

DETERMINACIÓN DE SUSTANCIA P EN SALIVA COMO BIOMARCADOR EN LA EPOC

C. Marín-Hinojosa¹, J.A. Jiménez Ruiz², R. Reinoso-Arija³, R. Ruiz-Serrano de la Espada³, D. Núñez-Ollero³, E. Juan-Saborido³, V. Sánchez-López¹, N. Sola-Idígora³, J.L. López-Campos¹.

¹Unidad Médico-Quirúrgica de Enfermedades Respiratorias. Instituto de Biomedicina de Sevilla, IBI/Hospital Universitario Virgen del Rocío/CSIC/Universidad de Sevilla. Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Respiratorias (CI).

²Grupo de Investigación en Tecnología Electrónica e Informática Industrial (TIC-150) de la Universidad de Sevilla, Sevilla, España.

³Unidad Médico-Quirúrgica de Enfermedades Respiratorias. Instituto de Biomedicina de Sevilla, IBI/Hospital Universitario Virgen del Rocío/CSIC/Universidad de Sevilla.

Proyecto Financiado con la Beca de investigación 4.2021

RESUMEN

Objetivos: la identificación de nuevos biomarcadores en fluidos corporales de fácil accesibilidad, como saliva, resulta clave para avanzar hacia la medicina personalizada en el punto de cuidado. La sustancia P (SP), una taquiquinina presente en los nervios de vías respiratorias y en células inflamatorias, ha sido considerada como agente pro-inflamatorio. El objetivo fue determinar SP en saliva de pacientes con EPOC.

Método: estudio prospectivo observacional analítico de diseño transversal en el que se evaluaron pacientes con EPOC y controles sanos. Se incluyeron pacientes mayores de 40 años, de ambos sexos, con un diagnóstico establecido de EPOC. La recopilación de unos datos clínicos, obtención de muestra de saliva y realización de espirometría simple se realizó en una sola visita. La determinación de SP se realizó mediante ELISA y se mostró en pg/ml.

Resultados: la población de estudio fueron 102 sujetos (53 sin EPOC y 49 con EPOC). Los niveles de SP en saliva de pacientes con EPOC fueron mayores, en comparación con pacientes sin EPOC ($112,66 \pm 16,67$ vs $106,20 \pm 13,45$; $p = 0,008$). Esta diferencia se mostró relevante entre exfumadores ($p = 0,009$). El análisis de SP en función del grado de afectación funcional mostró una tendencia a disminuir con el grado funcional. El análisis entre SP y función pulmonar también mostró tendencia a una correlación negativa entre el cociente FEV1/FVC y los niveles de SP.

Conclusiones: la SP en saliva podría ser considerada como biomarcador en el estudio de la patogenia de la EPOC y los numerosos retos que tiene planteado este estudio.

Palabras clave: EPOC, sustancia P, patogenia, inflamación, saliva.

DETERMINATION OF SUBSTANCE P IN SALIVA AS A BIOMARKER IN COPD

ABSTRACT

Aims: the identification of new biomarkers in easily accessible body fluids, such as saliva, is key to moving towards personalized medicine at the point of care. Substance P (SP), a tachykinin present in airway nerves and inflammatory cells, has been considered a pro-inflammatory agent. The objective was to determine SP in saliva of patients with COPD.

Method: prospective analytical observational study with a cross-sectional design in which patients with COPD and healthy controls were evaluated. Patients over 40 years of age, of both sexes, with an established diagnosis of COPD were included. The collection of clinical data, obtaining a saliva sample and performing simple spirometry was carried out in a single visit. SP determination was performed by ELISA and was displayed in pg/ml.

Results: the study population was 102 subjects (53 without COPD and 49 with COPD). SP levels in saliva of patients with COPD were higher, compared to patients without COPD ($112,66 \pm 16,67$ vs $106,20 \pm 13,45$; $p = 0,008$). This difference was relevant among ex-smokers ($p = 0,009$). The analysis of SP based on the degree of functional impairment showed a tendency to decrease with the functional degree. The analysis between SP and lung function also showed a trend towards a negative correlation between the FEV1/FVC ratio and SP levels.

