
Nuevos modelos funcionales en inflamación.

Aplicaciones en patología pulmonar

M.J. Sanz

Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina y Odontología, Universidad de Valencia-EG.

Resumen: *Diferentes enfermedades pulmonares como el asma, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y el daño pulmonar agudo ocasionado por endotoxemia, se caracterizan por tener un proceso inflamatorio asociado, el cual contribuye a la disfunción de las vías aéreas. Actualmente, el tratamiento del asma se basa principalmente en la administración de corticosteroides inhalados junto con agonistas β_2 adrenérgicos. En el caso de la EPOC, diversos ensayos clínicos han mostrado la ineficacia de estos grupos farmacológicos y aún no existe una terapia adecuada para su tratamiento; además, son de sobra conocidos los numerosos efectos secundarios que puede ocasionar el tratamiento crónico con corticosteroides. Por ello, existe un creciente interés en la búsqueda de nuevos fármacos antiinflamatorios para estas enfermedades. Desde hace algunos años, nuestro grupo de investigación se ha centrado en el estudio del efecto de los inhibidores de la fosfodiesterasa-4 (PDE4), de los antagonistas de algunas moléculas de adhesión y de los macrólidos sobre la acumulación leucocitaria. Mediante microscopia intravital, técnica que permite evaluar in vivo los procesos de infiltración leucocitaria, junto con estudios inmunohistoquímicos y citometría de flujo, hemos podido investigar parte del mecanismo por el cual estos grupos farmacológicos podrían mejorar la disfunción de las vías aéreas. Recientemente, en nuestro laboratorio hemos puesto a punto una técnica in vitro, la cámara de flujo, que nos permite evaluar el efecto de diversos fármacos en las mismas circunstancias que estudia la microscopia intravital, pero utilizando endotelio y leucocitos humanos.*

Palabras clave: Leucocito – Endotelio – Vías aéreas – Microscopia intravital – Moléculas de adhesión.

Introducción

Diversas enfermedades pulmonares, como el asma, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y el daño pulmonar agudo ocasionado por endotoxemia, se caracterizan por tener un proceso inflamatorio asociado, el cual contribuye a la disfunción de las vías aéreas. En el asma existen numerosas evidencias que sugieren la participación directa de los eosinófilos infiltrados en el exceso de secreción mucosa y la disfunción de las vías

aéreas asociada a esta enfermedad, mediante la secreción de proteínas tóxicas contenidas en sus gránulos y de diferentes mediadores inflamatorios.¹ Así, existe una acumulación peribronquial de leucocitos, principalmente eosinófilos y linfocitos; estos últimos, con la producción de citocinas Th2, como las interleucinas (IL) 4, 5 y 13, median la acumulación y la activación de los eosinófilos.²

Por otro lado, una de las características comunes entre los pacientes sépticos y los modelos animales de sepsis es que, independien-

temente del órgano en que se origine la sepsis, son los pulmones los primeros en fallar.³ El secuestro de neutrófilos por la microcirculación pulmonar y su activación parecen constituir un evento clave en el daño pulmonar agudo. En este caso son los neutrófilos, cuando se activan, la fuente de proteasas, especies reactivas de oxígeno (ROS) y mediadores inflamatorios que pueden contribuir al daño tanto del endotelio como del epitelio alveolar.⁴

Finalmente, la EPOC también se caracteriza por una progresiva e irreversible disminución de la función pulmonar asociada a una anormal respuesta inflamatoria de las vías respiratorias ante partículas nocivas. En general, los pacientes presentan como característica dominante bronquitis crónica o enfisema debido a la destrucción y el colapso de los alvéolos terminales. En la actualidad se considera a la EPOC como una enfermedad inflamatoria pulmonar de tipo neutrofílico, que se perpetúa, en gran parte, por los macrófagos, las células epiteliales y posiblemente los linfocitos T CD8+, por lo que es completamente diferente a la inflamación que se observa en los asmáticos.⁵

El endotelio vascular forma una barrera activa entre el torrente sanguíneo y el espacio extravascular, el cual participa en la regulación del tráfico leucocitario y en el transporte de macromoléculas hacia el compartimiento extravascular.⁶⁻⁸ Una de las primeras etapas del proceso inflamatorio la constituye la interacción de los leucocitos y el endotelio inducida por diferentes estímulos, que da lugar a la extravasación leucocitaria hasta el foco inflamado. Estas interacciones son particularmente importantes en la microcirculación pulmonar, ya que el pulmón es considerado un órgano muy sensible al daño que se produce como consecuencia de estos procesos.⁹ Tales acontecimientos están mediados por la interacción, de manera concertada, de las moléculas de adhesión (MAC) presentes en el endotelio vascular con sus correspondientes ligandos en la célula leucocitaria.^{8,10,11} El proceso se inicia por una interacción débil y transitoria denominada rodamiento; el rodamiento y la liberación de factores quimiotácticos provoca la activación leucocitaria, a continuación se produce la adhesión firme al en-

dotelio y, finalmente, la migración leucocitaria, que puede ser paracelular o transcelular.^{6,8,11,12} Las MAC se dividen en varias subfamilias en función de su estructura; entre las que participan en las interacciones leucocito-endotelio encontramos a las selectinas, las integrinas, las sialomucinas y las tipo inmunoglobulina.^{6,8,11}

