0)	1 (0)	1 (0)	1 (0)
	IL-1	0,61 (0,67)	5,6 (2,43)	1,42 (0,70)	6,87 (5,43)	3,91 (0,18)	5,55 (0,95)	32,02 (44,58)	1 (0,56)
AAS1	Control	1 (0)	1 (0)	1 (0)	1 (0)	1 (0)	1 (0)	1 (0)	1 (0)
	IL-1	1,54 (0,1)	2,12 (1,1)	1438,94 (612,7)	1578,19 (1004,8)	2,87 (0,75)	4,67 (0,43)	83,61 (33,9)	45,91 (9,2)
AAS2	Control	1 (0)	1 (0)	1 (0)	1 (0)	1 (0)	1 (0)	1 (0)	1 (0)
	IL-1	0,94 (1,1)	0,83 (0,5)	1366,25 (366,0)	1986,69 (1235,4)	6,52 (6,9)	14,8 (8,2)	199,73 (42,4)	305,36 (183,1)
AAS4	Control	1 (0)	1 (0)	1 (0)	1 (0)	1 (0)	1 (0)	1 (0)	1 (0)
	IL-1	1,58 (0,5)	4,82 (1,1)	2,35 (1,8)	3,08 (1,5)	1,84 (1,2)	8,02 (4,4)	163,25 (0,5)	4,23 (1,9)

A nivel hepático, destaca la mayor expresión génica para PCR y todos los subtipos de AAS en hepatocitos de hepatocarcinoma (HEP3B) frente a hepatocitos sanos (CRL2706), siendo significativo (p = 0,05) en el caso de AAS1 y AAS2.

Quando comparamos la expresión génica a nivel pulmonar con la síntesis fisiológica a nivel hepático, vemos que la expresión génica a nivel pulmonar, en células epiteliales y fibroblastos, es significativamente mayor a nivel de todos los marcadores inflamatorios en comparación con los hepatocitos sanos (CRL2706).

Encontramos diferencias significativas entre fibroblastos y hepatocitos sanos (CRL2706) a nivel de AAS2 (p = 0,029 a las 24 y 48 horas) y tendencia a la significación a nivel de AAS1 y AAS4 (p = 0,057), y entre células epiteliales y hepatocitos sanos (CRL2706) a nivel de PCR a las 24 horas (p = 0,029). Sin embargo en comparación con hepatocitos de hepatocarcinoma (HEP3B) es mayor la expresión génica de AAS1 y AAS2 a este nivel frente al resto de tipos celulares.

## DISCUSIÓN

El presente trabajo estudia la vía patogénica de la inflamación sistémica en la EPOC. Estudios anteriores han demostrado consistentemente que la inflamación en la EPOC no se limita a las vías respiratorias y los pulmones, si no que se asocia a un cierto grado de inflamación sistémica<sup>5</sup>.

Aunque el aumento de los niveles de PCR, IL-6, IL-8 y TNF $\alpha$  han sido reportados en pacientes con EPOC<sup>6, 7</sup>, el origen de la producción de moléculas proinflamatorias en esta entidad clínica sigue sin estar claro. Hasta el momento, una de las teorías más aceptadas sigue siendo el fenómeno de "derramamiento" (spill over) de mediadores inflamatorios al torrente sanguíneo, siendo el pulmón el origen de esta inflamación<sup>8</sup>. Sin embargo, resultados más recientes cuestionan esta hipótesis, porque no se han identificado asociaciones significativas entre las vías respiratorias y las concentraciones sistémicas de citoquinas proinflamatorias<sup>9</sup>. Del mismo modo, las cargas inflamatorias de esputo y de plasma inducida no se correlacionaron entre sí, poniendo esta teoría del origen de la inflamación sistémica en tela de juicio<sup>8</sup>. Es por ello que la posibilidad de una causa inversa no pueda descartarse, en la que la propia inflamación sistémica, sea la responsable de generar lesión a nivel de vía respiratoria, parénquima y vasculatura pulmonar<sup>10</sup>. Tampoco puede descartarse posibles factores genéticos y constitucionales que puedan predisponer a los pacientes con EPOC a cierto grado de inflamación, tanto pulmonar como sistémica<sup>11</sup>.