Conclusions: SP in saliva could be considered as a biomarker to study the pathogenesis of COPD and the numerous challenges that this study has posed.

Keywords: COPD, substance P, pathogeny, inflammation, saliva.

INTRODUCCIÓN

A pesar de los notables avances en los últimos años, el conocimiento de la patogenia de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) continúa con puntos de su desarrollo poco aclarados, igualmente relevantes y sin respuesta que serían necesario conocer para poder avanzar hacia una medicina más personalizadas¹. Aspectos como

los determinantes que condicionan la aparición de la enfermedad en algunos sujetos expuestos, la diferente expresión clínica entre compartimentos del aparato respiratorio, la relación con las comorbilidades o la diferente respuesta terapéutica, representan algunos ejemplos. En este marco, la identificación de nuevos biomarcadores que solos o en combinación permitan avanzar a aclarar estos escenarios clínicos sigue siendo

Recibido: 02.04.2024 Aceptado: 23.05.2024

Dra. Carmen Marín Hinojosa.
carmenmh2007@gmail.com

un objetivo relevante de la investigación traslacional en la EPOC².

La caracterización de biomarcadores para la EPOC se enfrenta a dos grandes retos. Por un lado, dado los resultados infructuosos de iniciativas previas, la identificación de nuevas moléculas que puedan constituir una nueva diana diagnóstico-terapéutica en el proceso de caracterización, tanto de sujetos en riesgo como de pacientes con EPOC, representa un paso necesario³. En este sentido, la sustancia P (SP) es una taquiquinina presente en los nervios de las vías respiratorias y en las células inflamatorias que ha sido considerada como agente proinflamatorio. Estudios previos sobre su expresión o la de su receptor NK1R han observado un incremento de los niveles de SP en las vías respiratorias de pacientes con EPOC otorgando un posible papel de esta inflamación neurogénica en su patogenia^{4, 5}.

Por otro lado, la utilización de métodos no invasivos y con resultados directos en tiempo real en el punto de cuidado sería otra necesidad a cubrir como paso previo necesario para una medicina personalizada⁶. En este sentido, la saliva representa un medio biológico muy accesible pero escasamente estudiado, que refleja de manera directa el estado fisiológico del aparato respiratorio⁷ y que podría representar una oportunidad para la investigación en la EPOC.

En consecuencia, debido a su potencial aplicabilidad clínica, es necesario disponer de mediciones precisas de SP en distintos tipos de muestras para obtener resultados con métodos poco invasivos. El presente estudio quiere explorar la saliva como método de identificación de sustancias relacionadas con la patogenia de la EPOC como paso previo al desarrollo de posteriores iniciativas de investigación. Para ello, emplearemos la determinación de SP como biomarcador con un potencial para el mejor entendimiento de la patogenia de la EPOC.

MÉTODOS

Estudio observacional analítico de diseño transversal en el que se evaluaron pacientes con EPOC y controles fumadores o exfumadores sin EPOC. Se incluyeron pacientes mayores de 40 años, de ambos sexos, con un diagnóstico establecido de EPOC según las recomendaciones actuales, con situación clínica estable y sin agudización actual ni en el mes previo, obtenidos de manera consecutiva de la consulta monográfica de EPOC de nuestro centro y clasificados según los grados de afectación funcional actualmente reconocidos⁸. Los controles fueron pacientes con espirometría normal o familiares sanos de los propios pacientes. Tanto en casos como en los controles se excluyeron aquellos

pacientes con déficit de alfa¹ antitripsina, con enfermedad inflamatoria aguda o crónica, especialmente otras enfermedades respiratorias o sistémicas de la esfera cardiovascular, digestiva, genitourinaria, neurológica, hematológica u osteoarticular. Así mismo, no se incluyeron a pacientes en estado de inmunosupresión o con neoplasia activa o con la presencia de enfermedad oral, lesión o inflamación en la cavidad oral.

El protocolo de actuación era sencillo y consistía en la recopilación de unos datos clínicos, la obtención de una muestra de saliva, según el procedimiento explicado más abajo, y posteriormente en la realización de una espirometría simple en una sola visita. Tras la aceptación del consentimiento informado, a todos los sujetos se les recogieron datos clínicos mediante un cuestionario estandarizado que incluía la edad, el sexo, el tabaquismo cuantificado en paquetes-año, el índice de masa corporal (IMC), la disnea medida por la escala mMRC y el número de agudizaciones u hospitalizaciones en el año previo.