Por consiguiente, un posible blanco de actuación para inhibir o detener el desarrollo de la disfunción de las vías aéreas pasa por entender el proceso inflamatorio asociado a cada una de estas enfermedades. De esta forma, si se controla el proceso inflamatorio en los estadios iniciales de la enfermedad, impidiendo la acumulación de las principales células leucocitarias implicadas, se podrán llevar a cabo nuevas estrategias terapéuticas. Además, en el caso de la EPOC, diversos ensayos clínicos han mostrado la ineficacia de los corticosteroides y aún no existe un tratamiento adecuado para ella,¹³⁻¹⁶ y por otro lado son de sobra conocidos los numerosos efectos secundarios que puede ocasionar la administración crónica de corticosteroides. Por ello, existe un creciente interés en la búsqueda de nuevos fármacos antiinflamatorios para el tratamiento de la patología pulmonar. Desde hace algunos años, nuestro grupo de investigación se ha centrado en el estudio y el mecanismo de acción de la actividad antiinflamatoria de los inhibidores de la fosfodiesterasa-4 (PDE4), de los antagonistas de algunas moléculas de adhesión y de los macrófilos como posibles alternativas terapéuticas para la disfunción de las vías aéreas asociada a diversas enfermedades pulmonares.¹⁷⁻²⁰ En este capítulo describiremos algunos de los nuevos modelos funcionales, tanto *in vivo* como *in vitro*, que hemos empleado para tal fin.

Material y métodos

Modelos in vivo: microscopia intravital

Las preparaciones experimentales utilizadas en estos estudios son similares a las descritas previamente^{17,21} para el estudio de la infiltración leucocitaria en la microcirculación mesentérica de la rata o en el cremáster del ratón.

Los animales son anestesiados y sus arterias carótidas derechas canuladas para monitorizar la presión arterial media (PAM) con un transductor de presión. Un segundo catéter se introduce en la vena yugular izquierda para permitir la administración intravenosa de distintas sustancias (anestesia, fármacos o anticuerpos monoclonales). Según el caso, una porción de la microcirculación mesentérica de la rata o del cremáster del ratón se exterioriza sobre un soporte y se coloca en un pedestal transparente que permite la transluminación de un área de 2 cm² de tejido. El territorio vascular expuesto es perfundido continuamente con una solución tampón bicarbonatada a 37 °C y a un pH de 7,4. La preparación se observa con un microscopio ortostático, y con la ayuda de una cámara de vídeo montada sobre él se proyectan las imágenes en un monitor a color y se graban en un magnetoscopio para su análisis posterior.

Para realizar el estudio se seleccionan vénulas de 25 a 40 µm de diámetro. Para la medida del diámetro vascular se emplea un video *caliper*, y la velocidad de los glóbulos rojos (V_{rbc}) en el torrente sanguíneo se determina utilizando un *optical Doppler velocimeter*. El flujo sanguíneo medio se determina mediante la aplicación de diversos cálculos matemáticos, al igual que el *shear rate*.

El número de leucocitos en fase de rodamiento, adheridos y emigrados se determina posteriormente mediante análisis de las imágenes grabadas en vídeo. Se define un leucocito en fase de rodamiento cuando se mueve a una velocidad menor que la de los eritrocitos en el torrente circulatorio. La velocidad de rodamiento (V_{wbc}) se determina calculando el tiempo requerido por un leucocito en fase de rodamiento para recorrer 100 µm de microvaso, y se expresa en µm/s. El flujo de leucocitos en fase de rodamiento se calcula determinando el número de leucocitos que cruzan un punto de referencia en el vaso durante un minuto. Un leucocito se define como adherido al endotelio vascular si permanece estacionado durante 30 segundos o más. La adhesión leucocitaria se expresa como el número de leucocitos adheridos por 100 µm de vaso, y la migración leucocitaria como el número de

glóbulos blancos emigrados por campo visual rodeando la vénula en estudio.

MEDIDA DE LA PERMEABILIDAD VASCULAR

Con la microscopia intravital también se puede medir la extravasación plasmática en las vénulas poscapilares del mesenterio de la rata o del cremáster del ratón.²⁰ Mediante la administración intravenosa de albúmina bovina marcada con FITC (25 mg/kg) y utilizando una cámara de fluorescencia se puede determinar la fluorescencia tanto en el espacio intravascular como en el extravascular. La imágenes se analizan posteriormente con un sistema de análisis de imágenes. El índice de albúmina extravasada, expresado en porcentaje, se determina mediante el siguiente cálculo matemático: índice de permeabilidad = (media de la fluorescencia en el intersticio – ruido de fondo)/(media de la fluorescencia en el vaso – ruido de fondo) x 100%.