Nuestro grupo ha demostrado anteriormente la capacidad del parénquima pulmonar y el tejido bronquial de sintetizar RFA en pacientes con EPOC en comparación con fumadores que no desarrollaron la enfermedad. Además, observamos un patrón de secreción diferente según la localización anatómica y cuya secreción parece estar relacionada con variables clínicas de la enfermedad<sup>12, 13</sup>. En particular, se observó que la expresión de marcadores de inflamación es diferente en los fibroblastos, células epiteliales, y macrófagos<sup>12</sup>.

En este estudio, hemos ampliado nuestras observaciones anteriores mediante la evaluación de sus niveles de expresión génica de PCR y AAS tanto en los pulmones como en la arteria y sangre periférica, observando que los tres tipos de muestras expresaban ambos biomarcadores. Nuestros resultados actuales indican generalmente una reacción inflamatoria más marcada a nivel local y no a nivel sistémico, al constatar que el parénquima pulmonar es la principal fuente de RFA en pacientes con EPOC frente a fumadores sanos, en comparación con arteria pulmonar y la circulación periférica.

Debemos tener en cuenta una serie de consideraciones metodológicas en nuestro trabajo. Existe una diferencia entre el número de pacientes EPOC frente a controles sin la enfermedad. La metodología de nuestro estudio consiste en un diseño observacional, sin randomización de los casos, lo cual puede dar lugar a una distribución heterogénea en algunas de las variables. En el grupo de pacientes con EPOC, un menor número de pacientes puede estar justificado, como ya hemos comentado, por la dificultad de incluir pacientes en estadios graves que puedan someterse a intervención quirúrgica, lo cual limita el número de casos. Entre ambos grupos observamos además una diferencia significativa en el consumo de tabaco (paquetes-año), lo cual puede justificarse porque la relación entre el grado de tabaquismo y la EPOC es dosis dependiente. De esta manera, a mayor hábito tabáquico, mayor repercusión sobre la caída de función pulmonar y mayor probabilidad de desarrollar la enfermedad.

Existen estudios previos que muestran una correlación entre los niveles séricos de PCR y la progresión de la enfermedad. Estos trabajos describen una relación entre la concentración sérica de PCR y una disminución del FEV<sub>1</sub> en los pacientes con EPOC, de forma que a mayor concentración de PCR más rápido es el empeoramiento del FEV<sub>1</sub><sup>165</sup>. Nuestro trabajo, a pesar del número limitado de pacientes con EPOC en estadios avanzados de la enfermedad (5 pacientes en estadio III de la GOLD y ninguno en estadio IV), muestra como el grado de inflamación sistémica (medido por los niveles plasmáticos de ambos marcadores inflamatorios), aumentó en paralelo con la gravedad de la EPOC. Además, hubo asociación positiva significativa entre los niveles de PCR en plasma y los niveles de AAS. Es posible, por tanto, que al incluir mayor número de pacientes con enfermedad más severa hubiéramos podido obtener mayores diferencias en los estudios inferenciales.

Centrándonos en el compartimento periférico, hemos medido la expresión de los RFA en los leucocitos de sangre periférica. Los pacientes con EPOC tenían una carga inflamatoria periférica más alta en comparación con los fumadores sanos. Sin embargo, la expresión génica de RFA en el pulmón (tanto en el parénquima como en la vasculatura pulmonar) no se correlacionaba con su expresión en leucocitos de sangre periférica ni con sus niveles plasmáticos, por lo que la fuga de proteínas inflamatorias de los pulmones a la corriente sanguínea es poco probable. *Ji et al.*<sup>14</sup> han estudiado previamente la actividad inflamatoria en diferentes compartimentos (por ejemplo, saliva, esputo, lavado broncoalveolar y suero/sangre) de pacientes con EPOC estratificados de acuerdo a su consumo de tabaco.

Los autores identificaron varias asociaciones entre diferentes marcadores inflamatorios, tanto a nivel local como a nivel sistémico. Aunque se esperaría que las correlaciones de nuestro estudio fueran significativas entre el plasma y la expresión tisular de RFA, si la hipótesis del derramamiento a la circulación sistémica fuera cierta, nuestros resultados deben ser interpretados con precaución.

