



UNIVERSITAT_{DE}
BARCELONA

Implicació de la via purinèrgica en la fisiopatologia de la Malaltia Pulmonar Obstructiva Crònica

Ester Cuevas Sales

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

Tesi Doctoral

MECANISMES D'INFLAMACIÓ I SENYALITZACIÓ PURINÈRGICA EN LA MALALTIA PULMONAR OBSTRUCTIVA CRÒNICA

Programa de Doctorat Medicina i Recerca translacional

Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Universitat de Barcelona

Memòria presentada per **Ester Cuevas Sales** per optar al grau de Doctora en
Medicina per la Universitat de Barcelona

Directora i tutora de Tesi: Salud Santos Pérez, Cap de Servei de Pneumologia de
l'Hospital Universitari de Bellvitge i Professora titular de la Universitat de Barcelona

Barcelona 2025



*A tu, Maia, que res aturi les teves
ganes de descobrir el món.*

Agraiments

Agrair, del llatí *gratire*, que expressa el sentiment de qui està agraït. Quelcom aparentment senzill, però alhora, al meu parer, complex quan parlem del llarg camí recorregut fins a arribar a l'elaboració d'una tesi doctoral, en aquest cas, la meva.

Difícil també determinar per on començar a agrair sense oblidar-se de cap dels moments ni de les persones que han contribuït directament o indirectament en aquest procés. Demano disculpes per avançar si em deixo de mencionar a algú i li agraeixo la seva contribució en aquest procés.

En primer lloc, vull agrair-li profundament a la Salut, la directora, el fet de proposar-li a una R4 com jo, un projecte d'investigació sobre la via purinèrgica en l'MPOC. Per sort, malgrat sonar-me una mica a xinès tot allò de la via purinèrgica, vaig decidir acceptar i tirar endavant. Sens dubte, sense ella això no hauria estat possible. Gràcies per confiar en mi. De la Salut m'emporto el positivisme que treu de qualsevol cosa, tot és fàcil i tot és possible. És una gran 'coach' a més d'una gran pneumòloga, investigadora, persona i companya. Gràcies pel teu afecte i suport, tant en l'àmbit professional com personal durant tots aquests anys.

Voldria fer també una especial menció a l'Elisabet, part fonamental per al desenvolupament d'aquesta tesi. Per ensenyar-me i descobrir-me el seu món i passió a la poïata. Gràcies també per la paciència que has tingut al laboratori ensenyant-me les diferents receptes de cuina pas a pas.

Gràcies a la UFOC, a tu Montse, per ser com ets i pel suport durant aquests anys. També a la Maria José, en aquell moment infermera referent de la Unitat. A la Marta, primer tutora i ara companya, gràcies per la teva disposició i recolzament durant el procés. A la Mariana, una tot terreny, sempre a punt i disposada a donar un cop de mà. També al Dani i a la Raquel.

A tots els coautors i coautores que han col·laborat en l'elaboració d'aquesta tesi. I a tu Paula, per donar-li color. Gràcies també a tots els pacients que han acceptat participar en els diferents estudis, sense ells, els avenços en medicina no serien possibles.

Gràcies a tot l'staff del Servei de pneumologia, heu contribuït a la meva formació professional des de resident, passant per una pandèmia que sens dubte ens ha deixat empremta i, hi contribuïu dia a dia amb el vostre coneixement i companyerisme. També als residents que aneu passant any rere any.

Al Guille, la Lupe, el Pere, el Mikel i la Yoli, per totes les estones a la caseta màgica i sota les pèrgoles.

A tota la Unitat d'hospitalització, per fer el dia a dia més fàcil i facilitar l'empenta final a aquesta tesi.

A la Laura, Mar, Pilar i la Marta, les de tota la vida, i a tu també Àlex, casi casi com de tota la vida. Per ser-hi ara i des de sempre tot i que costi de veure's sovint, continuem creixent junts i ara ho fem també amb els petits, l'Heura, el Fèlix, la Maia i els que vinguin.

A la Carla, la Berta i la Lurdes, pels anys de residència amb vosaltres i per tots els moments de després que espero continuar sumant.

A la Ruth, l'Helena, l'Ari i la Irene, amigues i ara co-mares.

A totes les companyes i amigues mares, la meva especial admiració, per demostrar que és possible créixer en el món laboral compaginant la maternitat en una societat que, tot i en vies de millora, no facilita maternar ni la conciliació familiar. Estic segura que hi ha hagut alguns moments que no han estat gens fàcils. Espero, ser capaç de seguir creixent com a professional i com a mare com ho feu vosaltres.

Als meus pares, en Josep Maria i la Sílvia, per confiar i recolzar a una adolescent que no sabia de què anava la vida quan un dia qualsevol, els va dir que volia ser metgessa, així sense més. Gràcies per confiar sempre en mi i per l'esforç que ha suposat per vosaltres que a dia d'avui, sigui Pneumòloga i estigui defensant aquesta tesi doctoral.

A tota la meva família, per ser-hi i fer-me sempre costat, gràcies.

I per últim, i no per això menys important, a tu Víctor, company en aquest camí. Gràcies per estar sempre al meu costat i continuar compartint junts projectes de vida, però sobretot, gràcies per creuar la línia. La Maia té molta sort de tenir-te com a pare.

A totes i tots, gràcies i espero que us agradi el meu 'llibre'.

Finançament

Instituto de Salud Carlos III (ISCIII)

- PI20/00777

- PI16/00977

Societat Espanyola de Pneumologia i Cirurgia toràctica (SEPAR)

- SEPAR 088/2016,

- SEPAR 888/2019

- SEPAR 1116/2020

Fundació Catalana de Pneumologia (FUCAP)-2017.

Hospital Universitari de Bellvitge: Beca post-MIR Comité de Recerca 2019-2020 - IDIBELL

Beca Menarini

Índex de continguts

Índex de figures	21
Abreviatures i acrònims	23
Articles	25
Introducció.....	27
I. La Malaltia Pulmonar obstructiva crònica. Generalitats.....	29
II. Les aguditzacions de l'MPOC (AMPOC)	33
II.I Paper dels broncodilatadors en el control i la prevenció de les aguditzacions de l'MPOC	36
II.II Paper dels corticoides inhalats en el control de les aguditzacions en l'MPOC	37
II.III L'ús dels macròlids en la prevenció de les AMPOC	39
III. La via de senyalització purinèrgica	42
III.I Generalitats	42
III.II Patologia respiratòria aguda	44
III.III Patologia respiratòria crònica.	45
III.IV Implicació de la via purinèrgica en l'MPOC i l'emfisema.	48
III.V Via purinèrgica en la inflamació T1 i T2.	50
III.VI Interacció de la via purinèrgica amb altres vies implicades en la fisiopatologia de l'MPOC. La via de senyalització de l'òxid nítric.	52
Hipòtesi i Objectius.....	55
HIPÒTESI	57
OBJECTIUS.....	59
Material, mètodes i resultats.....	61
Article 1: Imbalance in the Expression of Genes Associated with Purinergic Signalling in the Lung and Systemic Arteries of COPD Patients	63
Article 2: Effect of a soluble guanylate cyclase stimulator on the purinergic pathway in an animal model of emphysema induced by cigarette smoke	75
Article 3. Expression of CD73 ectonucleotidase and inflammatory profile by clinical phenotypes in COPD.....	95
Article 4: Systemic and functional effects of continuous azithromycin treatment in patients with severe chronic pulmonary disease and frequent exacerbations.	115
Discussió.....	127
Conclusions	143
Bibliografia.....	147

Índex de figures

Figura 1. La malaltia pulmonar obstructiva crònica. Extret de *Brightling et al.* 2019 (4)

Figura 2. Inflamació neutrofílica (esquerra) i eosinofílica (dreta) de l'MPOC . Extret de *Barnes et al.* 2019 (21)

Figura 3. Cascada de senyalització de la via purinèrgica. Extret de *Reichert K et al.* 2021 (95)

Figura 4. Senyalització purinèrgica en la inflamació pulmonar crònica. Adaptació de *Le et al.* 2019 (101)

Figura 5. Senyalització i alliberació extracel·lular dels nucleòtids durant la inflamació. Extret de *Yuan et al.* 2021 (126)

Abreviatures i acrònims

ADA: Adenosina deaminasa

AMP: adenosina 5-monofosfat

AMPOC: agudització de la malaltia pulmonar obstructiva crònica

ARN: àcid ribonucleic

ATP: adenosina 5- trifosfat

BAL: rentat broncoalveolar

CI: corticoide inhalat

CXCL8: lligand de quimiocina 8 CXC

COVID19: Malaltia per Coronavirus 2019

ELISA: tècnica enzyme-linked immunosorbent

FEV₁: volum espiratori forçat durant el primer segon

FVC: capacitat vital forçada

GM-CSF: factor estimulant de colònies de granulòcits i macròfags

GOLD: Global Initiative for Chronic Obstructive lung disease

IC: Insuficiència cardíaca

IL: interleucina

JNK: quinasa c-Jun N-terminal

LABA: beta-2 agonista d'acció llarga

LAMA: antagonista muscarínic d'acció llarga

LPS: lipopolisacàrid

MPOC: malaltia pulmonar obstructiva crònica

MUC5AC: glicoproteïna secretora Mucina-5AC

NTPDase1/CD39: nucleòsid trifosfat difosfohidrolasa-1

NT5E/CD73: ecto - 5' - nucleotidasa

ROS: espècies reactives d'oxígen

SDRA: síndrome de distrés respiratori agut

sGC: guanilat ciclasa soluble

T1: inflamació tipus1

T2: inflamació tipus 2

TNF- α : factor de necrosi tumoral alfa

TNFR2: receptor 2 del factor de necrosi tumoral

VRS: Virus respiratori sincitial

Articles

Tesi en format compendi d'articles.

La tesi consta d'1 objectiu general, 5 d'específics i 4 articles.

1. Oriol Careta, **Ester Cuevas**, Mariana Muñoz-Esquerre, Marta López-Sánchez, Yuliana Pascual-González, Jordi Dorca, Elisabet Aliagas, Salud Santos. Imbalance in the expression of genes associated with the purinergic signalling in the lung and systemic arteries of COPD patients. **Sci Rep 2019 Feb 26;9(1):2796. 9 pàgines Factor d'impacte 4.576, Q1.**

2. **Ester Cuevas**, Elisabet Aliagas, Tanja Paul, Yuliana Pascual-González, Marta López-Sánchez, Joan Albert Barberà, Víctor Ivo Peinado, Salud Santos. Effect of a soluble guanylate cyclase stimulator on the purinergic pathway in an animal model of emphysema induced by cigarette smoke. **Purinergic Signalling, 2024 (under review). Factor d'Impacte 3.0, Q2.**

3. **Ester Cuevas**, Elisabet Aliagas, Paula Camps, Carmen Lores, Mariana Muñoz-Esquerre, Marta López-Sánchez, Sara Martí-Martí, Salud Santos. Expression of CD73 ectonucleotidase and inflammatory profile by clinical phenotypes in COPD. [Submitted].

4. **Ester Cuevas**, Daniel Huertas, Concepción Montón, Alicia Marin, Anna Carreras-Salinas, Xavier Pomares, Marian García-Nuñez, Sara Martí, Salud Santos. Systemic and functional effects of continuous azithromycin treatment in patients with severe chronic pulmonaty disease and frequent exacerbations. **Front Med (Lausanne) 2023 Jul 4;10:1229463. 10 pàgines. Volum. Factor d'impacte: 5.1, Q1.**

Introducció

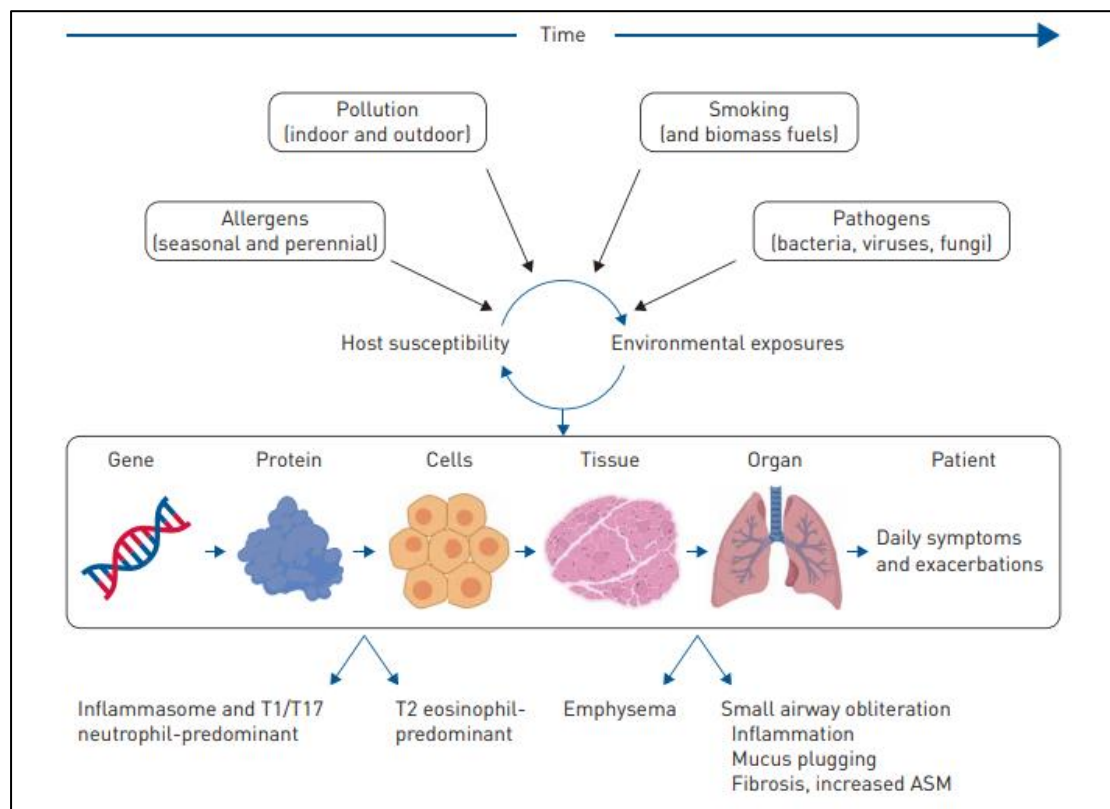
I. La Malaltia Pulmonar obstructiva crònica. Generalitats

La **Malaltia Pulmonar Obstructiva Crònica (MPOC)** és una de les malalties cròniques més prevalents, situant-se com la tercera causa de mort al món l'any 2020. A Espanya, la prevalença se situa al voltant del 10% en adults majors de 45 anys (1). L'MPOC es defineix com a una malaltia pulmonar heterogènia que es caracteritza per símptomes respiratoris (dispnea, tos, expectoració i/o aguditzacions) deguts a anomalies de la via aèria (bronquitis) i/o alvèols (emfisema) que provoquen una obstrucció persistent i progressiva de la via aèria (2). La malaltia és el resultat d'una combinació entre factors genètics i de l'exposició ambiental a noxes pulmonars com el tabaquisme o la inhalació de partícules i gasos tòxics (figura1). El diagnòstic de l'MPOC, es basa en un índex $FEV_1/FVC < 70\%$ post broncodilatador, mesurat per espirometria (2,3). Els símptomes principals que es presenten a la malaltia són la dispnea, la tos amb expectoració, la limitació a l'esforç i l'empitjorament d'aquests símptomes en forma d'aguditzacions.