HISTOLOGÍA E INMUNOHISTOQUÍMICA

La arcada del mesenterio o del cremáster en que se han realizado las diferentes medidas puede fijarse con paraformaldehído u otros reactivos, incluirse en parafina y seccionar muestras de 4 µm de espesor. Se puede realizar un estudio histológico, mediante tinción con hematoxilina/eosina, encaminado a determinar el subtipo de leucocito que interacciona con el endotelio, o bien se pueden realizar estudios inmunohistoquímicos utilizando anticuerpos específicos, encaminados a determinar la expresión de moléculas de adhesión, citocinas y quimiocinas por la acción de diferentes estímulos.

Modelos in vitro

ESTUDIOS CON CÉLULAS ENDOTELIALES OBTENIDAS A PARTIR DE VENA DE CORDÓN UMBILICAL HUMANO (HUVEC)

1) Obtención de HUVEC

Para la obtención de HUVEC se emplean cordones umbilicales de menos de 12 ho-

ras desde el parto, siguiendo un protocolo previamente descrito.²⁰ En el momento en que llegan a confluencia, tras el primer pase, ya están preparadas para realizar los diferentes protocolos experimentales.

2) Medida de la expresión de MAC en HUVEC

Las células son incubadas con medio (control) o con diferentes estímulos a diferentes concentraciones y durante distintos tiempos. En algunos experimentos, las células se emplean para la extracción de RNA mensajero (RNAm) y se determina la expresión de éste en las distintas MAC en estudio por técnicas de RT-PCR semicuantitativa.²⁰ Para la determinación del aumento de expresión de la proteína, los cultivos de HUVEC se dejan crecer hasta la confluencia en placas de 96 pocillos. Tras aplicar los diversos estímulos en presencia o ausencia de los fármacos en estudio, la expresión en la superficie celular de la MAC se realiza por ELISA siguiendo un protocolo descrito previamente.²⁰

3) Medida de la adhesión estática de leucocitos a HUVEC

El subtipo de leucocito en estudio, neutrófilo, eosinófilo o mononuclear, es aislado de sangre periférica humana según protocolos ampliamente utilizados.^{20,22,23} Por otro lado, las HUVEC se cultivan en monocapa y se incuban con distintos estímulos en presencia o ausencia de los fármacos en estudio. Los leucocitos se añaden a las células y, transcurridos 30 minutos, se lavan los pocillos para eliminar los leucocitos no adheridos. Las células adheridas se lisan y se cuantifican determinando la actividad mieloperoxidasa (MPO) para neutrófilos y mononucleares, o eoperoxidasa (EPO) si se trata de eosinófilos. El número de leucocitos adheridos por mm² de monocapa de HUVEC se calcula por extrapolación a partir de una curva patrón.^{20,24}

4) Medida de la interacción leucocito-endotelio mediante un modelo dinámico *in vitro*

Las células endoteliales se dejan crecer hasta la confluencia tras un solo pase, se

tripsinizan y, de nuevo, se dejan crecer durante 24-48 horas en una placa de 35 mm de diámetro sobre una base de fibronectina. Tras la estimulación de las HUVEC en presencia o ausencia de los fármacos en estudio y por el tiempo establecido, se sigue un proceso similar al descrito previamente.²³ Brevemente, la cámara de flujo Glycotech se ensambla y se dispone sobre un microscopio invertido de contraste de fases, el cual permitirá observar la monocapa de células endoteliales. Seguidamente se procede a la perfusión de una suspensión de leucocitos, previamente aislados, o de sangre entera durante 5 minutos, gracias a una jeringa conectada a una bomba Harvard que permite regular la velocidad de flujo, pudiendo mimetizar las condiciones del territorio vascular en estudio. Transcurrido este tiempo, con ayuda de una cámara de vídeo conectada a un monitor, se procede a la determinación del número de leucocitos en fase de rodamiento, adheridos y, en algunos casos, emigrados. Posteriormente, si se perfunde sangre entera, la placa se seca, fija y tiñe para realizar el recuento diferencial del subtipo de leucocito que ha interactuado con el cultivo celular. El número de células se expresa por mm² de monocapa de HUVEC. Esta técnica es mucho más adecuada que la descrita con anterioridad, ya que reproduce más adecuadamente las condiciones fisiológicas.

MEDIDA DE LA EXPRESIÓN DE MAC EN LA SUPERFICIE LEUCOCITARIA POR CITOMETRÍA DE FLUJO

La expresión de MAC en la superficie leucocitaria se realiza en sangre entera. Las muestras de sangre citratada (100 µl) se incuban con los fármacos en estudio a la concentración deseada durante 20 minutos a 37 °C. Posteriormente se aplica el estímulo durante el tiempo establecido y a continuación se añade el anticuerpo monoclonal frente a la MAC a determinar, marcado con un determinado fluorocromo, y se incuba durante otros 20 minutos más en hielo y a oscuras. Transcurrido este

tiempo, los glóbulos rojos se lisan y la muestra se fija en un sistema EPICS Q-PREP (Coulter Electronics). Posteriormente, todos los análisis se realizan en un citómetro de flujo EPICS XL-MCL (Beckman-Coulter), tal como se ha descrito previamente.^{19,20}

Resultados

En este apartado mostraremos algunos de los resultados obtenidos con los modelos de inflamación descritos.