En primer lugar, la detección de la presencia de un ARNm no proporciona información sobre si ese ARNm se traducirá en una proteína o, de hecho, si será una proteína funcional. Esta falta de concordancia entre los datos de concentración de mRNA y los niveles de proteína es una constante en los estudios de expresión de mediadores inflamatorios en la EPOC<sup>15</sup>. En segundo lugar, continúan por dilucidarse en nuevas líneas de trabajo futuras, el papel de los polimorfismos en los genes que codifican para marcadores inflamatorios. Es posible que los polimorfismos de la PCR tengan relación con los resultados obtenidos<sup>16</sup>. Por último, numerosos RFA (incluyendo PCR y AAS) pueden ser sintetizados en el hígado, otra fuente potencial de inflamación sistémica en la EPOC.

En un segundo tiempo, hemos estudiado la vía patogénica de la inflamación sistémica en la EPOC en dos tipos celulares claves en la patogenia de la enfermedad como son las células epiteliales y los fibroblastos pulmonares (procedentes de líneas comerciales de sujetos con EPOC), comparándola con la síntesis fisiológica a nivel hepático, con objeto de determinar la contribución de cada uno a la inflamación sistémica.

El hígado se ha considerado tradicionalmente la principal síntesis de PCR y AAS en humanos bajo el estímulo de citoquinas (particularmente IL-1, IL-6, TNF $\alpha$ ), como respuesta ante un daño externo. Tanto PCR como la AAS están presentes, pero en niveles bastante bajos, en la sangre de individuos sanos. Sin embargo, sus niveles pueden aumentar hasta 1.000 veces en 24 horas como respuesta de fase aguda, reflejando en gran medida la síntesis de novo en el hígado. De los resultados obtenidos, podemos afirmar que el hígado no es el único responsable en la síntesis de RFA, sino que el pulmón es también capaz de realizar esta síntesis.

Se deben tener en cuenta algunas limitaciones para los estudios realizados a nivel de cultivos celulares como el nuestro, a la hora de evaluar la relación potencial y reflejar completamente la situación in vivo. Nuestro equipo cuenta con una amplia experiencia en el cultivo celular, tanto en líneas comerciales como de cultivo primario procedentes de muestras humanas.

Sin embargo, las limitaciones que surgen ante este tipo de estudios in vitro son especialmente debidas los problemas de mantenimiento de las líneas celulares, lo cual debe tenerse en cuenta a la hora de evaluar la relación potencial y reflejar completamente la situación in vivo.

A nivel pulmonar, destaca la expresión por parte de fibroblastos para los tres tipos de AAS frente a las células epiteliales, lo que daría un mayor protagonismo al papel de estas células en la respuesta inflamatoria.

Los fibroblastos intervienen en la patogenia de la EPOC, especialmente en la afectación bronquiolar de la vía aérea fina, en la que se ha demostrado una proliferación peribronquiolar, que resulta ser el factor más limitante en la génesis de la obstrucción crónica al flujo aéreo<sup>17</sup>. Los fibroblastos son las principales células responsables en la producción y mantenimiento de la matriz extracelular en el pulmón. Por tanto, la alteración en la capacidad funcional de estos fibroblastos puede desempeñar un papel relevante en la patogénesis del enfisema pulmonar, que se traduce en una desestructuración del tejido. Recientemente se ha sugerido una comunicación disfuncional del epitelio-fibroblasto a través de la liberación de mediadores que juegan un papel clave en la inflamación crónica y los procesos de remodelación en la EPOC<sup>18</sup>.

Centrándonos a nivel hepático, en primer lugar, empleamos hepatocitos procedentes de pacientes con hepatocarcinomas (HEP3B), factor limitante que puede relacionarse con el mayor nivel de inflamación obtenido a nivel de hepatocitos con enfermedad. Estudios recientes no solo confirman una mayor expresión de AAS en el suero de pacientes con hepatocarcinoma en comparación con pacientes con lesiones benignas o sin enfermedad, si no que observan una asociación significativa entre las concentraciones elevadas de este biomarcador y la reducción de la supervivencia global, lo que determinaría su utilidad como marcador pronóstico<sup>19</sup>. En segundo lugar empleamos hepatocitos sanos (CRL2706), eliminando ese factor limitante en este segundo grupo celular, con idea de explorar el comportamiento fisiológico.