La progressió de la malaltia, i per tant la progressió de la limitació al flux, està produïda principalment per la remodelació i l'estretament de la via aèria petita i per la destrucció del parènquima pulmonar produint així l'emfisema. Els canvis en el remodelat en l'MPOC, inclouen la disrupció i pèrdua de les cèl·lules ciliades epitelials, la metaplàsia escamosa de l'epiteli respiratori, la hiperplàsia de les cèl·lules caliciformes i de les glàndules mucoses, la hipertròfia del múscul llis bronquiolar, la fibrosi de la paret de les vies aèries i la infiltració de cèl·lules inflamatòries (4). Aquests canvis són conseqüència de la inflamació crònica pulmonar característica de l'MPOC (5). Aquesta inflamació crònica, no només s'observa a nivell pulmonar sinó que els pacients amb MPOC també presenten inflamació sistèmica, sobretot a mesura que avança la malaltia, fet que comporta un empitjorament de les comorbiditats que s'associen a l'MPOC. Alguns estudis han associat la inflamació crònica de l'MPOC amb un augment del risc de 2 a 4 cops de patir malaltia cardiovascular, diabetis, càncer de pulmó i pneumònia (6). A més, els pacients amb inflamació sistèmica persistent, tenen un major risc de presentar aguditzacions i una major mortalitat. Aquesta inflamació crònica sistèmica, la qual es

troba augmentada en context de les aguditzacions, podria a més, accelerar el deteriorament de la funció pulmonar (7). Per tant, els criteris actuals de l'MPOC mitjançant el FEV₁, no reflecteixen la complexitat i heterogeneïtat de la malaltia.

Figura 1. La malaltia pulmonar obstructiva crònica. Extret de Brightling et al (4).

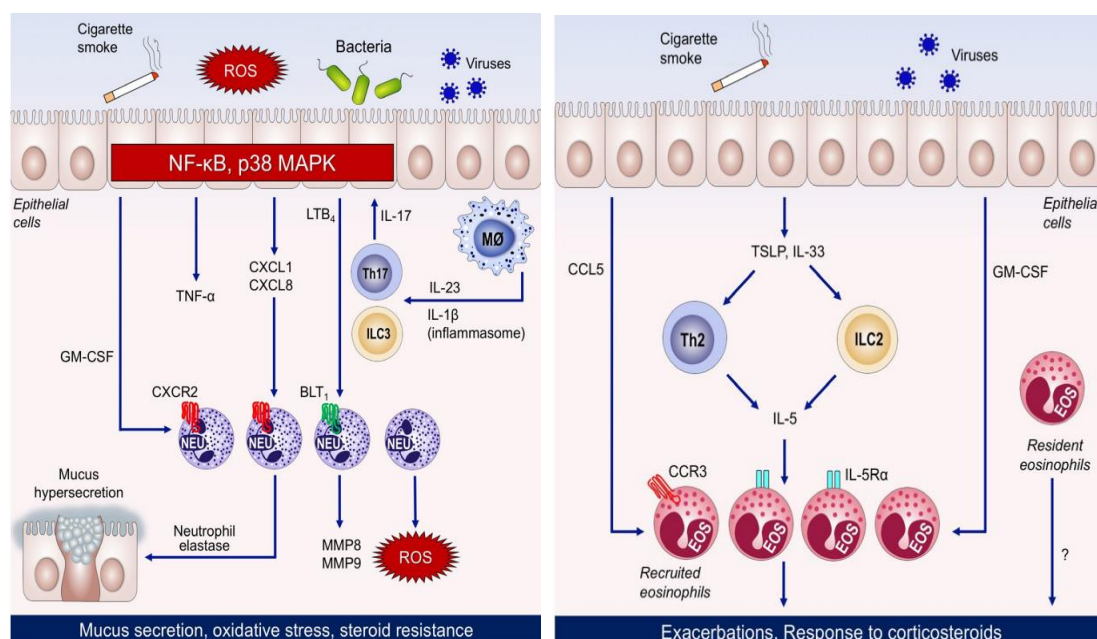


El patró característic de la inflamació pulmonar en l'MPOC, es defineix per la resposta de tipus T1 o neutrofílica que resulta de l'activació i l'augment de macròfags i neutròfils a la via aèria (5,8) així com de limfòcits-T. La inflamació involucra tant a la resposta immune innata (neutròfils, macròfags, eosinòfils, cèl·lules dendrítiques...) com l'adaptativa (limfòcits T i B). Aquestes cèl·lules, juntament amb les cèl·lules epitelials, endotelials i fibroblasts, secreten mediadors proinflamatoris (citocines, quimiocines, factors de creixement...) que generen la inflamació característica de la malaltia. El fum del tabac i d'altres contaminants, activen diferents mediadors inflamatoris, com per exemple el factor de necrosi tumoral alfa (TNF α), lligand de quimiocina 8 CXC (CXCL8) i diferents interleucines (IL) com la IL-33. La IL-33 s'incrementa en els macròfags en

resposta a l'exposició al fum, el que provoca l'activació d'una cascada inflamatòria que produiria el dany a la via respiratòria. Aquest dany de la via aèria, altera la seva funció de barrera pulmonar i predispone a les infeccions bacterianes i a la disbiosi bacteriana que, al seu torn, amplificarien la resposta T1 (4,5). El patró inflamatori de tipus neutrofílic es troba també en els fumadors sense MPOC, tot i que, un cop desenvolupada la malaltia, la inflamació és major i mantinguda i augmenta encara més durant les aguditzacions. Es coneix que en la via aèria dels pacients amb MPOC, es troben nivells elevats de macròfags i neutròfils i que existeix una correlació d'ambdós amb la gravetat de la malaltia (5). A més, la neutrofília es relaciona amb la hipersecreció de moc (9), un símptoma present en alguns dels pacients amb MPOC. La inflamació de la via aèria produïda pel fum del tabac i d'altres contaminants, es manté fins i tot després de l'abandonament de l'hàbit tabàquic (10).

Tot i que la majoria dels pacients amb MPOC tenen un patró inflamatori de tipus neutrofílic (T1), en alguns, la inflamació eosinofílica (T2) és el patró inflamatori predominant (figura2). S'ha descrit que, d'un 30 a un 50% de les aguditzacions, cursen amb nivells elevats d'eosinòfils (11) suggerint que, en alguns pacients, els eosinòfils tindrien un paper més rellevant en la fisiopatologia i curs de la seva malaltia. D'altres estudis, indiquen que fins a un terç dels pacients amb MPOC tenen eosinofília i que aquesta augmenta en els períodes d'aguditzacions (12,13). Els eosinòfils són granulòcits derivats de la medul·la òssia els quals expressen CD38 i CD125 i es troben en baix nombre a la sang perifèrica de subjectes sans. La seva diferenciació té lloc a través de IL-3, IL-5 i GM-CSF (factor estimulant de colònies de granulòcits i macròfags) (14,15). Un cop en estat de maduració, els eosinòfils entren als diferents teixits (glàndula mamària, teixit adipós, úter, pulmó i tracte digestiu) mantenint la integritat de l'òrgan i promovent les funcions immunes de les cèl·lules B i T (16–20). En les malalties inflamatòries de tipus 2, l'eosinopoiesi a la medul·la òssia augmenta, donant lloc a un augment del nombre d'eosinòfils madurs alliberats a la circulació. Des de la sang, els eosinòfils poden migrar a múltiples teixits i òrgans tant en condicions fisiològiques com patològiques (20).

Figura 2. Inflamació neutrofílica-T1 (esquerra) i eosinofílica-T2 (dreta) de l'MPOC. Extret de Barnes, 2019 (21)



Estudis observacionals realitzats pel grup de *Vedel-Krogh et al.* suggereix que els pacients amb més eosinofília en sang perifèrica tindrien un major risc d'aguditzacions (22). D'altres, com ECLIPSE i el realitzat per *Zysman et al.* no van trobar augment de les aguditzacions en relació amb l'eosinofília (23,24), així com tampoc van associar l'eosinofília a un major nombre d'aguditzacions en l'estudi *Casanova et al* (25). Una altra associació que s'ha trobat en alguns estudis, és que els pacients amb eosinofília presentarien una millor funció pulmonar, una millor qualitat de vida (23,26) i fins i tot una reducció de la mortalitat. Davant el fet que alguns pacients amb MPOC, el perfil inflamatori és l'eosinofílic, en els darrers anys, aquestes cèl·lules, han despertat un gran interès i s'han proposat inclús com a possible biomarcador (27,28). Tot i això, el paper dels eosinòfils en la fisiopatologia de l'MPOC no queda clar i requereix més investigació sobre la seva implicació en aquesta malaltia.

II. Les aguditzacions de l'MPOC (AMPOC)

Les aguditzacions en l'MPOC suposen un problema de salut rellevant i són més freqüents a mesura que la malaltia avança suposant un deteriorament clínic i funcional molt important. A més, tenen un impacte en la història natural de la malaltia així com en la qualitat de vida dels pacients, el nombre d'hospitalitzacions i la mortalitat (1). S'estima que cada any entre 22-40% dels pacients amb MPOC, experimenten 1 agudització moderada o severa, i que entre 9 - 16% en tindran més d'una (11). Tot i que les aguditzacions s'associen a major gravetat de la malaltia, no tots els pacients amb MPOC presenten aguditzacions freqüents, per tant, aquest fet podria indicar l'existència d'un fenotip de pacients aguditzadors amb característiques diferents (21,29). Les aguditzacions són situacions clíniques que es caracteritzen per l'empitjorament dels símptomes respiratoris de menys de 14 dies d'evolució, que poden anar acompanyats de dispnea i/o taquicàrdia. Aquestes s'acompanyen també d'una inflamació sistèmica (30) i requereix un tractament addicional. Els símptomes que es presenten durant les aguditzacions no són específics de l'MPOC i, per tant, és important realitzar un diagnòstic diferencial tenint en compte la pneumònia, la insuficiència cardíaca o l'embòlia pulmonar.

La principal etiologia de l'AMPOC, és la infecció del tracte respiratori, sigui de causa bacteriana o viral. L'aïllament microbiològic en els cultius d'esput durant les aguditzacions s'obté fins a un 50% dels casos, tot i que també s'obtenen aïllaments bacterians en la fase estable (>25%) i, per tant, no quedaria clar quin seria el mecanisme pel qual produirien l'agudització (11). S'ha descrit un augment de la càrrega bacteriana durant les aguditzacions comparat amb la situació estable (31). Contràriament, altres estudis no han evidenciat aquesta diferència de càrrega bacteriana entre l'agudització i l'estabilitat de l'MPOC (32) en els gèrmens potencialment patogènics de l'MPOC (*Haemophilus influenzae*, *Brananella catarrhalis* i *Streptococcus pneumoniae*). Altres estudis suggereixen que, el 'trigger' en l'agudització, podria ser l'adquisició d'una nova soca bacteriana, sobretot quan es tracta de noves soques de *H. influenzae*, *B. catarrhalis* i *S. pneumoniae* (33).

Un altre possible mecanisme que pot actuar com a 'trigger' o desencadenant d'una AMPOC és la infecció vírica, que moltes vegades es troba infradiagnosticada en la pràctica clínica habitual per l'absència de tests diagnòstics sistemàtics (34–36). S'ha descrit que fins a un 30% de les aguditzacions estarien causades per virus sent els virus més freqüentment aïllats el rhinovirus, influenza i virus respiratori sincitial (VRS) (11). La presència de virus s'ha associat a més símptomes, pitjor evolució i més lenta recuperació durant les aguditzacions (37,38). A més, s'ha observat en diversos estudis, el sobrecreixement bacterià després d'una infecció vírica (34–36).

Les aguditzacions són heterogènies i els seus mecanismes de resposta en funció del desencadenant de l'agudització són diferents. Malauradament, en un 1/3 dels casos d'AMPOC no s'arriba a conèixer l'etiologia tot i que la més freqüent que, com ja s'ha esmentat anteriorment, és la infecció vírica o bacteriana (39). En aquests casos, les alteracions cardiovasculars podrien jugar un paper important, ja sigui com a causa de l'agudització o com a comorbiditat, ja que aquestes es troben estretament associades a l'MPOC. Se sap que l'MPOC associa canvis vasculars tant a artèries pulmonars com sistèmiques i està ben establert que, en etapes avançades de l'MPOC, els pacients poden desenvolupar hipertensió pulmonar per remodelació vascular, emfisema i hipoxèmia crònica (40,41).

L'MPOC coexisteix sovint amb altres malalties que poden tenir una gran repercussió en el curs de la malaltia. Entre les comorbiditats associades a l'MPOC, les malalties cardiovasculars són les més freqüents (2). Els pacients amb MPOC, tenen de 2-4 vegades més risc de desenvolupar cardiopatia isquèmica, insuficiència cardíaca (IC), arrítmies o vasculopatia perifèrica, ja que comparteixen alguns mecanismes patogènics (42). A més, els esdeveniments cardiovasculars, suposen la primera causa d'hospitalització en pacients amb MPOC arribant fins a un 50% en pacients fumadors amb MPOC lleu/moderada (43,44). Durant les aguditzacions dels pacients amb MPOC, es produeix un augment de la demanda cardiocirculatoria i, per tant, la insuficiència

cardíaca associada a l'agudització respiratòria no és infreqüent, fet que augmenta la morbimortalitat (42). Per tant, les guies clíniques actuals aconsellen una correcta avaluació i control de les comorbiditats cardiovasculars, tant en una situació d'agudització com en situació d'estabilitat clínica.