Efecto de TR14035 sobre la inflamación pulmonar inducida por ovoalbúmina en rata

TR14035 es un antagonista de dos moléculas de adhesión, $\alpha_4\beta_1$ y $\alpha_4\beta_7$, y su efecto fue

evaluado en un modelo experimental de asma alérgica en ratas Brown Norway (BN). Los animales fueron sensibilizados (SZ) o no (NS) con ovoalbúmina (OVA) y 21 días después expuestos al antígeno o a salino y divididos en cuatro grupos: control negativo (vehículo + salino; NS), control positivo (vehículo + antígeno inhalado; SZ) y tratados con el fármaco (NS + TR14035 y SZ + TR14035). TR14035 (3 mg/kg) se administró por vía oral una hora antes y cuatro horas después de la exposición al antígeno o a solución salina fisiológica. Los animales SZ no tratados mostraron un claro incremento en la hiperreactividad pulmonar a la 5-hidroxitriptamina (5-HT) respecto al grupo NS y no tratado (Fig. 1A). Además, no se hallaron diferencias en este parámetro entre los grupos NS tratados o no con TR14035. Sin embargo, la administración de este fármaco

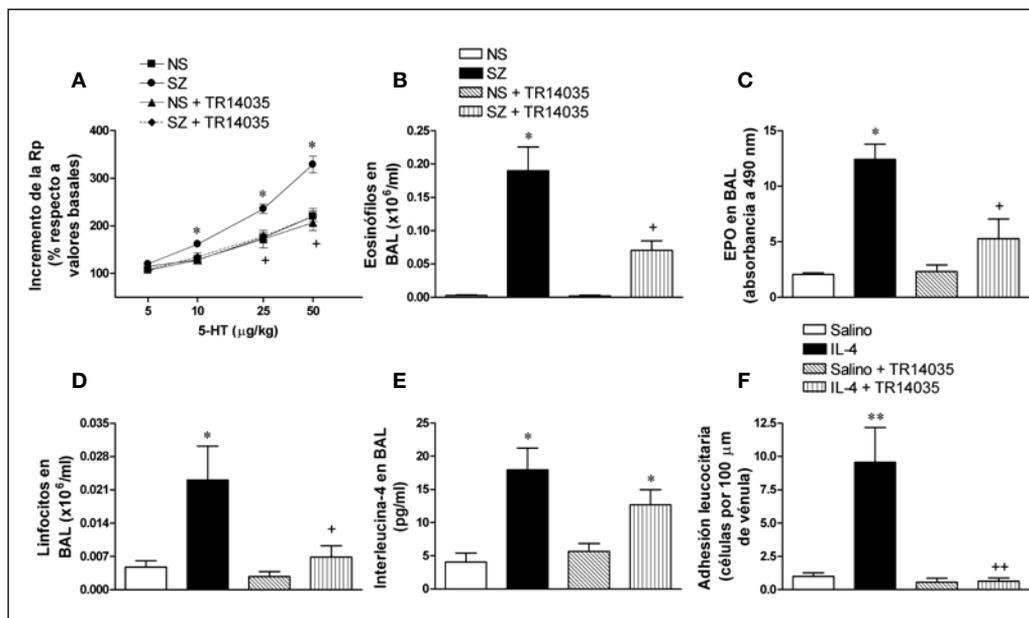


Figura 1. Efecto de TR14035 sobre (A) la hiperreactividad pulmonar (Rp) a la 5-hidroxitriptamina (5-HT), (B) la infiltración eosinófila en el lavado broncoalveolar (BAL), (C) la actividad epoperoxidasa en el BAL (EPO), (D) la infiltración linfocitaria en el BAL y (E) la concentración de IL-4 en el BAL de ratas no sensibilizadas (NS) y sensibilizadas (SZ), sometidas a exposición al antígeno. Los resultados se expresan como media \pm ESM, $n = 7$ animales por grupo. * $p < 0.05$ relativo a ratas NS; * $p < 0.05$ relativo a ratas SZ. (F) Efecto de TR14035 sobre la adhesión leucocitaria en las vénulas poscapilares mesentéricas de la rata inducida por IL-4. Los resultados se presentan como media \pm ESM, $n = 7-8$ animales por grupo. ** $p < 0.01$ relativo al grupo de solución salina; ** $p < 0.01$ relativo al grupo que recibió IL-4.