La saliva se recogió en tubos Salivette (Sarstedt AG & Co, DEU), siguiendo una serie de indicaciones como evitar la ingestión de alimentos con alto contenido de azúcar, acidez o cafeína inmediatamente antes de la recolección de la muestra. No cepillar los dientes ni comer una comida fuerte dentro de los 60 minutos anteriores a la recolección de la muestra. Para la toma de la muestra la boca se enjuagaba con agua y se esperaba 10 minutos antes de recoger la saliva. Además, se anotó el consumo de alcohol, cafeína, nicotina y medicamentos recetados o de venta libre en las 12 horas anteriores. Así mismo, se anotó la actividad física y la presencia de enfermedad oral, lesión o inflamación. Tras ello, a cada paciente se le recogió 500 µl de saliva en los tubos Salivette, e inmediatamente la muestra fue centrifugada a 2.600 rpm, 2 min, 4°C. Al sobrenadante recogido tras la centrifugación se le añadió un inhibidor de proteasas (Abcam plc, UK) y fue almacenado a -80°C hasta su utilización. La determinación de SP se realizó mediante el Human Substance P (SP) ELISA kit (MyBioSource Inc, USA). La SP se mostró en pg/ml.

El estudio siguió las recomendaciones de la Declaración de Helsinki para estudios con seres humanos promulgada por la Asociación Médica Mundial⁹. El presente estudio ha sido aprobado por el Comité de ética e investigación clínica de nuestra institución (acta VM-VR_05/2021_N; código interno: 1510-N-21). En cumplimiento de lo establecido en la Ley Orgánica 3/2018, de 5 de diciembre de Protección de Datos Personales y Garantía de los derechos digitales LOPDGDD y su normativa de desarrollo los datos personales de los pacientes se mantuvieron bajo estricta confidencialidad y sólo el investigador principal del proyecto tenía acceso a

ellos. En la base de datos que se diseñó no existía ningún dato personal que permitiera identificar al paciente. Los pacientes eran identificados por un código de estudio. Este código se empleaba en todo el material de estudio incluyendo los cuestionarios y las muestras biológicas. La relación entre el número de caso y el número de historia clínica estaba en posesión del investigador responsable y no se registraba en la base de datos. El responsable del estudio tomó las medidas oportunas para proteger y prevenir el acceso a estos datos, por parte de terceras partes no autorizadas. Cualquier dato requerido por el protocolo podía estar sujeto para auditorías por las autoridades competentes. Los pacientes firmaban un consentimiento informado por escrito autorizando su conformidad con su participación en el estudio, previamente a su inclusión en el estudio.

Los análisis estadísticos se realizaron con el programa IBM SPSS Statistics (IBM Corporation, Armonk, NY), versión 26.0. En primer lugar, se realizó una estadística bivariante descriptiva de los rasgos basales de los sujetos incluidos para ver si había diferencias entre ambos grupos. Las variables cualitativas se muestran con las frecuencias absolutas y relativas observadas de las categorías. Las variables continuas se describen con la media y el error estándar. La comparación entre ambos grupos se realizó empleando el test de la Chi-cuadrado (o test exacto de Fisher) para las variables categóricas y con la prueba de Mann-Whitney para las variables continuas. El estudio de las concentraciones de SP entre los 3 grupos de afectación funcional se realizó con la prueba de Kruskal-Wallis.

RESULTADOS

La población de estudio fueron 102 pacientes de los que 53 fueron sin EPOC y 49 con EPOC. Las características de los sujetos incluidos están resumidas en la **tabla 1**. Como era esperable, se encontraron diferencias en impacto clínico y funcional entre ambos grupos. La distribución por grupos de afectación funcional fue: 5 (10,2%) leves (FEV1 >80%), 18 (36,7%) moderados (FEV1 80 - 50%), y 26 (53%) graves (FEV1 50 - 30%).