Avui en dia, es disposa de diferents estratègies per a la prevenció de les aguditzacions dels pacients amb MPOC (45):

- 1) Mesures no farmacològiques que inclouen l'abandonament de l'hàbit tabàquic així com l'exercici físic i la rehabilitació respiratòria o la vacunació davant microorganismes causants d'aguditzacions com la grip, el VRS, el pneumococ i la COVID-19.
- 2) Mesures farmacològiques les quals inclouen els broncodilatadors, els corticoides inhalats (CI) i inhibidors de la fosfodiesterasa 4 entre d'altres.

L'objectiu principal del tractament i control de les aguditzacions és minimitzar l'impacte negatiu que tenen sobre la progressió de l'MPOC i evitar el desenvolupament de futures aguditzacions. En funció de la gravetat de l'agudització i de la gravetat de la malaltia de base, les aguditzacions es podran controlar de forma ambulatoria o amb el pacient ingressat. Més del 80% de les aguditzacions, es podran controlar de manera ambulatoria amb tractament farmacològic incloent els broncodilatadors, els corticoides i els antibiòtics (2).

Tot i això, d'un 25 a un 30% dels pacients amb MPOC continuen patint aguditzacions el que indica que, aquestes mesures no són suficients per prevenir aguditzacions en tots els pacients amb MPOC (46).

II.I Paper dels broncodilatadors en el control i la prevenció de les aguditzacions de l'MPOC

La teràpia inhalada de manteniment és la base del tractament en l'MPOC i té un paper fonamental en la prevenció de les aguditzacions. Disposem de dos tipus de broncodilatadors, els agonistes beta-2 d'acció prolongada (LABA) i els antimuscarínics d'acció prolongada (LAMA). Tots dos han demostrat millorar el FEV₁ i la hiperinsuflació i, per tant, millorar la dispnea, el símptoma cardinal de l'MPOC (47,48). Tant els LABA com els LAMA en monoteràpia redueixen la freqüència de les aguditzacions, incloses les hospitalitzacions, en comparació amb el placebo (47). Quan es comparen, els LAMA tenen un efecte més gran que els LABA en la reducció de les aguditzacions (47,49,50). Les combinacions LABA/LAMA són més efectives que els LAMA en la reducció de les aguditzacions, tal com es va demostrar en l'estudi SPARK amb indacaterol/glicopirroni (51).

L'optimització del tractament broncodilatador de manteniment, juntament amb la revisió de la tècnica inhalatòria després d'una agudització i durant el seguiment dels pacients amb MPOC, és essencial de cara reduir el risc de progressió de la malaltia, les futures aguditzacions i la mortalitat (2,52).

En una agudització, l'ús de broncodilatadors beta-2 agonistes de curta acció, amb anticolinèrgics o sense, són el tractament inicial de les aguditzacions en l'MPOC. Es poden administrar tant amb sistema MDI com amb nebulització ja que no s'han trobat diferències significatives sobre la millora del FEV₁ entre ambdues vies d'administració, sent potser la nebulització, millor tolerada pel pacient en la situació aguda (2).

II.II Paper dels corticoides inhalats en el control de les aguditzacions en l'MPOC

L'ús dels corticoides inhalats amb l'MPOC ha estat àmpliament en discussió durant els darrers anys. Fins ara, a la literatura s'ha evidenciat que els pacients MPOC amb més eosinofília en sang tenen una millor resposta al tractament amb CI prevenint així l'esdeveniment de futures aguditzacions. Diversos estudis donen suport aquesta millor resposta al tractament amb CI en pacients amb eosinofília on s'observa que els pacients que rebien tractament amb CI (juntament amb LABA) reduïen el nombre d'aguditzacions en comparació amb el tractament amb tiotropi i placebo (53). A l'estudi WISDOM en la mateixa línia, es va observar que els pacients amb eosinofília perifèrica als quals se'ls retirava el tractament amb CI presentaven més aguditzacions (54) i, per tant, que el tractament amb CI era beneficiós en els pacients amb eosinofília.

Estudis com el FLAME, un estudi de no-inferioritat, randomitzat i doble cec, no van trobar associació entre la resposta al tractament amb CI i l'eosinofília perifèrica. La reducció de les aguditzacions es va observar en grau més alt en els pacients amb tractament amb doble broncodilatador (LAMA i LABA) en comparació amb els pacients que rebien CI i LABA (55). Models predictius de futures aguditzacions basades en l'eosinofília basal realitzats amb fluticasona/vilanterol i formoterol/beclometasona suggereixen una relació entre el nivell basal d'eosinofília i el risc d'aguditzacions en pacients amb història d'una agudització durant l'any previ (56).

Tot i existir discrepàncies sobre els efectes dels CI en la reducció d'aguditzacions en pacients amb MPOC i eosinofília perifèrica entre alguns dels estudis, en general a la literatura, s'accepta que els pacients amb eosinofília >300 cèl/ μ L sí que responen millor al tractament amb CI, reduint el nombre d'aguditzacions i, per tant, els CI haurien de ser part del seu tractament habitual. Per altra banda, existeix evidència d'un risc més elevat de pneumònia amb el tractament amb CI en els pacients amb MPOC i, en conseqüència, s'hauria de tenir en compte el risc i benefici d'aquest tractament en els pacients. En una revisió de *Tashkin i Welchester* sobre el paper que tenen els eosinòfils en l'MPOC,

proposen un nou algoritme d'optimització de tractament tenint en compte l'eosinofília en sang perifèrica i la història de pneumònies que ha tingut el pacient. Aquest algoritme proposa que els pacients amb eosinofília i sense història de pneumònies tindria un gran benefici del tractament amb CI, mentre que els pacients sense eosinofília, independentment de la història de pneumònies prèvies, no se'n beneficiarien. En els casos amb eosinofília i història de pneumònies s'hauria d'avaluar sempre el risc/benefici de l'ús de CI de forma individual (57).

Segons la guia GOLD actuals, en l'algoritme de tractament està indicat l'ús de CI en pacients amb aguditzacions freqüents i molt simptomàtics (GOLD E) juntament amb el tractament broncodilatador (LABA i LAMA) (2). En aquests pacients, l'eficàcia de la triple teràpia ha demostrat un benefici en el control de les aguditzacions ja sigui en un sol dispositiu o utilitzant diferents dispositius combinats. Estudis com el FORWARD o el SPARK que utilitzen dispositius combinats per la triple teràpia i d'altres com el TRIBUTE, el IMPACT i el ETHOS que utilitzen un únic dispositiu, han demostrat una reducció en el nombre d'aguditzacions (58). En quant als diferents dispositius disponibles, l'evidència suggereix que l'ús d'un únic dispositiu millora l'adherència i milloraria també símptomes i qualitat de vida (59,60).

Pel que fa al tractament de les aguditzacions, alguns grups com el de *Bafghadel et al.* proposen els corticoides sistèmics com a tractament en les exacerbacions dels pacients amb eosinofília perifèrica, ja que presentarien també una millor resposta que els pacients sense eosinofília (61,62).

Més recentment, en pacients aguditzadors amb eosinofília s'ha descrit un benefici en el control de aguditzacions amb l'ús de tractaments biològics com el dupilumab o el mepolizumab que s'inclouran en un futur pròxim en les guies clíniques (63). L'update de la guia GOLD 2024-2025 ja inclou el dupilumab com a tractament per a l'MPOC.

II.III L'ús dels macròlids en la prevenció de les AMPOC

Una estratègia utilitzada en el tractament dels pacients amb MPOC que continuen presentant aguditzacions tot i les diferents mesures de prevenció esmentades prèviament, és l'ús de tractament antibiòtic profilàctic amb macròlids, amb l'objectiu de prevenir les aguditzacions reduint la càrrega bacteriana i/o prevenint l'adquisició de noves soques, a més de mecanismes antiinflamatoris i immunomoduladors.

Els macròlids pertanyen a una gran família d'antibiòtics caracteritzats per la presència d'un anell macrocíclic de lactona (64) els quals exerceixen els seus efectes a través de la unió a ARN ribosomal 50s i tenen un ampli espectre d'activitat enfront de múltiples microorganismes (65). A més dels efectes antimicrobians, es coneix que els macròlids tenen efectes antiinflamatoris i immunomoduladors (66).

Respecte als efectes no antimicrobians dels macròlids trobem:

1. Efectes sobre la secreció de la via aèria: el volum i les característiques biofísiques del moc, juguen un paper important en la regulació del drenatge mucociliar i, la hipersecreció, és una característica de la inflamació crònica de la via aèria la qual pot produir limitació al flux aeri, disfunció del transport mucociliar i infeccions de repetició. Estudis *in vitro* i *in vivo* en models animals (67,68), han demostrat que els macròlids tindrien un efecte sobre els canals de clor fet que, podria inhibir la producció d'aigua. A més, es coneix que els macròlids són capaços de modular l'expressió gènica de diferents mucines, sobretot MUC5AC (69–71). En models *in vivo* de ratolí, s'ha observat disminució de la producció de moc després d'una infecció per *P. aeruginosa* (72).

2. Efectes antiinflamatoris: s'ha observat, que els macròlids tindrien un paper en la supressió de citocines proinflamatòries disminuint així un estat inflamatori el qual és perjudicial per a l'hoste (73,74). La IL-8, és una interleucina reguladora del sistema immune, la qual té un paper important en la quimiotaxi dels neutròfils. Estudis *in vitro* amb macròlids, han demostrat la inhibició de la transcripció i alliberació de la IL-8 per part de les cèl·lules epitelials, tant en persones sanes com en pacients amb inflamació crònica de la via aèria (75). D'altra banda, el TNF- α , una altra citocina important dins del sistema immune, produeix activació de l'endoteli vascular, alliberació d'òxid nítric i augment de la permeabilitat, tot això, produeix un reclutament de cèl·lules inflamatòries, immunoglobulines i del complement. El grup de *Tsai et al.* va demostrar en un model animal murí estimulat amb *Pseudomonas*, que l'azitromicina disminuïa significativament els nivells pulmonars de TNF- α , fet que produïa una inhibició en el reclutament de neutròfils pulmonars (76). També s'ha demostrat que l'azitromicina inhibeix la producció d'IL-8 induïda pel TNF α mitjançant la via de senyalització quinasa c-Jun N-terminal (JNK) (74). La inhibició del reclutament dels eosinòfils, la modulació de cèl·lules dendrítiques mitjançant la inhibició de IL-6 i l'estimulació d'IL-10, o la inhibició de l'expressió de diferents gens induïts per IL-13 (via inflamatòria T2), són d'altres efectes immunomoduladors dels macròlids que han estat estudiats (77–79).

L'ús de diferents macròlids s'ha avaluat en diferents malalties respiratòries essent l'azitromicina el més estudiat i el macròlid que ha demostrat ser més eficaç a l'hora de reduir el risc d'aguditzacions. Diferents estudis randomitzats i controlats han demostrat que el tractament profilàctic amb azitromicina és eficaç per a la reducció de les aguditzacions en els pacients amb MPOC com és el cas del grup d'*Albert et al.* que va demostrar que el tractament amb azitromicina 250 mg al dia durant un any, incrementava el temps entre aguditzacions en comparació amb placebo (266 vs. 174 dies respectivament) així com, disminuïa la freqüència d'aguditzacions d'1.83 a 1.48 per pacient i any (80). En la mateixa cohort, *Han et al.* Va observar que l'azitromicina era més efectiva en pacients de major edat i amb menor gravetat de la malaltia (81). Per

altra banda, l'eficàcia d'aquest tractament es va veure disminuïda en fumadors actius. Un altre estudi, l'estudi COLOMBUS, realitzat en pacients aguditzadors (3 o més aguditzacions a l'any), va demostrar que 500 mg d'azitromicina 3 cops per setmana reduïa de forma significativa (un 42%) la taxa d'aguditzacions en comparació amb el placebo (82). Les dosis d'azitromicina utilitzades per a la prevenció de les aguditzacions en l'MPOC, ha estat diversa en els diferents estudis en literatura. Un estudi recent compara l'eficàcia de les dosis de tractament continu amb azitromicina 500 mg vs. 250 mg durant un any, en el que observaren que l'efecte de l'azitromicina a baixes dosis (250 mg al dia 3 cops per setmana) era similar al de dosis altes (500 mg al dia tres cops per setmana) (83) i, per tant, l'ús de 250 mg d'azitromicina profilàctica, seria eficaç per prevenir AMPOC en pacients amb aguditzacions freqüents. Arran d'aquests i d'altres estudis, diferents guies i publicacions (2,84,85), recomanen l'ús d'azitromicina per al control de les AMPOC en aquell subgrup de pacients amb aguditzacions freqüents i que tinguin un correcte compliment del tractament.

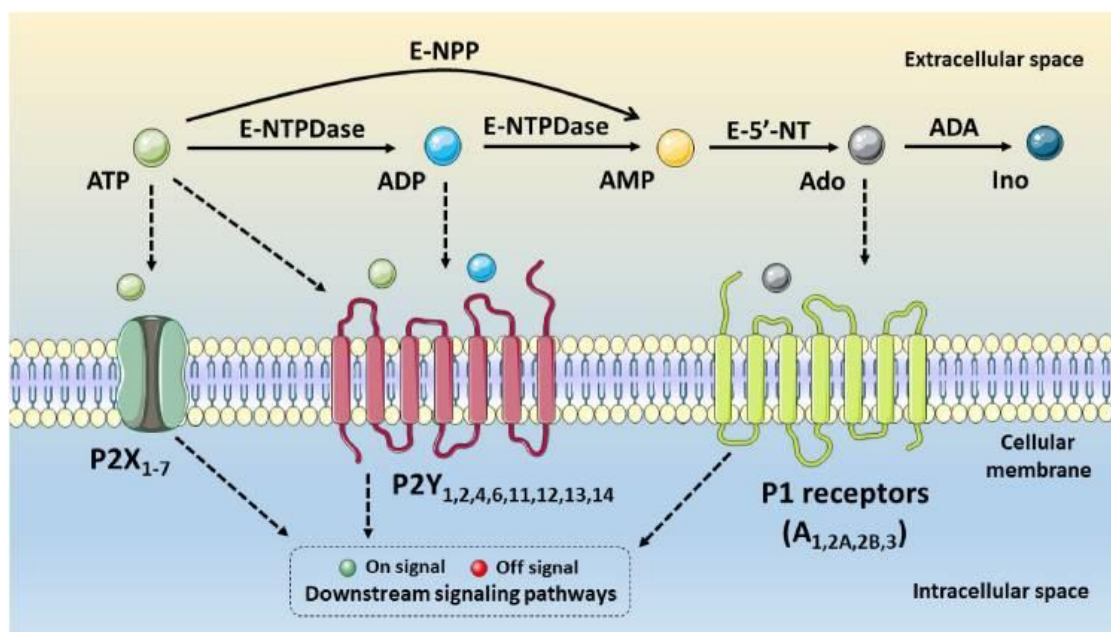
III. La via de senyalització purinèrgica

III.1 Generalitats.