En nuestro trabajo encontramos, una mayor expresión génica para PCR y todos los subtipos de AAS en el grupo de hepatocitos con hepatocarcinoma frente a hepatocitos sanos, destacando una mayor expresión de AAS1 y AAS2 de forma significativa en este grupo de hepatocitos frente al resto de tipos celulares estudiados.

Cuando comparamos la expresión génica a nivel pulmonar con la síntesis fisiológica a nivel hepático, vemos que la expresión génica a nivel pulmonar, en células epiteliales y fibroblastos, es significativamente mayor a nivel de todos los marcadores inflamatorios en comparación con los hepatocitos sanos.

Sin embargo, debemos reproducir este estudio en pacientes con EPOC, para determinar si el comportamiento del tejido hepático de estos pacientes se comporta de manera similar, y si esta expresión de biomarcadores a nivel pulmonar es independiente o no de la síntesis fisiológica hepática, contribuyendo a aclarar el origen de esta inflamación sistémica en la EPOC.

En conclusión, los conocimientos actuales de los distintos mecanismos que subyacen a la inflamación de la EPOC están aumentando significativamente en los últimos años, pero sigue lejos de ser completa. Se necesitan más estudios para identificar las posibles fuentes sistémicas de moléculas proinflamatorias en pacientes con EPOC. El interés por identificar nuevos biomarcadores pronósticos inflamatorios de la EPOC tiene como objetivo final, dilucidar el nexo de unión entre la EPOC y la afectación sistémica de la misma y ofrecer y mejorar nuevos enfoques terapéuticos a medida<sup>20</sup>.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Agusti AG, Noguera A, Sauleda J et al. Systemic effects of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J*. 2003; 21:347-60.
2. Garcia-Rio F, Miravittles M, Soriano JB et al. Systemic inflammation in chronic obstructive pulmonary disease: a population-based study. *Respir Res*. 2010; 11: 63
3. Dahl M, Vestbo J, Lange P et al. C-reactive protein as a predictor of prognosis in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 175: 250-55.
4. Gabay C, Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med*. 1999; 340: 448-54.
5. 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.
6. Agusti A, Edwards LD, Rennard SI et al. Persistent systemic inflammation is associated with poor clinical outcomes in COPD: a novel phenotype. *Plos One*. 2012; 7(5): e37483.
7. Tanni SE, Pelegrino NR, Angeleli AY et al. I. Smoking status and tumor necrosis factor-alpha mediated systemic inflammation in COPD patients. *J Inflamm (Lond)*. 2010; 7: 29.
8. 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): 930-36.
9. Vernooij 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: 1218-24.
10. Dahl M, Tybjaerg-Hansen A, Vestbo J et al. Elevated plasma fibrinogen associated with reduced pulmonary function and increased risk of chronic obstructive pulmonary disease *Am J Respir Crit Care Med*. 2001; 15; 164(6): 1008-11.
11. Barnes PJ. Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *N Engl J Med* 2000; 343:269-280.
12. 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 Pulm Med*. 2014; 14: 95.
13. 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 Res Med Sci* 2013; 10: 938-47.
14. Ji J, von Scheele I, Bergstrom J et al. Compartment differences of inflammatory activity in chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Res*. 2014; 15: 104.
15. Bustin SA, Benes V, Garson JA et al. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clin Chem*. 2009; 55 (4): 611-22.
16. Dahl M, Vestbo J, Zacho J et al. C reactive protein and chronic obstructive pulmonary disease: a Mendelian randomisation approach. *Thorax* 2011; 66: 197-204.
17. Togo S, Holz O, Liu X et al. Lung fibroblast repair functions in patients with chronic obstructive pulmonary disease are altered by multiple mechanisms. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008; 178: 248-60.
18. Osei ET, Noordhoek JA, Hackett TL et al. Interleukin-1 $\alpha$  drives the dysfunctional cross-talk of the airway epithelium and lung fibroblasts in COPD. *Eur Respir J*. 2016; 48: 359-69.
19. Ni XC, Yi Y, Fu YP et al. Serum amyloid A is a novel prognostic biomarker in hepatocellular carcinoma. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2014; 15(24): 10713-8.
20. Agusti A. The path to personalised medicine in COPD. *Thorax* 2014; 69: 857-64.