Los niveles de SP en la saliva de los pacientes con EPOC fueron mayores, en comparación con los pacientes sin EPOC (112,66 ± 16,67 vs 106,20 ± 13,45; p = 0,008) (**figura 1**). Esta diferencia se mostró especialmente relevante entre los exfumadores de cada grupo (p = 0,009) (**figura 2**).

El análisis de SP en función del grado de afectación funcional mostró que los niveles de SP en saliva tienden a disminuir a medida que aumenta el grado de gravedad de la EPOC sin alcanzar la significación estadística (**figura 3**). El análisis de los niveles de SP en saliva en función del tabaco no mostró significación estadística en ninguno

de los tres subgrupos funcionales estudiados (datos no mostrados).

El análisis de la función pulmonar y los niveles de SP en saliva mostró la tendencia a una correlación negativa entre el cociente FEV1/FVC y los niveles de SP (coeficiente Rho = -0,190, p = 0,066) (**figura 4**).

Tabla 1: Descripción de los pacientes incluidos en el estudio.

Variable	Sin EPOC (n = 53)	Con EPOC (n = 49)	Valor p *
Edad	65,7 (11,9)	70,3 (9,3)	0,078
Sexo (Hombres)	29 (54,7)	35 (71,4)	0,083
Fumador activo (n)	16 (30,1)	15 (30,6)	0,874
IMC (kg/m²)	29,06 (5,6)	27,3 (5,2)	0,159
Disnea basal (mMRC)	1,6 (0,5)	2,1 (0,9)	0,109
FEV ₁ (L)	2,3 (0,8)	1,2 (0,5)	0,001
FEV ₁ (%)	87,3 (19,6)	49,8 (20,7)	0,001
FVC (L)	2,9 (1,1)	2,2 (0,6)	0,001
FVC (%)	87,3 (19,7)	69,5 (18,1)	0,001
FEV ₁ /FVC (L)	78,8 (6,2)	54,4 (12,7)	0,001

*Datos expresados con la media (error estándar) o por sus frecuencias absolutas (relativas) según la naturaleza de las variables. * Calculado por medio de la prueba chi-cuadrado o la prueba de Mann-Whitney según la naturaleza de la variable. FVC: capacidad vital forzada. FEV1: volumen espirado en un segundo. IMC: índice de masa corporal. Escala mMRC: modificada del Medical Research Council.*

Figura 1: Concentración en saliva de sustancia P entre grupos.

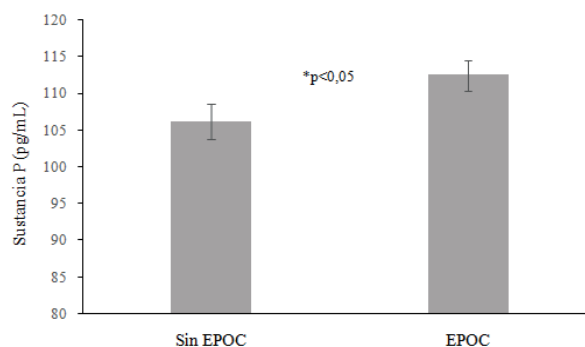


Figura 2: Concentración en saliva de sustancia P entre grupos según el estado de fumador.

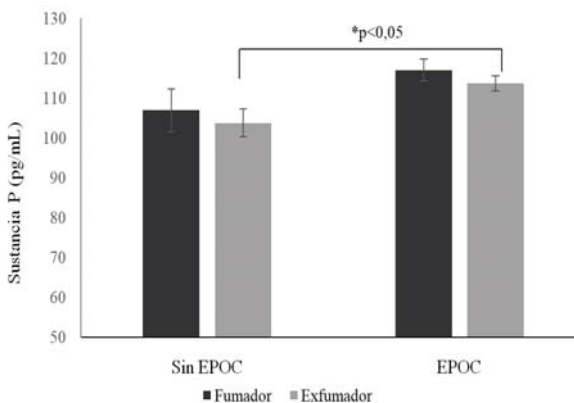


Figura 3: Concentración en saliva de sustancia P en los pacientes con EPOC entre grupos de afectación funcional.