La via purinèrgica va ser descrita per primera vegada l'any 1929 per Dury i Szent-Gyorgyi quan van observar que un compost d'adenina causava un bloqueig cardíac transitori al ser injectat per via intravenosa en un model animal (86). Aquesta via de senyalització, és l'encarregada de la degradació de l'adenosina extracel·lular 5 trifosfat (ATP) extracel·lular a adenosina i està estretament implicada en la resposta immune intervenint tant en la secreció de citocines, quimiocines i antígens de superfície, com en l'eliminació de patògens intracel·lulars i la generació d'espècies reactives d'oxigen (ROS) (87). L'ATP i l'adenosina, s'alliberen a l'espai extracel·lular en resposta a diferents agressions i modulen la resposta immunitària mitjançant diferents receptors (88,89). Els receptors P1 i P2, expressats a la superfície de cèl·lules immunitàries, s'activen mitjançant l'adenosina i l'ATP, respectivament, i regulen els efectes immunomoduladors de les purines. S'han descrit 4 receptors acoblats a proteïnes G d'adenosina (P1) i dues subfamílies de receptors d'ATP (P2X i P2Y) (90).

En els mamífers, els nivells d'ATP extracel·lulars, estan controlats per les ectonucleotidases (91). El nucleòsid trifosfat difosfohidrolasa-1 (NTPDasa1; també coneguda com a CD39) és l'ecto-enzim purinèrgic més expressat en l'epiteli alveolar i bronquial humà, les glàndules submucoses i els fibroblasts (92). L' NTPDasa1/CD39 també es troba a l'endoteli vascular, on regula l'homeòstasi i és essencial per a l'angiogènesi i la vasculogènesi (93). Les seves funcions inclouen: 1) la regulació de la senyalització dels receptors P2 mediada per l'ATP; 2) hidrolitzar seqüencialment ATP/adenosina 5-difosfat (ADP) a adenosina 5-monofosfat (AMP). L'AMP obtingut serà després metabolitzat per l'ecto-5'-nucleotidasa (NT5E)/CD73 a adenosina (Ado) (94) (Figura 3). El paper de CD73, una proteïna transmembrana que converteix AMP en adenosina (87), és menys conegut encarregant-se del segon pas en la degradació de l'ATP.

Figura 3. Cascada de senyalització la via purinèrgica. Extret de Reichert K, et al 2021 (95).



Segons el context fisiopatològic davant el qual ens trobem, l'expressió i activitat de CD39 i CD73 varia i, desequilibris en aquests enzims i els seus productes, poden modular el curs en diferents patologies com ho serien infeccions, malalties autoimmunes o càncer entre d'altres. Un cop degradat l'ATP a adenosina, aquesta última té una implicació rellevant en la resposta a la hipòxia cel·lular. De fet, davant de situacions agudes d'adversitat (isquèmia, inflamació aguda o fins i tot fibrosi) s'activen mecanismes de senyalització a través de l'adenosina que promourien una adaptació tissular davant la hipòxia. Diversos estudis preclínics demostren que la cascada de senyalització que activa l'adenosina a través dels seus receptors és beneficiosa davant del dany agut pulmonar, renal, cardíac, gastrointestinal i hepàtic (96). Contràriament, nivells elevats i mantinguts d'adenosina després d'un dany agut, activarien mecanismes proinflamatoris que produirien fibrosi en diferents òrgans com el pulmó, ronyó, fetge o pell.

Així doncs, CD39 i CD73, són els principals enzims encarregats de metabolitzar els nucleòtids (ATP, ADP i AMP) que regulen la immunitat i la inflamació (97). D'alguna manera, podríem dir que CD39 i CD73 serien els responsables de passar d'un estat cel·lular proinflamatori produït per l'ATP a un estat cel·lular antiinflamatori o d'adaptació al dany tissular agut mitjançant l'activació de l'adenosina. Tot i això, un estat inflamatori mantingut i nivells alts d'adenosina de forma persistent, podria alterar l'axis CD39/CD73 provocant un efecte contrari afavorint un estat d'inflamació crònica. Per tant, entendre la cascada de senyalització purinèrgica, tant a nivell d'expressió gènica i proteica dels enzims, receptors i els seus metabòlits, així com conèixer els seus efectes davant de situacions agudes i cròniques, és d'especial interès de cara a la recerca de nous marcadors o dianes terapèutiques en malalties de base inflamatòria.

III.II Patologia respiratòria aguda

En patologia respiratòria, s'ha descrit una implicació de la via purinèrgica en la modulació de la inflamació i de les cèl·lules que hi intervenen. Com s'ha esmentat prèviament, els efectes antiinflamatoris o proinflamatoris de la via purinèrgica depenen de la situació davant la qual ens trobem, és a dir, aquesta cascada de senyalització té uns efectes diferents davant un dany agut en comparació amb un dany crònic.

Sota condicions d'inflamació i hipòxia agudes, com per exemple la síndrome de distrés respiratori agut (SDRA) o la isquèmia, els nivells d'ATP/ADP es troben augmentats i a través de CD39 i CD73, es produeix una elevació extracel·lular dels nivells d'adenosina (98). L'adenosina té efectes sobre els processos d'inflamació, reparació i remodelació i podrien ser tant protectors com causants de dany cel·lular (96,99,100). Sobretot a través dels receptors A2A i A2B, l'adenosina tindria un paper protector i antiinflamatori en el dany pulmonar agut (96). Els efectes protectors de l'adenosina, inclourien la disminució de la inflamació, la millora de la tolerància tissular a la isquèmia i el restabliment d'una oxigenació normal (101).

En models animals de ratolins amb supressió de CD39 i CD73 (knockout), l'administració de lipopolisacàrid (LPS) via intratraqueal com a estímul del SDRA presentaven major mortalitat. En aquests estudis de ratolins knockout, els nivells de CD73 es trobaven elevats en les cèl·lules T durant el dany pulmonar, suggerint que CD73 tindria un paper important en l'efecte immunosupressor de les cèl·lules T i en la resolució de la inflamació pulmonar aguda (102). A l'estudi de *Reutershan et al.* van demostrar també en un model animal knockout per CD39 i CD73, que es produïa un augment dels nivells de neutròfils a nivell pulmonar a més d'alteracions en la permeabilitat de la barrera alveolocapil·lar després de l'administració de LPS (103). El mateix grup, va mostrar, com l'administració d'apyrase (un enzim que degrada l'ATP i anàleg de CD39) disminuïa l'acumulació de neutròfils y edema produïts per LPS. D'altra banda, la ventilació mecànica invasiva també s'ha associat a dany pulmonar agut trobant-se nivells elevats de CD39 i CD73 i, aquests nivells es trobaven encara més augmentats en animals amb dèficit de CD73. Aquest resultats suggereixen un efecte protector de CD39 i CD73 davant el dany pulmonar agut a través de la degradació de l'ATP a adenosina.

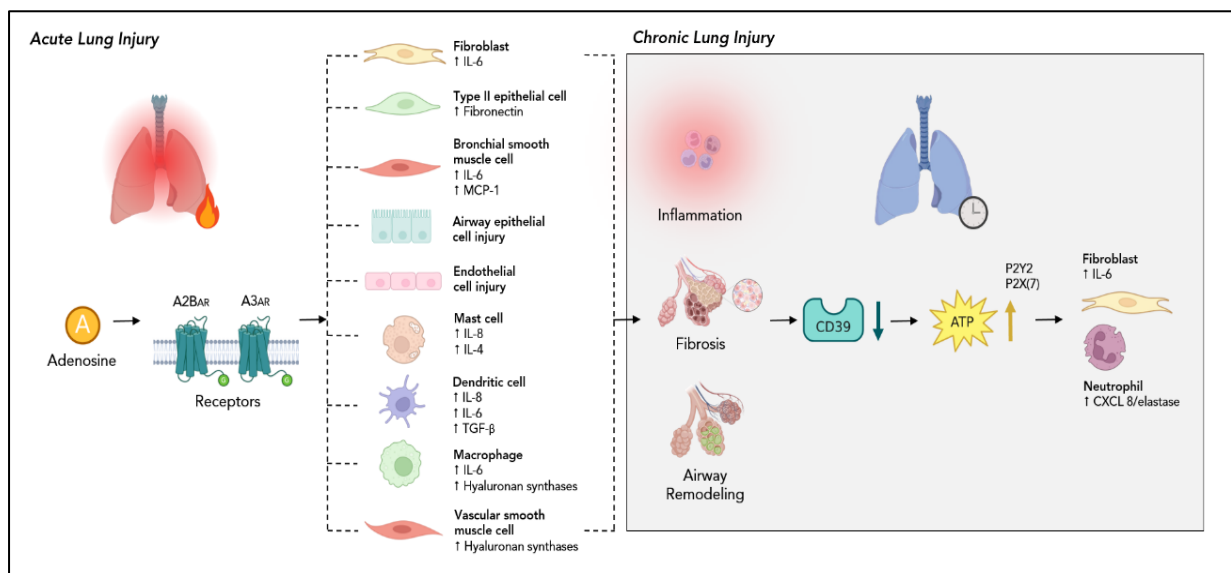
III.III Patologia respiratòria crònica.

En malalties pulmonars cròniques com l'MPOC, l'asma i la fibrosi pulmonar idiopàtica (FPI) els nivells d'ATP extracel·lular es troben elevats contribuint al desenvolupament i progressió de la malaltia (figura 4). Contràriament al que succeïa en situacions de dany agut, en la malaltia crònica, els nivells elevats d'adenosina es troben implicats en el desenvolupament i la progressió d'aquestes malalties cròniques (104).

En l'asma, l'administració d'al·lèrgens, augmenta nivells d'ATP a la via aèria tant en models animals com humans. L'administració d'apyrase o el bloqueig dels receptors P2 en ratolins, ha mostrat una disminució de la inflamació eosinofílica, de la producció de citocines implicades en la via T2 i en la hiperreactivitat de la via aèria (105). En models de fibrosi pulmonar (FP) induïda per bleomicina, també s'han observat nivells elevats

d'ATP a més d'un augment de l'expressió del receptor P2Y2. Les cèl·lules epitelials secreten ATP extracel·lular en resposta al dany pulmonar produït per la bleomicina i a través del receptor P2X(7) es produiria la inflamació pulmonar. La supressió d'aquest receptor en un model animal, disminuïa la inflamació i la fibrosi després de l'exposició a bleomicina (106). L'estudi de *Müller et al.* va demostrar que la supressió de P2Y2 en un altre model animal, disminuïa el grau de fibrosi a través d'una disminució del reclutament de neutròfils, fibroblasts i interleucina-6 (IL-6) (107).

Figura 4. Senyalització purinèrgica en la inflamació pulmonar aguda i crònica. Adaptació de Le et al (101)



El paper dels enzims CD39 i CD73 en les malalties pulmonars cròniques és més controvertit que en situacions de dany pulmonar agut. Models animals en ratolins amb dèficit de CD73 presenten menys hiperresposta a metacolina i també menys infiltració d'eosinòfils i mastòcits tissulars comparat amb un grup control de ratolins sense dèficit, suggerint un paper important de CD73 en la via aèria (108). L'MPOC i la FPI presenten una activitat de CD73 augmentada i nivells més elevats d'adenosina. Per altra banda, CD39 i CD73 també s'han relacionat amb la gravetat de la hipertensió arterial pulmonar en pacients amb FPI i, en concret, CD73 potenciaria la fibrosi pulmonar induïda per radiació (101).

A diferència del paper antiinflamatori de l'adenosina en situacions de dany pulmonar agut, nivells elevats d'adenosina de forma continuada produeixen dany tissular i fibrosi. Publicacions recents, han demostrat que l'activació del receptor A2B per part de l'adenosina, seria el mecanisme que mediarà la producció de molècules proinflamatòries i profibròtiques, com la IL-6, conduint al desenvolupament de malalties pulmonars cròniques (101). En asma, nivells elevats d'adenosina s'han trobat tant en el rentat broncoalveolar (BAL) com en condensat d'alè exhalat en pacients asmàtics així com també nivells elevats després d'exposició a al·lèrgens (109–112). També s'ha descrit que l'adenosina, podria produir broncoconstricció tant en pacients asmàtics com en MPOC (113,114). En models animals de FPI, s'han objectivat nivells elevats d'adenosina, fins i tot, l'administració de dipyridamol (un inhibidor de transportador de nucleòsid) afavoriria l'agudització de la fibrosi. A més, s'han associat nivells elevats d'adenosina amb IL-6 i IL-17, mediadors pro-fibròtics en FPI (115).

En resum, la regulació de la via purinèrgica en una situació de dany pulmonar agut, conduiria a un efecte de disminució, resolució i adaptació a la inflamació i, per tant tindria un efecte protector mentre que, davant un estat inflamatori mantingut, com succeeix en diferents malalties pulmonars cròniques, la via purinèrgica perdria aquesta capacitat protectora i pot contribuir al manteniment de la inflamació i a la progressió de la malaltia pulmonar.

III.IV Implicació de la via purinèrgica en l'MPOC i l'emfisema.

Específicament en l'MPOC, nombrosos estudis en les darreres dècades, han demostrat que l'ATP, estaria involucrada en la seva patogènesi (116). El fum del tabac, estimularia l'alliberació de l'ATP dels neutròfils, el qual tindria un paper crucial en l'alliberament de la quimiocina CXCL8 que és, en gran part, responsable del reclutament dels neutròfils a les zones d'inflamació, i de l'elastasa, que condueix a la destrucció de teixit pulmonar (117). En condicions homeostàtiques, els nivells extracel·lulars d'ATP són bastant baixos degut a un equilibri entre l'alliberament de l'ATP i la seva ràpida degradació per part de les ectonucleotidases. En canvi, davant de situacions com la infecció, la inflamació, la hipoxèmia i la mort per apoptosi cel·lular, l'ATP és alliberat des de dins de les cèl·lules arribant a concentracions extracel·lulars prou altes per poder ser detectats per les cèl·lules circumdants que expressen receptors de la via purinèrgica (118).

Com ja s'ha esmentat, l'ATP és degradat per les ectonucleotidases CD39, la més expressada en teixits humans, i després per CD73. El paper de CD73 tant en l'MPOC com en la resta de patologies és menys conegut, ja que és el segon pas de la hidrolització d'ATP, tot i que també té una implicació rellevant com a producteur d'adenosina en el desenvolupament de malalties cròniques.