co a ratas SZ redujo la hiperreactividad pulmonar a la 5-HT a los valores encontrados en los animales NS (Fig. 1A). Seguidamente se procedió al recuento leucocitario diferencial en el lavado broncoalveolar (BAL) de los distintos grupos a las 24 horas de la exposición al antígeno. Se observaron aumentos significativos en el número de eosinófilos, EPO y linfocitos en el grupo de animales SZ no tratados respecto al grupo NS (Fig. 1B, C y D). La administración de TR14035 a animales SZ redujo estos parámetros en un 64%, 69% y 88%, respectivamente (Fig. 1B, C y D). Además, los animales SZ no tratados mostraron un incremento significativo del contenido de IL-4 en el BAL, que no se redujo significativamente tras la administración del fármaco (Fig. 1E). Debido a que la actividad antiinflamatoria mostrada por TR14035 probablemente es consecuencia de la inhibición de la interac-

ción de las integrinas α_4 con la VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*), procedimos a evaluar con microscopía intravital el efecto de este fármaco en la microcirculación mesentérica de la rata. La IL-4 induce un aumento selectivo de la expresión de VCAM-1 en el endotelio, y también de la P-selectina mediante un mecanismo transcripcional.²⁵ La inyección intraperitoneal de IL-4 (0,2 $\mu\text{g/ml}$) causó un aumento significativo en la adhesión leucocitaria a las 24 horas de su administración (Fig. 1F). El tratamiento con TR14035 redujo esta respuesta a valores basales (Fig. 1F).

Efecto de distintos inhibidores de la PDE4 sobre la adhesión leucocitaria y la expresión de distintas MAC

En otro trabajo realizado por nuestro grupo de investigación, llevamos a cabo una serie de

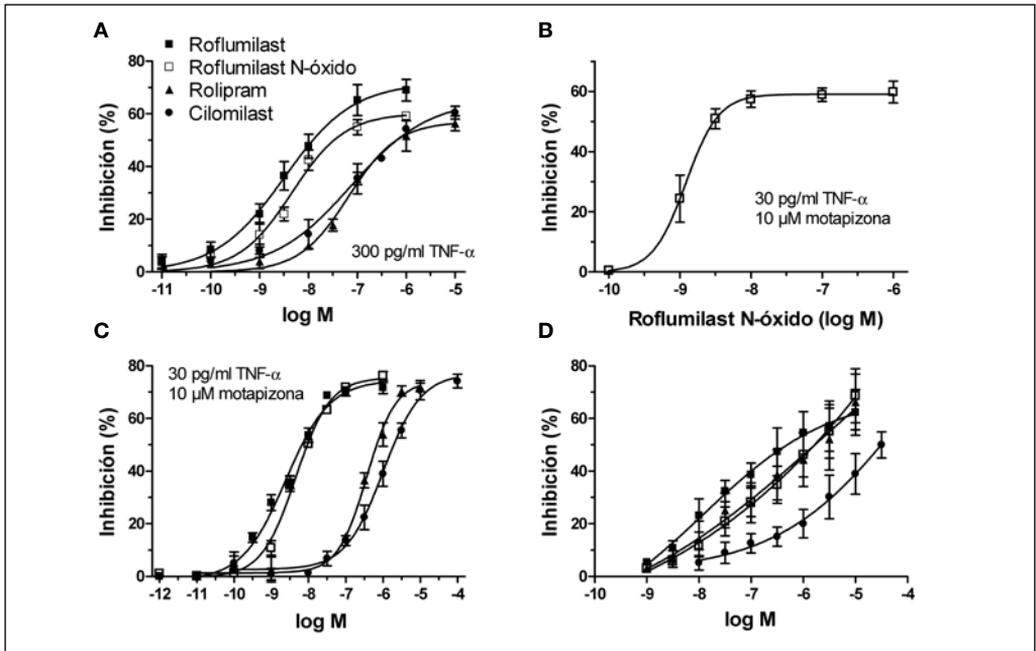


Figura 2. Efecto de distintos inhibidores de la PDE4 (roflumilast, roflumilast N-óxido, rolipram y cilomilast) sobre la adhesión de neutrófilos humanos a HUVEC estimuladas con TNF- α (A), aumento de RNAm de E-selectina (B) y E-selectina (C) en HUVEC estimuladas con TNF- α en presencia de un inhibidor de la PDE3 (motapizona), y sobre el aumento de la integrina CD11b en neutrófilos humanos estimulados con fMLP (D). Los resultados se presentan como media \pm ESM, n = 4-6 muestras por grupo.