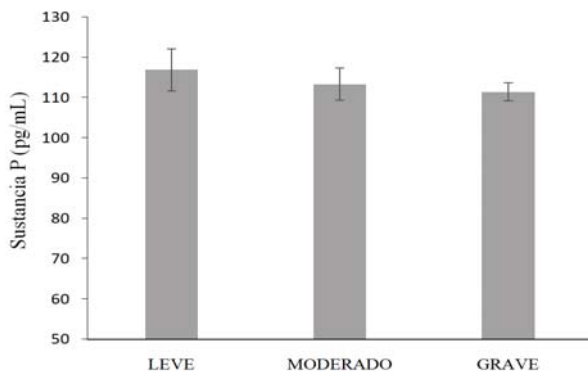
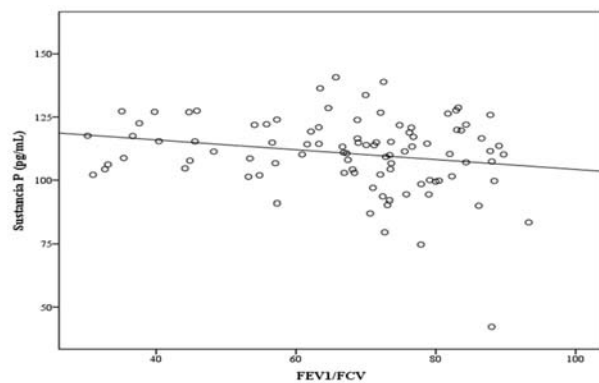


Figura 4: Correlación entre la función pulmonar y los niveles de SP en saliva de pacientes con EPOC.



DISCUSIÓN

Los principales hallazgos de nuestro trabajo indican que los pacientes con EPOC muestran mayores niveles de SP en saliva, en comparación con los pacientes sin EPOC. Esta diferencia se mostró especialmente relevante entre los exfumadores de cada grupo. Así mismo, los niveles de SP en saliva tienden a disminuir a medida que aumenta el grado de afectación funcional.

La SP está localizada en los nervios sensoriales amielínicos (fibras C) de las vías respiratorias y es una taquiquinina que desempeña un papel importante en el desarrollo de la inflamación de las vías respiratorias. Esta SP ha despertado gran interés entre los científicos debido a sus propiedades únicas y su participación en diversos fenómenos fisiológicos y patológicos¹⁰. Múltiples evidencias científicas muestran su presencia en el sistema cardiovascular, el asma, la lesión cerebral traumática, la respuesta inmune, la vasodilatación, la inflamación, la artritis, el cáncer, la hiperreactividad de las vías respiratorias y en la enfermedad respiratoria¹¹. Así mismo, existe una relación entre la EPOC e infección viral respiratoria con los niveles elevados de neuropéptidos y sus receptores, y un defecto en la actividad de la

neuropeptidasa neutral, principal enzima que degrada los neuropéptidos en las vías aéreas¹². La inflamación neurogénica contribuye al desarrollo y progresión de las enfermedades respiratorias inflamatorias como la EPOC y el asma bronquial^{12, 13}. Estos estudios muestran el papel de la inflamación neurogénica en las vías respiratorias por mediación de SP y los cambios en sus niveles séricos y en esputo. Así mismo, la SP también ha sido determinada en otros fluidos corporales como lavado broncoalveolar⁵, en sangre, en saliva¹⁴, exudado nasofaríngeo y en lágrimas¹⁵.

El interés en la saliva como herramienta de diagnóstico ha sido poco explorado y ha aumentado en las últimas décadas¹⁶. La recolección de la saliva es un procedimiento fácil, no invasivo, y relativamente económico. La saliva contiene proteínas derivadas de la sangre, proteínas producidas por las células epiteliales de los acinos de las glándulas salivales y está compuesta por más del 97% de agua, electrolitos, inmunoglobulinas, enzimas y otras proteínas involucradas en diferentes aspectos y procesos fisiológicos como la SP¹⁷. En el contexto de las enfermedades respiratorias constituye una ventana de oportunidad al ser una muestra más del aparato respiratorio más sencilla de obtener que el esputo espontáneo o inducido. A pesar del limitado tamaño muestral, hemos observado que los niveles de SP en saliva de pacientes con EPOC son mayores en comparación con pacientes sin EPOC. Por consiguiente, la SP en saliva podría ser considerada como biomarcador para el diagnóstico de EPOC. En consecuencia, nuestro estudio es pionero en mostrar que la saliva podría ser utilizada como herramienta no invasiva para la determinación de taquiquininas, como la SP, en EPOC.