En models animals amb ratolins, s'han trobat nivells més elevats d'ATP pulmonar amb inflamació pulmonar aguda i emfisema després de l'exposició a fum de tabac (119). També en models animals, s'ha observat que, neutralitzant els nivells d'ATP intrapulmonar o bloquejant receptors específics d'ATP, s'inhibeix la inflamació pulmonar induïda pel fum, i protegiria enfront del desenvolupament d'emfisema (119). D'altra banda, en pacients amb MPOC s'ha vist que l'acumulació d'ATP estimula el reclutament i l'activació de neutròfils i macròfags pulmonars, augmentant així, l'alliberament de mediadors inflamatoris (120). Recentment, s'ha observat que la deficiència de CD39 en un model animal d'emfisema en ratolins, empitjorava l'emfisema i la inflamació després

de la inhalació de fum i, que l'administració d'un anàleg de CD39 (apyrase) limitava el desenvolupament d'emfisema (121). El mateix grup va analitzar i va comparar el rentat broncoalveolar (BAL) i l'esput de pacients amb MPOC, fumadors sense MPOC i mai fumadors observant una major activitat de CD39 en el grup amb MPOC fins i tot, després de l'abandonament de l'hàbit tabàquic. També, s'ha comparat l'expressió de CD39 en sang perifèrica entre pacients amb MPOC aguditzats amb pacients MPOC estables i sans, trobant una major expressió sistèmica de CD39 en pacients amb MPOC. Aquestes troballes recolzen la idea que l'augment de CD39 actuaria com un mecanisme compensatori en el dany pulmonar agut (122). En aquesta línia, *Aliagas et al.* ha demostrat que hi ha una disminució de l'expressió i activitat pulmonar de CD39 en les etapes inicials de l'MPOC, el que afavoriria la inflamació pulmonar i podria contribuir a la progressió de la malaltia (123).

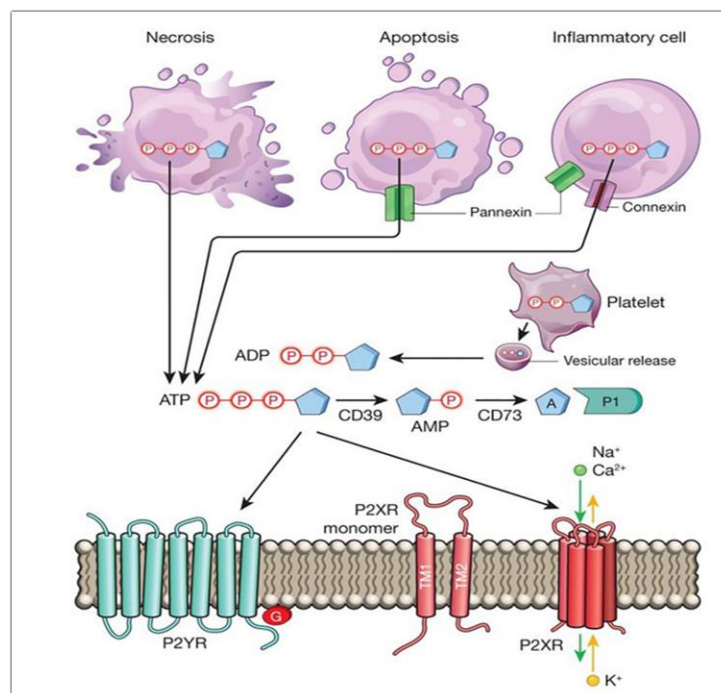
En una malaltia com l'MPOC, que conviu amb altres patologies cròniques freqüents com la insuficiència cardíaca o la cardiopatia isquèmica, és interessant destacar que la via de senyalització purinèrgica es troba implicada en aquestes comorbiditats i fins i tot s'ha descrit com una possible diana amb potencial terapèutic (124). Se suggereix un efecte protector de l'adenosina en determinades patologies cardíques a través de diferents receptors (A1, A2, A3) presents a les cèl·lules cardíques (fibroblasts, cèl·lules endotelials, cèl·lules musculars). Entre aquests efectes protectors, es produiria una inhibició de la producció de citocines, inhibició de l'agregació plaquetària, disminució de l'efecte inotrópic o actuaria davant de la proliferació fibroblàstica (125).

Tot i això, tant en les fases d'estabilitat de l'MPOC com en les fases d'agudització, una situació que comporta un augment dels nivells d'inflamació pulmonar i sistèmica i que marquen evolució i pronòstic, no es coneixen bé els mecanismes reguladors en l'expressió d'aquests enzims i els seus metabòlits.

III.V Via purinèrgica en la inflamació T1 i T2.

Sabem que una resposta inflamatòria adequada és essencial de cara a resoldre situacions de dany tissular o infeccions. No obstant això, una situació d'inflamació crònica o no resolta, pot conduir a perpetuar lesions tissulars o contribuir al desenvolupament fisiopatològic i progressió en algunes malalties (126). El control de la inflamació involucra diferents vies i cascades de senyalització, essent la via purinèrgica una de les que podria tenir un paper més rellevant. Diferents estudis i revisions mostren com la via purinèrgica té una implicació directa en els mecanismes de control de la inflamació a través de diferents receptors. Per exemple, en la inflamació de la mucosa i de malalties intestinals inflamatòries, diversos estudis, proposen que els receptors d'adenosina A2A i A3, i els enzims CD39 i CD73 tenen un gran potencial terapèutic (figura 5).

Figura 5. Senyalització i alliberació extracel·lular dels nucleòtids durant la inflamació. Extret de Yuan et al (126)



Pel que fa a la inflamació pulmonar, l'adenosina sembla tenir un paper important en la relació hipòxia/inflamació. La hipòxia activaria la cascada de senyalització d'adenosina a través de la inducció del receptor A2A i, com s'ha esmentat prèviament, proporcionaria protecció en la SDRA, tot i que, d'altra banda, nivells elevats i mantinguts promourien un estat d'inflamació que perpetuaria les lesions tissulars derivades de la hipòxia/inflamació en les malalties pulmonars cròniques. A més, la via de senyalització purinèrgica modula les funcions de les cèl·lules immunitàries, afectant les respostes inflamatòries tant dels eosinòfils com dels neutròfils els quals, com ja s'ha esmentat, estan implicats en l'MPOC (118).

1. Via purinèrgica i els neutròfils: Els neutròfils són cèl·lules efectores del sistema immune innat encarregades de la defensa contra infeccions bacterianes, sent el 'trigger' d'activació de diferents mecanismes antibacterians (127,128). Està descrit que tant l'ATP com l'adenosina regularien les funcions del neutròfil tenint efectes oposats (129). Per una banda, l'ATP augmentaria l'activitat dels neutròfils i, per contra, l'adenosina l'inhibiria, evitant el possible dany tissular derivat d'una resposta inflamatòria mantinguda (130,131). L'enzim CD39 s'expressa àmpliament en els neutròfils i també ho fa CD73, tot i que en menor grau (132,133). Tots dos enzims estan implicats en la regulació de l'activitat dels neutròfils; de fet, una disfunció de l'eix CD39/CD73 s'ha associat amb una activitat desmesurada dels neutròfils produint una activitat quimiotàctica i una adhesió a l'endoteli vascular augmentades (87).
2. Via purinèrgica i els eosinòfils. A banda de la detecció d'activadors del sistema immune (quimiocines, citocines, etc..), els eosinòfils són capaços també de detectar nucleòtids que poden amplificar les respostes induïdes per altres estímuls (118). Així doncs, els nucleòtids extracel·lulars contribuïrien a la inflamació i dany tissular eosinofílic tant en models animals com en models humans (98). A més, els eosinòfils, són capaços de secretar

ATP, el qual estimularia l'alliberament de diferents mediadors proinflamatoris mitjançant l'activació de receptors purinèrgics (134). D'altra banda, els eosinòfils expressen una àmplia gamma de receptors purinèrgics i l'activació d'aquests receptors, s'associa amb el reclutament d'eosinòfils al teixit inflammat i l'alliberament de citocines proinflamatòries (118). De fet, estudis en ratolins transgènics suggereixen que l'adenosina contribuiria en la remodelació pulmonar produïda per l'activació de la via T2 (sobretot a través de IL-13 i IL-4) (99). Per tant, la inhibició d'alguns receptors purinèrgics dels eosinòfils amb nous fàrmacs podria reduir la resposta inflamatòria i el dany tissular.

En resum, aquesta evidència científica que s'ha esmentat en aquests apartats sobre la via purinèrgica posa de manifest el paper rellevant que té aquesta via en la modulació de la resposta immune i de mediadors inflamatoris en les malalties pulmonars respiratòries i obre nous punts de mira de cara a identificar nous biomarcadors i desenvolupar possibles nous tractaments. Tot i això, existeixen certes controvèrsies sobre els mecanismes d'acció tant de les purines com dels enzims que les degraden i dels seus receptors tant en la malaltia pulmonar aguda, com en la crònica. Per tant, és necessari aprofundir en el coneixement sobre aquests mecanismes d'acció i així poder conèixer quan i com la via purinèrgica té un paper protector i quan un paper proinflamatori per poder potenciar o inhibir, respectivament, aquests efectes en les diferents situacions de dany pulmonar.

III.VI Interacció de la via purinèrgica amb altres vies implicades en la fisiopatologia de l'MPOC. La via de senyalització de l'òxid nítric.

L'òxid nítric (NO) és un potent vasodilatador que es produeix a partir de L-arginina a través de 3 isoformes de la NO sintetasa (NOS): NOS neuronal (nNOS), NOS endotelial (eNOS) i NOS induïble (iNOS) (135). En condicions, normals, l'NO es troba implicat en diversos processos biològics incloent el manteniment de la funció de la

barrera pulmonar o l'homeòstasi. No obstant això, tant la seva deficiència com el seu excés, especialment en combinació amb ROS, poden provocar alteracions patològiques i contribuir a la patogènesi de malalties pulmonars (136). Al pulmó, en condicions normals, l'NO té un efecte homeostàtic broncoprotector. En les malalties pulmonars obstructives, el NO pot ser també beneficiós pel seu efecte broncodilatador, però també pot tenir un efecte contrari a través de la formació de peroxinitrit (135).

La disfunció endotelial en l'MPOC, es deu a l'alteració en l'expressió i l'alliberació de diferents mediadors vasoactius derivats de l'endoteli, on l'NO hi tindria un paper clau (137). La metilació i proteòlisi dels residus de L-arginina (ADMA i SDMA) inhibiria la funció de NO sintetasa. Aquests residus es troben augmentats en l'MPOC i ho estan encara més durant les aguditzacions (138). De fet, la concentració sèrica d'un d'ells, l'ADMA, és un factor de risc independent de mortalitat a llarg termini per qualsevol causa i es troba relacionat amb l'augment de resistència de la via aèria (137).

El guanilat ciclasa soluble (sGC), és un enzim que actua com a receptor intracel·lular de NO i en grau més baix de CO. La seva activació produeix cGMP que produiria broncodilatació i vasodilatació (135). Tot i que els pulmons dels pacients amb MPOC tenen alts nivells de NO, el to de la via aèria es troba augmentat (139). S'ha demostrat, que els pacients amb MPOC tenen menor expressió pulmonar proteica i d'mRNA de la sGC, el qual està correlacionat amb la gravetat de la malaltia. És per això que alguns estudis han començat a investigar l'ús de fàrmacs que estimulen la producció de sGC en l'MPOC (140). Alguns d'ells han suggerit que el tractament amb sGC podria ser un possible tractament per pacients amb MPOC (141,142).

Alguns estudis, descriuen una interacció entre l'òxid nítric i l'ATP, els seus metabòlits i receptors (143,144), però es desconeixen els mecanismes que interactuen o comparteixen aquestes dues vies de senyalització implicades tant en la fisiopatologia com en el desenvolupament de l'MPOC i l'emfisema.

En resum, la progressió de l'MPOC, es deu principalment als canvis estructurals causats per la inflamació crònica que, també es manifesta en l'àmbit sistèmic i s'associa a un major risc de comorbiditats i aguditzacions, accelerant el deteriorament de la funció pulmonar. Tot i que la inflamació de tipus I o neutrofílica és la més habitual i important en l'MPOC, el paper dels eosinòfils té un creixent interès i encara no és ben conegut.

Desafortunadament, no existeix cap teràpia farmacològica eficaç capaç de frenar la progressió de l'MPOC o de millorar-ne la supervivència. Per tant, resulta necessari buscar nous marcadors i/o noves dianes terapèutiques que combatin o previnguin la progressió de la malaltia.

La via de senyalització purinèrgica és l'encarregada de la degradació de l'ATP i nombrosos estudis recents, han demostrat que estaria involucrada en la patogènesi de l'MPOC tot i que el seu mecanisme d'acció no és del tot conegut. L'evidència actual mostra certes controvèrsies sobre els mecanismes d'acció tant de les purines com dels enzims que les degraden i dels receptors tant en la malaltia pulmonar aguda com en la crònica.

Aprofundir en el coneixement de la via purinèrgica i en els mecanismes inflamatoris que es produeixen en l'MPOC és crucial i podria obrir el camí cap a nous biomarcadors o noves dianes terapèutiques per aquesta malaltia respiratòria tan complexa i heterogènia.

Hipòtesi i Objectius

HIPÒTESI

En els pacients amb MPOC, els enzims de la via purinèrgica que degraden l'ATP extracel·lular es troben alterats a nivell pulmonar i sistèmic, afavorint així un entorn proinflamatori que podria condicionar l'evolució i el pronòstic de la malaltia.

La inflamació crònica de l'MPOC, tant en fase d'agudització com en situació d'estabilitat i la desregulació de la via purinèrgica, estan interrelacionades i aquesta pot modificar-se en funció de determinats tractaments.

OBJECTIUS

L'objectiu general d'aquesta tesi és aprofundir en el coneixement dels mecanismes que controlen la inflamació, analitzant el perfil inflamatori específic i els enzims reguladors de la via purinèrgica en pacients amb Malaltia Pulmonar Obstructiva Crònica en diferents nivells de gravetat tant en la fase estable com en les aguditzacions.