estudios *in vitro* con células humanas. En primer lugar comparamos la potencia de distintos inhibidores de la PDE4 en la adhesión de neutrófilos a HUVEC estimuladas con TNF- α (0,3 ng/ml) durante 3 horas. Como podemos observar en la Fig. 2A, todos los inhibidores de la PDE4 inhibieron, de forma dependiente de la concentración, la adhesión de neutrófilos a HUVEC estimuladas con TNF- α . El roflumilast N-óxido fue tan potente como el roflumilast, pero más potente que el rolipram y el cilomilast (Fig. 2A). Seguidamente procedimos a evaluar el efecto del roflumilast N-óxido sobre el aumento del RNAm de la E-selectina inducido por el TNF- α (30 pg/ml). Comprobamos que inhibía dicho aumento de forma dependiente de la concentración en presencia de un inhibidor de la PDE3 como la motapizona (10 μ M) (Fig. 2B). Cuando se comparó el efecto de los cuatro inhibidores de la PDE4 sobre el aumento de la expresión de E-selectina en las HUVEC estimuladas con TNF- α , tanto el roflumilast como el roflumilast N-óxido fueron más potentes que el rolipram y el cilomilast (Fig. 2C). Finalmente, investigamos el efecto de estos fármacos sobre el aumento de la expresión de la integrina CD11b en neutrófilos humanos estimulados con fMLP en un protocolo con sangre entera. Al igual que en los casos anteriores, todos los inhibidores de la PDE4 probados inhibieron este parámetro de forma dependiente de la concentración, y todos resultaron equieficaces, ya que la máxima inhibición de esta respuesta osciló entre el 65% y el 75% (Fig. 2D). En este caso, el roflumilast, el roflumilast N-óxido y el rolipram mostraron una potencia similar, muy superior a la del cilomilast (Fig. 2D).

Discusión

Diversos estudios ya demostraron que la administración de anticuerpos neutralizantes de la integrina α_4 mejoraban diversos aspectos de la fase tardía de la respuesta alérgica de las vías aéreas, como la infiltración de células inflamatorias o la hiperreactividad bronquial,^{26,27} haciendo de la interacción $\alpha_4\beta_1$ /VCAM-1 una

atractiva diana terapéutica para el desarrollo de nuevos fármacos antiasmáticos. En un primer estudio comprobamos que la administración oral del compuesto TR14035, antagonista de bajo peso molecular y dual de las integrinas $\alpha_4\beta_1$ y $\alpha_4\beta_7$, tanto en humanos como en roedores, mejoraba claramente los signos de disfunción pulmonar en un modelo experimental de asma alérgica. Los animales SZ expuestos al antígeno mostraron un persistente incremento de la hiperreactividad pulmonar a la 5-HT y de la acumulación de eosinófilos, neutrófilos y linfocitos en el BAL a las 24 horas de la exposición al antígeno. La administración oral de TR14035 a estos animales suprimió la hiperreactividad pulmonar y el número de eosinófilos, neutrófilos y linfocitos, así como la actividad EPO. Sin embargo, no afectó al incremento de la IL-4 en el BAL. Además, TR14035 no afectó a la hiperreactividad pulmonar basal, lo cual indica que no parece comportarse como un relajante de la musculatura lisa bronquial. Por otro lado, el hecho de que no se inhiba totalmente la infiltración eosinofílica puede explicarse por la existencia de relaciones entre otras MAC diferentes a la interacción $\alpha_4\beta_1$ /VCAM-1, como la de las integrinas β_2 con la ICAM-1. Otro interesante hallazgo de este estudio fue la capacidad de TR14035 de disminuir el contenido de EPO en el BAL de los animales SZ, lo que sugiere que este compuesto también podría reducir la actividad eosinofílica. Por último, se empleó microscopía intravital para examinar el flujo leucocitario en la microcirculación mesentérica de la rata a las 24 horas de la administración de IL-4, ya que las interacciones leucocito-endotelio preceden a la acumulación de leucocitos que se puede detectar en el BAL. Aunque lo más correcto hubiese sido efectuar estos experimentos en la microcirculación pulmonar, esta técnica aún no ha podido ser desarrollada para la realización de este estudio, por lo que en su lugar se seleccionó el lecho mesentérico. Tampoco los modelos de exposición antigénica por inyección intraperitoneal son adecuados, ya que darían lugar a una reacción anafiláctica sistémica. A pesar de ello, hoy día se puede aplicar esta técnica

con este tipo de protocolo si se realiza la exposición antigénica localmente, en el cremáster del ratón sensibilizado. Debido a que el antagonista dual de las integrinas $\alpha_4\beta_1/\alpha_4\alpha_7$ careció de efecto sobre el aumento en el contenido de IL-4 en los animales SZ, y a que esta citocina provoca un aumento selectivo de la VCAM-1 en el endotelio,²⁵ comprobamos que la administración oral de TR14035 podía inhibir la adhesión y la migración leucocitaria inducida por IL-4. Los resultados de este trabajo sugieren claramente que el mecanismo adhesivo que involucra a las integrinas α_4 participa en las respuestas fisiopatológicas asociadas a la inflamación, la cual se desarrolla tras la exposición al antígeno en el modelo de asma alérgica en la rata Brown Norway.