La liberación de este neuropéptido puede ser inducido por varios estímulos como el humo del cigarrillo, ozono, alérgenos, etc. El humo del cigarrillo, principal agente causante de la EPOC, activa las terminaciones de las fibras C provocando la liberación de taquiquininas y reduciendo el umbral de activación de estas terminaciones nerviosas¹⁸. No obstante, el efecto del humo del cigarrillo sobre la síntesis y liberación de taquiquininas en las vías respiratorias es controvertido. Estudios previos mostraron que la exposición crónica al humo del cigarrillo aumenta la expresión y liberación de taquiquininas de las fibras nerviosas aferentes que inervan las vías respiratorias¹⁹. Sin embargo, otros estudios indican que la SP puede disminuir tras el cese de la exposición al humo del cigarrillo²⁰. Nuestros resultados también mostraron una disminución de los niveles de SP en saliva de pacientes exfumadores. Lo cual indicaría que el cigarrillo afecta al contenido de esta taquiquinina en la saliva. Estos hallazgos podrían ser debidos a que el humo del cigarrillo provoca una disminución en el contenido tisular de sustancia P, a través de la inactivación que induce sobre la endopeptidasa

neutral²¹. Todo ello sugiere una posible implicación de este neuropéptido en la patogénesis de algunos cambios que ocurren en la EPOC. Las alteraciones en la función pulmonar presente en la EPOC pueden estar influidas por SP, la cual se encuentra en los sistemas nerviosos periférico y central ejerciendo efectos excitadores sobre el ritmo respiratorio, aumentando el volumen y la frecuencia. Uno de los índices espirométricos que define esta disfunción pulmonar es el cociente FEV1/FVC. Un estudio reciente mostró una posible relación entre las concentraciones de SP en plasma y esputo con el cociente FEV1/FVC en pacientes con EPOC²². Sin embargo, nuestros datos mostraron tendencia a una correlación negativa entre dicho cociente y los niveles de SP en saliva. Una posible explicación de esta tendencia podría ser que la estimulación continua de los nervios sensoriales, a medida que incrementa la gravedad del EPOC, puede conducir a un agotamiento del contenido de neuropéptidos.

Una de las posibles limitaciones de nuestro estudio es el número pequeño de pacientes que quedó en alguno de los grupos, tras estratificar en función del fenotipo. En base a los resultados obtenidos nos planteamos ampliar el estudio con un tamaño de muestra mayor en cada fenotipo. Otra limitación sería que nuestro estudio es transversal y no tenemos datos para hacer comparativas entre distintas determinaciones. Por último, se trata de un estudio bivariable simple inicial y, por consiguiente, el análisis no se ha ajustado por variables.

En conclusión, la SP en saliva podría ser considerada como biomarcador en el estudio de la patogenia de la EPOC y los numerosos retos que tiene planteado este estudio, lo que en un futuro podría permitir un papel diagnóstico o como diana terapéutica. La saliva puede ser una localización para el estudio de las implicaciones patogénicas de las enfermedades respiratorias.