Per tal d'assolir aquest objectiu, s'han realitzat els diferents estudis inclosos en aquesta tesi, amb els següents objectius específics:

- 1)** Analitzar l'expressió dels gens involucrats en la via purinèrgica i de la inflamació, en teixit pulmonar i artèries sistèmiques en pacients amb Malaltia Pulmonar Obstructiva Crònica estable, comparats amb mai fumadors i fumadors sense obstrucció mitjançant Real Time-Polymerasa Chain Reactions arrays.
- 2)** Avaluar l'expressió gènica i proteica pulmonar dels principals enzims que regulen la via purinèrgica (gen *ENTPD1*/CD39 i gen *NT5E*/CD73) i el potencial efecte del tractament amb un estimulador de la guanilat ciclasa soluble en un model animal de conillet d'índies amb emfisema induït per fum de tabac.
- 3)** Estudiar l'expressió proteica pulmonar i sistèmica dels enzims purinèrgics en pacients amb Malaltia Pulmonar Obstructiva Crònica amb diferents fenotips clínics i gravetat i analitzar aquesta expressió en fase estable i durant l'agudització.
- 4)** Analitzar la relació entre el perfil inflamatori sanguini (eosinofílic o no eosinofílic) i l'expressió dels enzims purinèrgic en pacients amb Malaltia Pulmonar Obstructiva Crònica.

5) Analitzar els canvis funcionals i sistèmics associats amb la Malaltia Pulmonar Obstructiva Crònica greu en pacients amb aguditzacions freqüents després del tractament continu amb azitromicina i la possible participació de mecanismes inflamatoris i immunomoduladors.

Material, mètodes i
resultats

Article 1: Imbalance in the Expression of Genes Associated with Purinergic Signalling in the Lung and Systemic Arteries of COPD Patients

Oriol Careta, **Ester Cuevas**, Mariana Muñoz-Esquerre, Marta López-Sánchez, Yuliana Pascual-González, Jordi Dorca, Elisabet Aliagas, Salud Santos

Resum: L'evidència actual indica que la via purinèrgica està implicada en la patogènesi de la malaltia pulmonar obstructiva crònica (MPOC) i en el remodelat vascular; tanmateix, no es coneix del tot el seu paper en els canvis vasculars inicials de l'MPOC. La nostra hipòtesi va ser que l'expressió de gens que regulen els nivells d'ATP i adenosina extracel·lulars estaria alterada en les artèries pulmonars i sistèmiques dels pacients amb MPOC.

Mètodes: Es va realitzar una PCR quantitativa en temps real per analitzar l'expressió relativa de 17 gens associats a la senyalització purinèrgica i la inflamació en pulmons i artèries intercostals de mai fumadors (NS) (n = 16), fumadors sense obstrucció (NOS) (n = 17) i pacients amb MPOC (n = 21). L'expressió gènica dels enzims que degraden l'ATP va disminuir en ambdós teixits dels pacients amb NOS i MPOC en comparació amb els NS.

Resultats: L'expressió NT5E (transcripció genètica d'una ectonucleotidasa hidrolitzant AMP) va augmentar en ambdós teixits en NOS en comparació amb els altres grups. Els receptors P1 i P2 no van mostrar canvis en la seva expressió. L'expressió de gens associats a la inflamació (interleucina-13) només va augmentar en teixit pulmonar de pacients amb MPOC.

Consulsións: Aquestes troballes suggereixen que l'expressió de diferents enzims extracel·lulars que degraden l'ATP s'altera en els fumadors (pacients amb NOS i MPOC), la qual cosa afavoreix la inflamació. No obstant això, l'expressió elevada de NT5E que es troba només a NOS podria compensar aquest entorn inflamatori.

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Imbalance in the Expression of Genes Associated with Purinergic Signalling in the Lung and Systemic Arteries of COPD Patients

Oriol Careta^{1,2,3}, Ester Cuevas^{1,2,3}, Mariana Muñoz-Esquerre^{1,2,3}, Marta López-Sánchez^{1,2,3}, Yuliana Pascual-González^{1,2,3}, Jordi Dorca^{1,2,3}, Elisabet Aliagas^{1,2,3} & Salud Santos^{1,2,3,4}

Growing evidence indicates that purinergic signalling is involved in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and in the vascular remodelling that occurs in other disorders; however, its role in initial vascular changes of COPD is not entirely known. We hypothesised that expression of genes regulating extracellular ATP and adenosine levels would be altered in the lung and systemic arteries of COPD patients. Quantitative real-time PCR was performed to analyse the relative expression of 17 genes associated with purinergic signalling and inflammation in lungs and intercostal arteries of never smokers (NS) (n = 16), non-obstructed smokers (NOS) (n = 17) and COPD patients (n = 21). Gene expression of ATP-degrading enzymes was decreased in both tissues of NOS and COPD patients compared to NS. *NT5E* expression (gene transcribing for an AMP hydrolyzing ectonucleotidase) was increased in both tissues in NOS compared to the other groups. P1 and P2 receptors did not show changes in expression. Expression of genes associated with inflammation (interleukin-13) was upregulated only in lung tissues of COPD. These findings suggest that the expression of different extracellular ATP-degrading enzymes is altered in smokers (NOS and COPD patients), promoting inflammation. However, the high *NT5E* expression found only in NOS could compensate this inflammatory environment.

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is a highly prevalent chronic respiratory disease and a major cause of mortality and morbidity worldwide¹. Smoking has long been recognised as the main risk factor², but not all smokers develop the disease. The factors that determine the development of COPD in susceptible smokers are complex and may involve genetic and epigenetic factors, altered immune regulation, and abnormal repair mechanisms^{3,4}.

COPD is associated with vascular alterations in both pulmonary and systemic arteries⁵. In advanced stages of the disease, the risk of developing pulmonary hypertension increases due to the loss of pulmonary vessels caused by emphysema, pulmonary vascular remodelling, and chronic hypoxaemia⁶. However, in the pulmonary arteries of patients with moderate COPD, an association between endothelial dysfunction⁶, structural changes⁷, and the presence of an inflammatory infiltrate in the adventitial layer⁸ has been also described.

Recently, morphometric studies carried out on the systemic and pulmonary arteries of patients with mild-moderate COPD have demonstrated a significant correlation between the initial changes that occur in the walls of both systemic and pulmonary arteries. These systemic and pulmonary changes are characterised by a thickening of the intima and a decrease in the vascular lumen, which are observed to a greater degree in COPD patients than in smokers without airflow obstruction⁹. To date, the mediators involved in these processes are not well known.

¹Pneumology Research Group, Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge – IDIBELL, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain. ²Department of Respiratory Medicine, Bellvitge University Hospital, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain. ³Department of Clinical Sciences, University of Barcelona, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain. ⁴Research Network in Respiratory Diseases (CIBERES), Madrid, Spain. Elisabet Aliagas and Salud Santos contributed equally. Correspondence and requests for materials should be addressed to E.A. (email: ealiagas@idibell.cat) or S.S. (email: saludsantos@bellvitgehospital.cat)

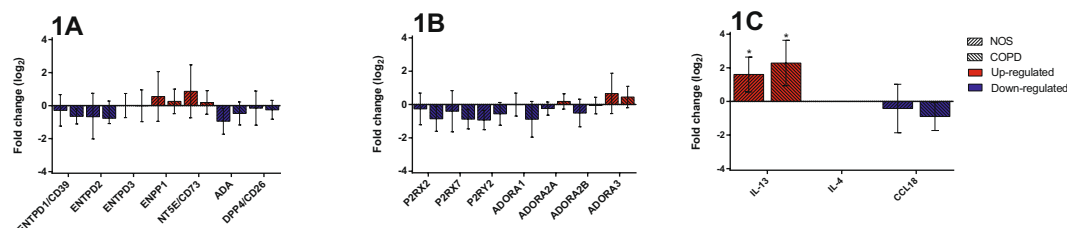


Figure 1. Gene expression analyses in the lung. Changes in the mRNA expression of genes for: NOS vs. NS and COPD vs. NS. Results are expressed as fold change ($\log_2$) relative to NS. Bar plots represent median $\pm$ $\log_2$ of RQmax and $\log_2$ of RQmin. **(A)** The expression of *ENTPD1*, *ENTPD2*, *ADA* and *DPP4* was downregulated in NOS and COPD patients. *ENPP1* expression was upregulated in NOS and COPD patients while *NT5E* expression was upregulated in NOS and unchanged in COPD. No changes were found in *ENTPD3* expression. **(B)** *P2RX2*, *P2RX7* and *P2RY2* expression was downregulated in COPD patients and NOS as well as the expression of *ADORA1* in COPD patients. *ADORA2A* and *ADORA2B* expression levels were similar to NS in both groups. *ADORA3* expression in NOS and COPD patients along with *ADORA2A* expression in COPD patients was upregulated. No changes were found in *ADORA1* expression in NOS. **(C)** *IL-13* expression was upregulated whereas *CCL18* expression was downregulated in NOS and COPD patients. No expression of *IL-4* was found. *Significantly different from NS ($p < 0.05$).

Numerous studies have indicated that purinergic signalling plays a major role in the development of COPD^{10–12} and in the vascular remodelling that occurs in other disorders like idiopathic pulmonary fibrosis¹³. Purinergic signalling involves purines (ATP and its hydrolysis products) and pyrimidines (mainly UTP) that act as extracellular ligands for the widely-expressed purinergic receptors, P2 (activated by nucleoside tri-/diphosphates among others) and P1 (activated by adenosine and others)¹⁴. It is well known that ATP and adenosine levels are increased in the lungs of COPD patients^{15,16}, which could be associated with COPD development. Extracellular levels of ATP and adenosine are controlled by membrane proteins called ectonucleotidases, which include four families: the ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase (ENTPDase) family, the ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase (ENPP) family, the alkaline phosphatase (AP) family, and the 5'-nucleotidase family, of which only one member (NT5E/CD73) is expressed on the membrane¹⁷.

The present study explored the expression of the genes involved in purinergic signalling and inflammation in the lung and vascular systemic tissues of never smokers (NS), non-obstructed smokers (NOS) and stable COPD patients. We performed quantitative real-time PCR on peripheral lung tissue and intercostal arteries (representative systemic vascular tissue) to examine the expression of 17 genes of interest.

Results

Gene expression studies in the lungs of NOS and COPD patients compared to NS. *Gene expression of ATP-degrading enzymes and DPP4.* The gene expression of ATP-degrading enzymes and DPP4, which binds adenosine deaminase (ADA), is shown in Fig. 1A. All the ATP-degrading enzymes studied (*ENTPD1*, *ENTPD2* and *ENTPD3*) showed a similar expression pattern in both NOS and COPD patients, with decreases in *ENTPD1* and *ENTPD2* expression and no changes in *ENTPD3* expression. *ENPP1* expression was upregulated, while the gene expression of the adenosine-producing enzyme NT5E/CD73 was up to one-fold higher in NOS, but unchanged in COPD patients. *ADA* and *DPP4* expression was downregulated in both NOS and COPD patients.

Gene expression of P1 and P2 receptors. The gene expression of the purinergic P1 and P2 receptors is shown in Fig. 1B. In the lungs of NOS and COPD patients, gene expression of all the ATP receptors studied (*P2RX2*, *P2RX7* and *P2RY2*) was downregulated. In the case of adenosine receptors, *ADORA1* expression was downregulated only in COPD patients, while *ADORA3* expression was upregulated in both groups. *ADORA2A* and *ADORA2B* expression in NOS and COPD patients was similar to that in NS.

Expression of the genes associated with inflammation. Among the three genes encoding inflammatory molecules (*IL-13*, *IL-4* and *CCL18*) that were analysed in pulmonary tissue (Fig. 1C), only *IL-13* expression showed significant changes, as expected, with increases observed in both NOS and COPD patients. *IL-4* expression was not amplified probably due to the lack of tissue expression. *CCL18* expression was decreased in NOS and COPD patients compared to NS.

Gene expression studies in the intercostal arteries of NOS and COPD patients compared to NS. *Gene expression of ATP-degrading enzymes and DPP4.* Similar patterns of gene expression of the ATP-degrading enzymes were found in the intercostal arteries compared to pulmonary tissue (Fig. 2A). *ENTPD1*, *ENTPD2* and *ENTPD3* expression was downregulated in NOS, while *ENTPD2* and *ENTPD3* expression was also reduced in COPD patients. As observed in the lung samples, *ENPP1* expression was upregulated in the intercostal arteries of both NOS and COPD patients. *NT5E* expression in the intercostal arteries was upregulated in NOS, as also seen in the lung tissue, but was reduced by up to one-fold in the intercostal arteries of COPD patients, which differed to that observed in the lungs. *ADA* and *DPP4* expression was upregulated in the intercostal arteries of both groups, which was opposite to that observed in the lungs.

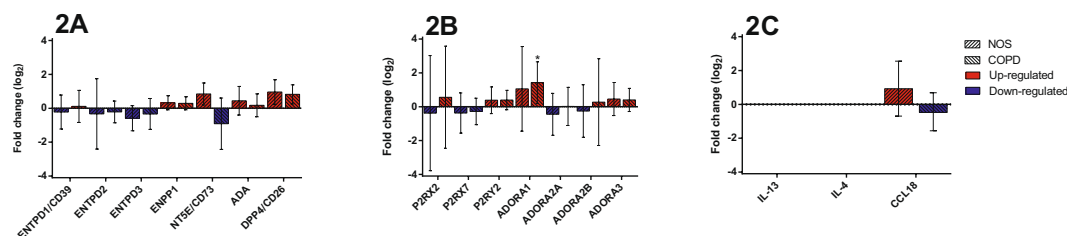


Figure 2. Gene expression studies in the intercostal arteries. Changes in the mRNA expression of genes for: NOS vs. NS and COPD vs. NS. Results are expressed as fold change ($\log_2$) relative to NS. Bar plots represent median $\pm \log_2$ of RQmax and $\log_2$ of RQmin. (A) *ENTPD2* and *ENTPD3* expression was downregulated in NOS and COPD patients, as well as *ENTPD1* in NOS and *NT5E* in COPD patients. *ENPP1*, *ADA* and *DPP4* expression levels were increased in both groups. *ENTPD1* expression in COPD patients and *NT5E* expression in NOS were also upregulated. (B) *P2RX2*, *ADORA2A* and *ADORA2B* expression was downregulated in NOS. *P2RX7* expression was also downregulated in both groups. *P2RY2*, *ADORA1* and *ADORA3* expression in NOS and COPD patients and *P2RX2* and *ADORA2B* expression in COPD patients were also upregulated. No changes were found in *ADORA2A* expression in COPD patients. (C) No expression of *IL-13* or *IL-4* was found. *CCL18* expression was upregulated in NOS and downregulated in COPD patients. *Significantly different from NS ($p < 0.05$).