En el segundo trabajo comprobamos, utilizando microscopía intravital, que la administración de un inhibidor de la PDE4 como el roflumilast inhibía de manera dependiente de la dosis las interacciones leucocito-endotelio a las cuatro horas de la administración de LPS y la extravasación plasmática inducida por histamina. Asimismo, observamos que el roflumilast inhibía *in vivo* el aumento de la expresión de las selectinas P y E inducido por LPS. Con el fin de poder extrapolar estos estudios a humanos y comparar su potencia con la de otros inhibidores de la PDE4, realizamos una serie de experimentos complementarios *in vitro* con HUVEC, neutrófilos y sangre entera. El principal metabolito de roflumilast, el roflumilast N-óxido, redujo la adhesión de neutrófilos a las HUVEC, el aumento de la expresión de CD11b en neutrófilos, la expresión endotelial de E-selectina y el aumento de la permeabilidad endotelial de forma dependiente de la concentración. Estos resultados sugieren que la inhibición de la adhesión de neutrófilos a HUVEC estimuladas durante tres horas con TNF- α parece deberse tanto a la disminución de la expresión endotelial de E-selectina como de integrinas β_2 en la superficie leucocitaria. La expresión de P-selectina en las HUVEC no se puede medir adecuadamente, ya que se pierde tras la realización del segundo pase y en el primero su expresión es errática. Por otro lado, en células endoteliales, la actividad

hidrolítica del AMPc reside fundamentalmente en dos isoenzimas, PDE3 y PDE4, y por ello en ocasiones hay que inhibir ambas para observar el efecto sobre la función investigada. Ésta es la razón por la cual muchos de estos estudios *in vitro* se han llevado a cabo en presencia de motapizona, inhibidor selectivo de la PDE3, que por sí misma carece de efecto sobre la adhesión de los neutrófilos a las HUVEC estimuladas con TNF- α , pero aumenta la eficacia de los inhibidores de la PDE4. En general, el roflumilast N-óxido y el roflumilast han resultado más potentes que el rolipram y el cilomilast en la mayoría de los estudios realizados *in vitro*. Por consiguiente, el presente trabajo demuestra la capacidad de los inhibidores de la PDE4 para suprimir, tanto *in vivo* como *in vitro*, las interacciones leucocito-endotelio y la permeabilidad endotelial, procesos característicos de la respuesta inflamatoria crónica.

BIBLIOGRAFÍA

1. Gleich GJ. The eosinophil and bronchial asthma: current understanding. *J Allergy Clin Immunol.* 1990;85:422-36.
2. Wills-Karp M. Immunologic basis of antigen-induced airway hyperresponsiveness. *Annu Rev Immunol.* 1999;17:255-81.
3. Welbourn CR, Young Y. Endotoxin, septic shock and acute lung injury: neutrophils, macrophages and inflammatory mediators. *Br J Surg.* 1992;79:998-1003.
4. Moraes TJ, Zurawska JH, Downey GP. Neutrophil granule contents in the pathogenesis of lung injury. *Curr Opin Hematol.* 2006;13:21-7.
5. O'Byrne PM, Postma DS. The many faces of airway inflammation. *Asthma and chronic obstructive pulmonary disease.* *Asthma Research Group.* *Am J Respir Crit Care Med.* 1999;159: S41-63.
6. Butcher EC. Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell.* 1991;67:1033-6.
7. Adams DH, Shaw S. Leukocyte-endothelial interactions and regulation of leukocyte migration. *Lancet.* 1994;343:831-6.
8. Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell.* 1994;76:301-14.