BIBLIOGRAFÍA

- Christenson SA, Smith BM, Bafadhel M, Putcha N. Chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet*. 2022;399:2227-42. PMID: 35533707.
- Shakeel I, Ashraf A, Afzal M, Sohal SS, Islam A, Kazim SN et al. The Molecular Blueprint for Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD): A New Paradigm for Diagnosis and Therapeutics. *Oxid Med Cell Longev*. 2023;2023:2297559. PMID: 38155869.
- Serban KA, Pratte KA, Bowler RP. Protein Biomarkers for COPD Outcomes. *Chest*. 2021;159:2244-53. PMID: 33434499.
- Vatrella A, Montagnani S, Calabrese C, Parrella R, Pelaia G, Biscione GL et al. Neuropeptide expression in the airways of COPD patients and smokers with normal lung function. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2010;24:425-32. PMID: 21122281.
- Joos GF, De Swert KO, Schelfhout V, Pauwels RA. The role of neural inflammation in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Ann N Y Acad Sci*. 2003;992:218-30. PMID: 12794061.
- Zhu T, Li S, Wang J, Liu C, Gao L, Zeng Y et al. Induced sputum metabolomic profiles and oxidative stress are associated with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) severity: potential use for predictive, preventive, and personalized medicine. *Epma j*. 2020;11:645-59. PMID 33235638.
- Jasim H, Olausson P, Hedenberg-Magnusson B, Ernberg M, Ghafouri B. The proteomic profile of whole and glandular saliva in healthy pain-free subjects. *Sci Rep*. 2016;6:39073. PMID: 27976689.
- Miravittles M, Calle M, Molina J, Almagro P, Gomez JT, Trigueros JA et al. Spanish COPD Guidelines (GesEPOC) 2021: Updated Pharmacological treatment of stable COPD. *Archivos de bronconeumología*. 2022;58:69-81. PMID:33840553
- Halonen JI, Erhola M, Furman E, Haahtela T, Jousilahti P, Barouki R et al. The Helsinki Declaration 2020: Europe that protects. *Lancet Planet Health*. 2020;4:e503-e5. PMID: 33159874.
- Kokabi F, Ebrahimi S, Mirzavi F, Ghiasi Nooghabi N, Hashemi SF, Hashemy SI. The neuropeptide substance P/neurokinin-1 receptor system and diabetes: From mechanism to therapy. *Biofactors*. 2023;49:534-59. PMID: 36651605.
- Mehboob R, Oehme P, Pfaff G. The role of Substance P in the defense line of the respiratory tract and neurological manifestations post COVID-19 infection. *Front Neurol*. 2023;14:1052811. PMID: 36949854.
- De Swert KO, Joos GF. Extending the understanding of sensory neuropeptides. *Eur J Pharmacol*. 2006;533:171-81. PMID: 16464447.
- Bekdas M, Saygi B, Kilinc YB, Kilinc E. Plasma levels of neurogenic inflammation related neuropeptides in pediatric patients with community-acquired pneumonia and their potential diagnostic value in distinguishing viral and bacterial pneumonia. *Eur J Pediatr*. 2024. PMID: 38183438.
- Takeyama M, Mori K, Takayama F, Kondo K, Kitagawa K, Fujii N. Enzyme immunoassay of a substance P-like immunoreactive substance in human plasma and saliva. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 1990;38:3494-6. PMID: 1709394.
- Yamada M, Ogata M, Kawai M, Mashima Y, Nishida T. Substance P in human tears. *Cornea*. 2003;22:548-54. PMID: 14703707.
- Pfaffe T, Cooper-White J, Beyerlein P, Kostner K, Punyadeera C. Diagnostic potential of saliva: current state and future applications. *Clin Chem*. 2011;57:675-87. PMID: 21383043.
- De Almeida Pdel V, Grégio AM, Machado MA, de Lima AA, Azevedo LR. Saliva composition and functions: a comprehensive review. *J Contemp Dent Pract*. 2008;9:72-80. PMID: 18335122.
- De Swert KO, Bracke KR, Demoor T, Brusselle GG, Joos GF. Role of the tachykinin NK1 receptor in a murine model of cigarette smoke-induced pulmonary inflammation. *Respir Res*. 2009;10:37. PMID: 19445658.
- Kwong K, Wu ZX, Kashon ML, Krajnak KM, Wise PM, Lee LY. Chronic smoking enhances tachykinin synthesis and airway responsiveness in guinea pigs. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2001;25:299-305. PMID: 11588007.
- Barnes PJ, Baraniuk JN, Belvisi MG. Neuropeptides in the respiratory tract. Part I. *Am Rev Respir Dis*. 1991;144:1187-98. PMID: 1741554.
- Barnes PJ. Neurogenic inflammation in the airways. *Respir Physiol*. 2001;125:145-54. PMID: 11240158.
- Tian L, Cai L, Kang J. [Elevated substance P content in sputum and plasma in patients with COPD and its relationship with FEV1/FVC]. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi*. 2000;23:138-40. PMID: 11778483.