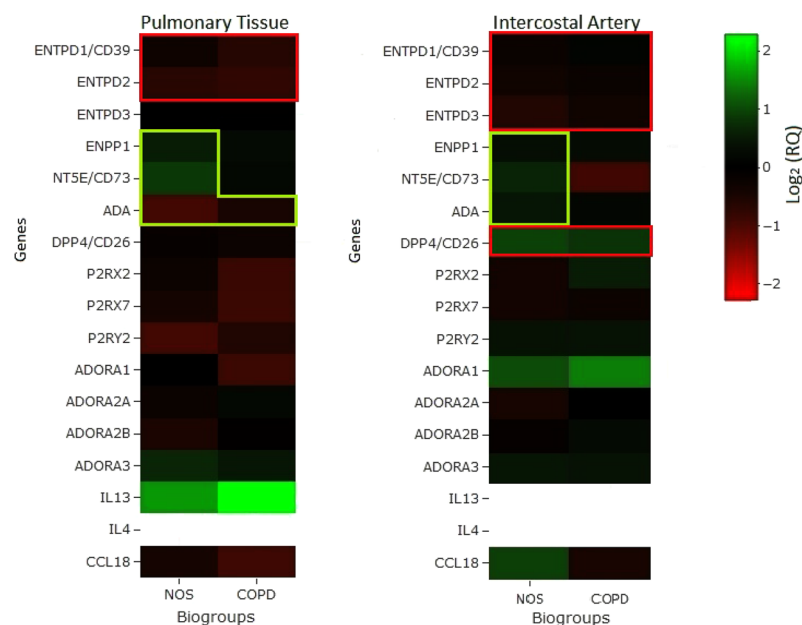


Figure 3. Schematic of the genes associated with purinergic signalling that were analysed. Heat map of the genes over- or underexpressed ($\log_2$ of RQ) in NOS and COPD patients compared to NS. Genes that promote or reduce inflammation are highlighted (red for promotion and green for reduction).

Gene expression of P1 and P2 receptors. The expression patterns of the P1 and P2 receptors differed between the intercostal arteries and pulmonary tissue (Fig. 2B). In the intercostal arteries, *P2RX2* expression was upregulated in COPD patients and downregulated in NOS (*P2RX2* expression was downregulated in the lung tissues of both groups). *P2RX7* expression also differed between the tissues in both groups. Unlike in lung tissue, *P2RY2* expression was upregulated in the intercostal arteries of both groups. Whereas *ADORA1* expression was downregulated in the lung samples of COPD patients, it was upregulated by up to one-fold in the intercostal arteries of both groups, this being significant for the COPD patients when compared to NS. There were no major differences in the expression levels of *ADORA2A*, *ADORA2B* and *ADORA3* between the tissues.

Expression of the genes associated with inflammation. *IL-13* and *IL-4* expression was not amplified in the intercostal arteries, probably due to a lack of expression in these tissues (Fig. 2C). In NOS, *CCL18* expression differed between the intercostal arteries and lung tissue, being upregulated by up to one-fold in the intercostal arteries (Fig. 2C).

Figure 3 summarises the main and most interesting results in the format of a heat map. To facilitate the understanding of our findings regarding the enzymes associated with purinergic signalling and their relationship with inflammation, we have highlighted the genes that promote or reduce inflammation.

	Pulmonary tissue	<i>p</i> -value	IC arteries	<i>p</i> -value
	Fold change (log ₂)		Fold change (log ₂)	
Membrane purinergic degrading enzymes				
ENTPD1/CD39	−0.366	0.458	0.332	0.608
ENTPD2	−0.129	0.861	0.116	0.902
ENTPD3	−0.009	0.987	0.253	0.627
ENPP1	−0.295	0.705	−0.032	0.906
NT5E/CD73	−0.671	0.386	−1.561	0.139
Soluble purinergic degrading enzyme				
ADA	0.472	0.330	−0.268	0.595
ADA receptor				
DPP4/CD26	−0.103	0.850	−0.137	0.745
P2 receptors				
P2RX2	−0.597	0.288	0.938	0.404
P2RX7	−0.472	0.461	0.093	0.884
P2RY2	0.374	0.366	0.010	0.983
P1 receptors				
ADORA1	−0.881	0.136	0.366	0.702
ADORA2A	0.429	0.129	0.471	0.487
ADORA2B	0.452	0.314	0.397	0.818
ADORA3	−0.211	0.739	−0.056	0.920
Inflammatory genes				
IL-13	0.684	0.356	—	—
IL-4	—	—	—	—
CCL18	−0.474	0.539	−1.365	0.121

Table 1. Changes in gene expression in COPD patients compared to NOS.

No significant differences were found in the expression of the purinergic pathway genes in lung or intercostal artery after adjusting for sex and diabetes. Furthermore, to analyse potential susceptibility according to gender, independently of tobacco consumption, we compared the gene expression specifically in the non-smoker group and found no significant differences ($p > 0.05$) in the expression of purinergic pathway genes.

Comparison of gene expression levels in the lung and intercostal arteries between COPD patients and NOS. Changes in the gene expression levels in pulmonary tissue and intercostal arteries in COPD patients compared to NOS are shown in Table 1. All the ATP-degrading enzymes studied were downregulated in the lung, but upregulated or unaffected in the intercostal arteries of COPD patients compared to NOS. *NT5E* expression was downregulated in both tissues, while *ADA* expression was upregulated in the lung and downregulated in the intercostal arteries.

In the lung, *P2RX2*, *P2RX7*, *ADORA1* and *ADORA3* expression levels were downregulated, while *P2RY2*, *ADORA2A* and *ADORA2B* expression was upregulated. In the intercostal arteries, all the genes for the P1 and P2 receptors, except *ADORA3*, were upregulated. Regarding the genes associated with inflammation, *IL-13* expression was upregulated in pulmonary tissue, but not expressed in the intercostal arteries. *IL-4* expression was not observed in the lung or intercostal arteries. *CCL18* expression was downregulated in both tissues.

Discussion

The focus of our study was to characterise the expression patterns of the genes associated with purinergic signalling in the early phases of COPD. We also compared gene expression between pulmonary tissue and systemic arteries from the same patients to identify the mechanisms that initiate and perpetuate this disease and detect any potential molecules involved with the systemic vascular changes observed in COPD. This is the first study to explore the expression of the genes associated with purinergic signalling in the lung and systemic arteries of COPD patients using TaqMan low-density arrays.

Our results suggest that the downregulation of ATP-degrading and adenosine-producing enzymes in the lung and intercostal arteries could produce a pro-inflammatory state in COPD patients compared to NOS. Although ATP-degrading enzymes are also downregulated in both tissues in NOS, adenosine-generating enzymes are upregulated (Figs 1A and 2A), suggesting a compensatory mechanism that exists only in NOS. We found an imbalance between the enzymes regulating extracellular ATP and adenosine levels in the early stages of COPD that favoured ATP accumulation (acting as a pro-inflammatory molecule through the P2 receptors) and lowered adenosine levels (acting as anti-inflammatory molecules through the P1 receptors), possibly causing the overall pulmonary inflammation¹⁸. This imbalance could be overcome in NOS by an enhanced expression of *NT5E*, which encodes the main enzyme (CD73) regulating extracellular adenosine levels. Figure 4 summarizes all this information and represents the possible molecular mechanism in which changes in the expression of purinergic signalling genes favour the accumulation of extracellular ATP that may promote inflammation in COPD patients.

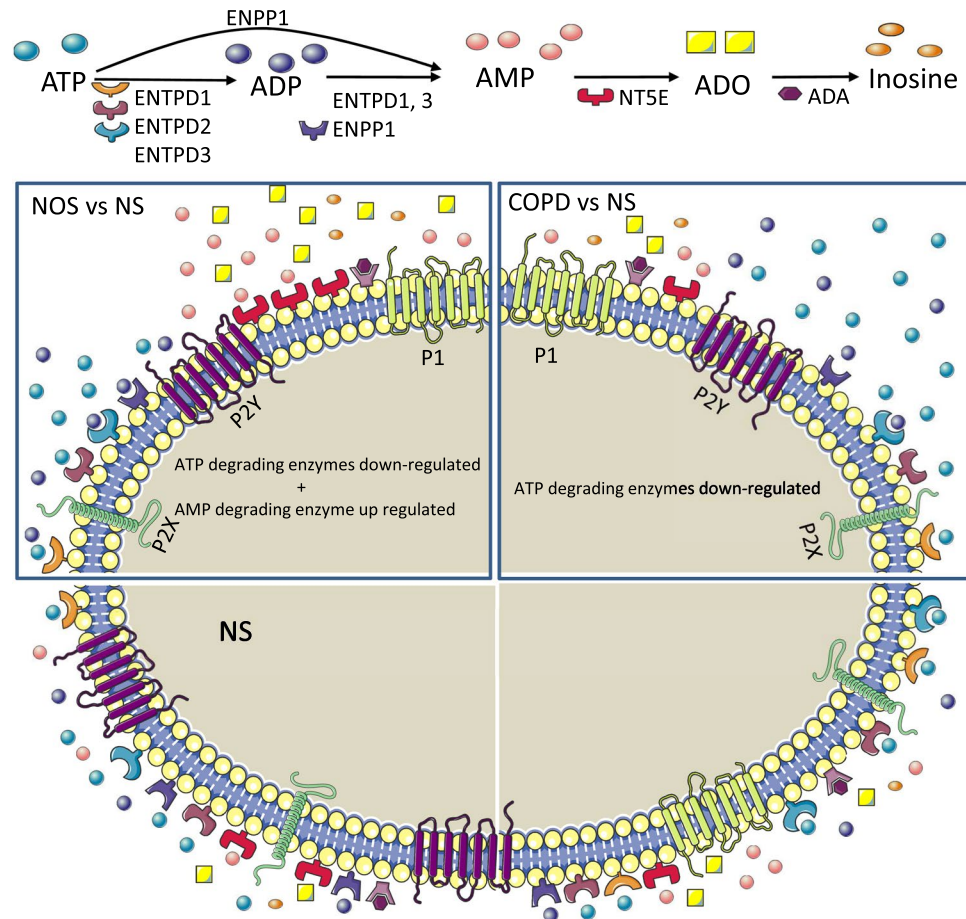


Figure 4. Graphic image representation of the possible mechanisms of lung inflammation in COPD involving purinergic signaling pathway. See text for details and further information (second paragraph of the discussion section). Pro-inflammatory molecules: ATP and derivatives (dark and light blue and pink circles). Anti-inflammatory molecules: adenosine (yellow square). The figure was created using Servier Medical Art according to a Creative Commons Attribution 3.0 Unported License guidelines 3.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>). Simplification and colour changes were made to the original cartoons.

By contrast, NOS balanced the levels of extracellular pro-and anti-inflammatory molecules through the increase of NT5E/CD73 expression.

Previous studies have shown that tobacco induces an accumulation of extracellular ATP in the human respiratory tract, leading to high ATP concentrations in COPD patients, even after smoking cessation¹⁹. By activating P2 receptors, ATP induces macrophages and neutrophils to secrete pro-inflammatory molecules and the mediators of tissue degradation, thus contributing to the chronic inflammation characteristic of COPD¹⁵. Extracellular adenosine levels are also increased in the lungs of patients with severe COPD. In accordance with this, previous studies have shown that the enzymatic activity of NT5E/CD73 is increased in the lung tissue of patients with severe COPD compared to smokers with mild obstruction²⁰. In addition, COPD patients with acute exacerbations have decreased ADA enzymatic activity (inactivates adenosine), thus favouring its extracellular accumulation²¹. Adenosine has immunomodulatory functions; thus, its role may be important in COPD. In fact, adenosine receptors have been proposed as possible therapeutic targets in the treatment of COPD²². However, all the studies to date have focused on the advanced stages of the disease (GOLD stages III and IV) to assess the roles of ATP and adenosine in the pathophysiology of COPD. Given the dual role of adenosine depending on the situation, i.e., acting as an anti-inflammatory molecule in processes associated with acute lung diseases^{23,24} or as a pro-inflammatory agent with tissue remodeling functions in chronic lung diseases²⁵, it is important to distinguish between the early and late stages of COPD when determining the role of adenosine in this disease. Furthermore, some adenosine receptors also act as anti- or pro-inflammatory molecules depending on the stages (acute or chronic) of lung injury during which they are activated²⁶.

As seen in Fig. 3, NOS expressed more genes favouring a non-inflammatory state than COPD patients in both pulmonary and systemic tissues when compared to NS. The downregulated ectonucleotidases play a larger role in inflammation secondary to tobacco in the lung than in the arterial tissue of the same patients. This observation is in line with the previous studies of our group demonstrating an underexpression of ENTPDase1/CD39 in the lungs of COPD patients²⁷. NT5E/CD73, which is expressed less in the lungs of COPD patients than NOS, is

Parameters	NS (n = 16)	NOS (n = 17)	COPD (n = 21) GOLD I/II/III: 14/5/2	p-value
Gender, female/male	11/5	0/17	2/19	<0.0001
Age, years	61.7 ± 12.1	61.6 ± 11.1	62.8 ± 8.5	0.928
BMI, kg/m ²	27 ± 4.2	27.8 ± 4.4	25.7 ± 4.6	0.342
Smoking history, pack/years	—	38.9 ± 4.4	48 ± 3.5	0.113
Current smokers, n (%)	—	9 (52.9)	5 (23.8)	0.067
HTA, n (%)	4 (25)	8 (47.1)	9 (42.9)	0.384
DLP, n (%)	8 (50)	9 (52.9)	11 (52.4)	0.984
DM, n (%)	0 (0)	8 (47)	1 (4.8)	<0.0001
FVC, % predicted	113.8 ± 21	99.4 ± 16.6	89.8 ± 14.1	<0.001
FEV ₁ , % predicted	110.1 ± 20.3	95.4 ± 14.5	67 ± 15.7	<0.001
FEV ₁ /FVC, %	77.4 ± 5.6	76 ± 5.1	56.2 ± 11.4	<0.001
D _{LCO} , % predicted	93.6 ± 18	87.2 ± 17.3	69.5 ± 14.7	<0.001
Fibrinogen, g/L	3.1 ± 1.3	3.2 ± 1	3.2 ± 0.9	0.937
Leukocytes, cells/mm ³	6.8 ± 1.5	8.3 ± 1.9	8.7 ± 1.8	<0.05
Eosinophils, cells/mm ³	134.4 ± 54	84.1 ± 42.7	116.2 ± 73	0.056
CRP, mg/L	3.6 ± 5	6.8 ± 10.2	8 ± 11.2	0.463
Cholesterol, mmol/L	4.7 ± 1	4.4 ± 0.8	4.5 ± 0.9	0.582

Table 2. Clinical parameters and lung function measurements of the subjects. Data are presented as mean ± SD. BMI, body mass index; HTA, arterial hypertension; DLP, dyslipidaemia; DM, diabetes mellitus; FVC, forced vital capacity; FEV₁, forced expiratory volume in first second; D_{LCO}, diffusing capacity for carbon monoxide; CRP, C-reactive protein.

markedly decreased in systemic arteries. NT5E/CD73 has been reported to play an important anti-inflammatory role that is associated with anti-fibrotic activity and a reduced production of pro-inflammatory cytokines in the aortic artery, most likely by activating adenosine A2a receptors²⁸. This would be interesting to investigate further in future studies assessing the role of CD73 in cardiovascular risk.