9. Wagner JG, Roth RA. Neutrophil migration mechanisms, with an emphasis on the pulmonary vasculature. *Pharmacol Rev.* 2000;52:349-74.
10. Goldsmith AM, Hershenson MB, Wolbert MP, Bentley JK. Regulation of airway smooth muscle alpha-actin expression by glucocorticoids. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2007;292:L99-L106.
11. Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol.* 2007;7:678-89.
12. Wang HB, Wang JT, Zhang L, Geng ZH, Xu WL, Xu T, et al. P-selectin primes leukocyte integrin activation during inflammation. *Nat Immunol.* 2007;8:882-92.
13. Barnes PJ. New concepts in chronic obstructive pulmonary disease. *Annu Rev Med.* 2003;54:113-29.
14. Kips JC, Joos GF, Peleman RA, Pauwels RA. The effect of zardaverine, an inhibitor of phosphodiesterase isoenzymes III and IV, on endotoxin-induced airway changes in rats. *Clin Exp Allergy.* 1993;23:518-23.
15. Vestbo J, Sorensen T, Lange P, Brix A, Torre P, Viskum K. Long-term effect of inhaled budesonide in mild and moderate chronic obstructive pulmonary disease: a randomised controlled trial. *Lancet.* 1999;353:1819-23.
16. Gamble E, Grootendorst DC, Brightling CE, Troy S, Qiu Y, Zhu J, et al. Antiinflammatory effects of the phosphodiesterase-4 inhibitor cilomilast (Ariflo) in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003;168:976-82.
17. Sanz MJ, Álvarez A, Piqueras L, Cerdà M, Issekutz AC, Lobb RR, et al. Rolipram inhibits leukocyte-endothelial cell interactions in vivo through P- and E-selectin downregulation. *Br J Pharmacol.* 2002;135:1872-81.
18. Cortijo J, Sanz MJ, Iranzo A, Montesinos JL, Nabah YN, Alfón J, et al. A small molecule, orally active, alpha4beta1/alpha4beta7 dual antagonist reduces leukocyte infiltration and airway hyper-responsiveness in an experimental model of allergic asthma in Brown Norway rats. *Br J Pharmacol.* 2006;147:661-70.
19. Sanz MJ, Nabah YN, Cerdá-Nicolás M, O'Connor JE, Issekutz AC, Cortijo J, et al. Erythromycin exerts in vivo anti-inflammatory activity downregulating cell adhesion molecule expression. *Br J Pharmacol.* 2005;144:190-201.
20. Sanz MJ, Cortijo J, Taha MA, Cerdá-Nicolás M, Schatkon E, Burgbacher B, et al. Roflumilast inhibits leukocyte-endothelial cell interactions, expression of adhesion molecules and microvascular permeability. *Br J Pharmacol.* 2007;152:481-92.
21. Sanz MJ, Hickey MJ, Johnston B, McCoferty DM, Raharjo E, Huang PL et al. Neuronal nitric oxide synthase (NOS) regulates leukocyte-endothelial cell interactions in endothelial NOS deficient mice. *Br J Pharmacol.* 2001;134:305-12.
22. Martínez-Losa M, Cortijo J, Juan G, O'Connor JE, Sanz MJ, Santangelo F, et al. Inhibitory effect of N-acetylcysteine on functional responses of human eosinophils in vitro. *Clin Exp Allergy.* 2007;37:714-22.
23. Mateo T, Naim Abu Nabah Y, Losada M, Estellés R, Company C, Bedrina B, et al. A critical role for TNFalpha in the selective attachment of mononuclear leukocytes to angiotensin-II-stimulated arterioles. *Blood.* 2007;110:1895-902.
24. Sanz MJ, Hartnell A, Chisholm P, Williams C, Davies D, Weg VB, et al. Tumor necrosis factor alpha-induced eosinophil accumulation in rat skin is dependent on alpha4 integrin/vascular cell adhesion molecule-1 adhesion pathways. *Blood.* 1997;90:4144-52.
25. Yao L, Pan J, Setiadi H, Patel KD, McEver RP. Interleukin 4 or oncostatin M induces a prolonged increase in P-selectin mRNA and protein in human endothelial cells. *J Exp Med.* 1996;184:81-92.
26. Abraham WM, Ahmed A, Sielczak MW, Narita M, Arrhenius T, Elices MJ. Blockade of late-phase airway responses and airway hyperresponsiveness in allergic sheep with a small-molecule peptide inhibitor of VLA-4. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997;156:696-703.
27. Kudlacz E, Whitney C, Andresen C, Duplantier A, Beckius G, Chupak L, et al. Pulmonary eosinophilia in a murine model of allergic inflammation is attenuated by small molecule alpha4beta1 antagonists. *J Pharmacol Exp Ther.* 2002;301:747-52.

DISCUSIÓN

A. BADIA: ¿Qué posible alternativa terapéutica tendría una mayor aplicabilidad para personas con afecciones pulmonares?

M.J. SANZ: Para el tratamiento del asma y la EPOC, el roflumilast, un inhibidor de la fosfodiesterasa-4 que ya está en fase III.

A.M. PLANAS: Has mencionado que la IL-4 provoca un aumento de VCAM-1; en cambio, yo asociaba la IL-4 con la respuesta inflamatoria Th2.

M.J. SANZ: En una inflamación neutrofílica, la IL-4 es antiinflamatoria y equivalente a la IL-10. En una inflamación de tipo alérgico es proinflamatoria, de modo que atrae eosinófilos y mononucleares.

A.M. PLANAS: Al contrario de lo que sucede en el cerebro, en el caso que has expuesto los eosinófilos desempeñan un papel relevante y supongo que provocan alguna respuesta en la infiltración de las demás células. ¿Es así?

M.J. SANZ: No. En el asma, los primeros que acuden son los neutrófilos. A diferencia de lo que ocurre en el cerebro, los siguientes son los linfocitos Th2, los cuales liberan

IL-4 y IL-5, promoviendo la movilización de eosinófilos desde la médula ósea hasta los pulmones. Finalmente, los leucotrienos, las proteínas catiónicas, entre otros, al ser liberados de los eosinófilos, producen daño en las vías aéreas y broncoconstricción.

A.M. PLANAS: ¿El endotelio puede responder de forma distinta en función del órgano?

M.J. SANZ: Sí, en las interacciones leucocito-endotelio por angiotensina II se acumulan neutrófilos en el endotelio venular, mientras que en el arteriolar sólo se han observado mononucleares. En el caso del *trans*-resveratrol, a dosis bajas inhibe la infiltración leucocitaria venular, pero no sucede lo mismo en las arteriolas. Es necesario aumentar la dosis para conseguir efectos antiaterógenos. Incluso se han observado diferencias en las quimiocinas, de modo que a dosis altas se inhiben también aquellas quimiocinas que afectan a la quimiotaxis de los leucocitos mononucleares.

A.M. PLANAS: Es un tema muy interesante, porque cuando hay una dosis establecida tendemos a utilizarla para otras aplicaciones, y creo que deberíamos revisarlo.