Classically, the inflammation leading to COPD has been described as a type I inflammation predominantly involving neutrophils. In line with this, the inflammatory parameters analysed in our patients, such as C-reactive protein (CRP) and leukocyte blood counts, were higher in COPD patients than NOS, even though these differences were not significant (Table 2). However, new evidence has emerged that type 2 or eosinophilic inflammation also plays a role in some COPD patients^{29,30}. For this reason, we decided to analyse both *IL-13* and *IL-4* gene expression as they are involved in eosinophilic inflammation. Our results on *IL-13* expression in lung tissue provide a plausible explanation for why NOS show less inflammation than patients with moderate COPD (Fig. 1C). We analysed *IL-4* and *IL-13* expression to determine the type of inflammatory response elicited in our COPD patients. *IL-13* expression was significantly elevated in the pulmonary tissues of NOS and COPD patients, suggesting a Th2-derived inflammatory response (Fig. 1C). *IL-13* was not expressed in the intercostal arteries of NOS or COPD patients, suggesting that this type of inflammation is not relevant in the initial systemic vascular changes in smokers and patients with moderate COPD. As for *IL-4*, we could not assess any amplification of this gene in the lung or intercostal arteries (Figs 1C and 2C). We were not able to determine if this was because there was no expression or whether this was due to methodological issues. *CCL18*, a chemokine involved in vascular changes³¹, showed reduced expression in the lungs and systemic arteries of COPD patients. Other studies have shown a similar gene expression pattern of *CCL18* in COPD patients and smokers³¹.

There were differences in purinergic signalling between patients with moderate COPD and NOS. However, other studies have found some similarities in the expression profiles of other genes between patients with moderate COPD and NOS, which have not been observed in patients with severe COPD³². For this reason, we believe that this study should be complemented with future studies investigating pulmonary levels of ATP and adenosine and the genetic expression of purinergic signalling enzymes in patients with severe COPD (GOLD stages III and IV) too.

This study had several strengths and limitations. Performing a genetic analysis on patients in the early stages of COPD enabled us to check for disease-initiating mechanisms that are more difficult to detect at later stages of the disease. Nevertheless, it has to be pointed out that this is an exploratory study to generate new hypotheses about the pathophysiological changes that occur in the first steps of COPD. Almost none of the *p*-values of the results comparing gene expression levels between the groups were statistically significant, probably because of the exploratory nature of the study and/or the small number of patients included. The study population had primary treatable lung cancer and, therefore, lung cancer could have been a possible introduced bias. However, we assumed that any bias introduced would have been the same for all the subjects. Moreover, this was the only way of obtaining fresh tissue samples from the patients along with clinical and functional data.

In summary, this preliminary study suggests that the expression patterns of different extracellular ATP-degrading enzymes are altered in a manner that promotes inflammation in both NOS and patients with early COPD, with a compensatory mechanism possibly occurring only in NOS. *ENTPD1*, *ENTPD2* and *NT5E* might be relevant in the pathophysiology of COPD. Future studies are needed to confirm this hypothesis.

Gene symbol	Gene name	Assay ID
Membrane purinergic degrading enzymes		
<i>ENTPD1/CD39</i>	Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1	Hs00969559_m1
<i>ENTPD2</i>	Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 2	Hs00993193_g1
<i>ENTPD3</i>	Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 3	Hs00154325_m1
<i>ENPP1</i>	Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1	Hs01054040_m1
<i>NT5E/CD73</i>	5'-nucleotidase ecto	Hs04234687_m1
Soluble purinergic degrading enzyme		
<i>ADA</i>	Adenosine deaminase	Hs01113256_g1
ADA receptor		
<i>DPP4/CD26</i>	Dipeptidyl peptidase 4	Hs00897386_m1
P2 receptors		
<i>P2RX2</i>	Purinergic receptor P2X2	Hs04176268_g1
<i>P2RX7</i>	Purinergic receptor P2X7	Hs00951607_m1
<i>P2RY2</i>	Purinergic receptor P2Y2	Hs04176264_s1
P1 receptors		
<i>ADORA1</i>	Adenosine A1 receptor	Hs00379752_m1
<i>ADORA2A</i>	Adenosine A2a receptor	Hs00169123_m1
<i>ADORA2B</i>	Adenosine A2b receptor	Hs00386497_m1
<i>ADORA3</i>	Adenosine A3 receptor	Hs04194761_s1
Inflammatory genes		
<i>IL-13</i>	Interleukin 13	Hs01124272_g1
<i>IL-4</i>	Interleukin 4	Hs00929862_m1
<i>CCL18</i>	C-C motif chemokine ligand 18/PARC	Hs00268113_m1

Table 3. List of genes analysed in the study.

Materials and Methods

Subjects. Fifty-four patients who underwent a lobectomy or pneumonectomy of a solitary pulmonary nodule at Bellvitge University Hospital were included in this study. Demographic, clinical and pre-operative pulmonary function assessment (spirometry, lung volumes and carbon monoxide diffusing capacity) data were collected for all the subjects before surgery. None of the patients presented severe systemic comorbidities, atelectasis or obstructive pneumonitis. Moreover, they had not received chemotherapy or radiotherapy prior to surgery. According to their previous smoking history and the results of the pulmonary function tests, subjects were classified as follows: 16 never smokers (NS), 17 non-obstructed smokers (NOS) and 21 stable COPD patients. COPD was diagnosed based on current GOLD guidelines³³. In the COPD group, most of the patients had early stages of disease (14 GOLD I and five GOLD II). All the participants signed an informed consent in accordance with the principles outlined in the Declaration of Helsinki. The study was approved by the local ethics committee (CEIC, ref. PR330/15). General characteristics and lung function measurements of the three groups are summarised in Table 2.

Sample collection and processing. The samples used in this study were obtained and processed as previously described⁹. They have been used in previous studies published by our research group^{9,27,31}.

RNA processing. Total RNA was isolated and purified as previously described^{27,31}.

TaqMan low-density arrays. Gene expression analysis was performed by real-time PCR using Custom TaqMan low-density arrays (TLDA; Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The 17 genes analysed in this study are listed in Table 3, classified by their functional groups. One µg of total RNA was retrotranscribed into cDNA using the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). Before performing PCR, cDNA was pre-amplified using Custom TaqMan PreAmp Pools, following the manufacturer's protocol (Applied Biosystems). PCR reactions were prepared with the TaqMan Gene Expression Master Mix, following the manufacturer's protocol (Applied Biosystems), and samples were run in triplicate on an ABI Prism 7900HT Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Data were collected using SDS Software version 2.4 (Applied Biosystems) and used for subsequent analysis.

Gene expression analysis. Data analysis was performed using the Relative Quantification application module on the Thermo Fisher Cloud online software (<https://www.thermofisher.com/es/es/home/cloud.html>). Relative quantification (RQ) was based on the comparative cycle threshold (Ct) method using *GAPDH* (Hs99999905_m1) as an endogenous control. For differential expression analysis, a limma-modified t-test³⁴ was used to calculate the $\Delta\Delta Ct$ value [$\Delta\Delta Ct = \text{mean } \Delta Ct \text{ value (target samples)} - \text{mean } \Delta Ct \text{ value (control samples)}$]. RQ was calculated from these $\Delta\Delta Ct$ values ($RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$) and used for fold change calculations. Results are expressed as fold changes in logarithms to base 2 ($\log_2$) of the RQ values.

Heat maps were created with the *plotly* and *ggplot2* R packages version 3.5 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria; <https://www.R-project.org/>).

Statistical analysis. Continuous variables were compared by Student's t-test and expressed as mean $\pm$ standard deviation (SD). Qualitative variables were compared with the chi-square test. Comparisons between the groups were evaluated by one-way analysis of variance (ANOVA) and an overall *p*-value was calculated. Adjusted analyses were performed using unbalanced demographic variables (gender and diabetes). Statistical analysis was performed using IBM SPSS version 19.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA). A *p*-value less than 0.05 indicated statistical significance.

References

- Barnes, P. J. Chronic Obstructive Pulmonary Disease: A Growing but Neglected Global Epidemic. *PLoS Med.* **4**, e112 (2007).
- van Eeden, S. F. & Hogg, J. C. The response of human bone marrow to chronic cigarette smoking. *Eur. Respir. J.* **15**, 915–21 (2000).
- Wood, A. M. & Stockley, R. A. The genetics of chronic obstructive pulmonary disease. *Respir. Res.* **7**, 130 (2006).
- MacNee, W. & Tudor, R. M. New paradigms in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease I. *Proc Am Thorac Soc*, <https://doi.org/10.1513/pats.200905-027DS> (2009).
- Sakao, S., Voelkel, N. F. & Tatsumi, K. The vascular bed in COPD: Pulmonary hypertension and pulmonary vascular alterations. *European Respiratory Review*, <https://doi.org/10.1183/09059180.00007913> (2014).
- Peinado, V. I. *et al.* Endothelial dysfunction in pulmonary arteries of patients with mild COPD. *Am. J. Physiol.* (1998).
- Santos, S. *et al.* Characterization of pulmonary vascular remodelling in smokers and patients with mild COPD. *Eur. Respir. J.*, <https://doi.org/10.1183/09031936.02.00245902> (2002).
- Peinado, V. I. *et al.* Inflammatory reaction in pulmonary muscular arteries of patients with mild chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*, <https://doi.org/10.1164/ajrcm.159.5.9807059> (1999).
- Muñoz-Esquerre, M. *et al.* Systemic and pulmonary vascular remodelling in chronic obstructive pulmonary disease. *PLoS One*, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152987> (2016).
- Burnstock, G., Brouns, I., Adriaensen, D. & Timmermans, J.-P. Purinergic Signaling in the Airways. *Pharmacol. Rev.*, <https://doi.org/10.1124/pr.111.005389> (2012).
- Pelleg, A., Schulman, E. S. & Barnes, P. J. Extracellular Adenosine 5'-Triphosphate in Obstructive Airway Diseases. *Chest*, <https://doi.org/10.1016/j.chest.2016.06.045> (2016).
- Mohsenin, A. & Blackburn, M. R. Adenosine signaling in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Current Opinion in Pulmonary Medicine*, <https://doi.org/10.1097/01.mcp.0000199002.46038.cb> (2006).
- Della Latta, V., Cabiati, M., Rocchiccioli, S., Del Ry, S. & Morales, M. A. The role of the adenosinergic system in lung fibrosis. *Pharmacol. Res.*, <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2013.08.004> (2013).
- Burnstock, G. Purine and pyrimidine receptors. *Cellular and Molecular Life Sciences*, <https://doi.org/10.1007/s00018-007-6497-0> (2007).
- Mortaz, E., Folkerts, G., Nijkamp, F. P. & Henricks, P. A. J. ATP and the pathogenesis of COPD. *Eur. J. Pharmacol.*, <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2010.04.019> (2010).
- Esther, C. R., Lazaar, A. L., Bordonali, E., Qaqish, B. & Boucher, R. C. Elevated airway purines in COPD. *Chest*, <https://doi.org/10.1378/chest.10-2471> (2011).
- Yegutkin, G. G. Enzymes involved in metabolism of extracellular nucleotides and nucleosides: Functional implications and measurement of activities. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, <https://doi.org/10.3109/10409238.2014.953627> (2014).
- Faas, M. M., Sáez, T. & de Vos, P. Extracellular ATP and adenosine: The Yin and Yang in immune responses? *Molecular Aspects of Medicine*, <https://doi.org/10.1016/j.mam.2017.01.002> (2017).
- Lommatzsch, M. *et al.* Extracellular adenosine triphosphate and chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, <https://doi.org/10.1164/rccm.200910-1506OC> (2010).
- Zhou, Y., Murthy, J. N., Zeng, D., Belardinelli, L. & Blackburn, M. R. Alterations in adenosine metabolism and signaling in patients with chronic obstructive pulmonary disease and idiopathic pulmonary fibrosis. *PLoS One*, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009224> (2010).
- Goodarzi, M. T., Abdi, M., Tavilani, H., Nadi, E. & Rashidi, M. Adenosine deaminase activity in COPD patients and healthy subjects. *Iran. J. Allergy, Asthma Immunol.*, 09.01/ijaa.712 (2010).
- Polosa, R. & Blackburn, M. R. Adenosine receptors as targets for therapeutic intervention in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Trends in Pharmacological Sciences*, <https://doi.org/10.1016/j.tips.2009.07.005> (2009).
- Haskó, G. & Pacher, P. A_{2A} receptors in inflammation and injury: lessons learned from transgenic animals. *J. Leukoc. Biol.*, <https://doi.org/10.1189/jlb.0607359> (2008).
- Cronstein, B. N. Adenosine, an endogenous anti-inflammatory agent. *J. Appl. Physiol.* (1994).
- Blackburn, M. R. Too much of a good thing: Adenosine overload in adenosine-deaminase-deficient mice. *Trends in Pharmacological Sciences*, [https://doi.org/10.1016/S0165-6147\(02\)00045-7](https://doi.org/10.1016/S0165-6147(02)00045-7) (2003).
- Zhou, Y. *et al.* Distinct Roles for the A_{2B} Adenosine Receptor in Acute and Chronic Stages of Bleomycin-Induced Lung Injury. *J. Immunol.*, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1002907> (2011).
- Aliagas, E. *et al.* Is the purinergic pathway involved in the pathology of COPD? Decreased lung CD39 expression at initial stages of COPD. *Respir. Res.*, <https://doi.org/10.1186/s12931-018-0793-0> (2018).
- Quast, C., Alter, C., Ding, Z., Borg, N. & Schrader, J. Adenosine Formed by CD73 on T Cells Inhibits Cardiac Inflammation and Fibrosis and Preserves Contractile Function in Transverse Aortic Constriction-Induced Heart Failure. *Circ. Hear. Fail.*, <https://doi.org/10.1161/CIRCHEARTFAILURE.116.003346> (2017).
- Saha, S. & Brightling, C. E. Eosinophilic airway inflammation in COPD. *International journal of chronic obstructive pulmonary disease*, <https://doi.org/10.2147/copd.2006.1.1.39> (2006).
- Saetta, M. *et al.* Airway eosinophilia in chronic bronchitis during exacerbations. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, <https://doi.org/10.1164/ajrcm.150.6.7952628> (1994).
- Muñoz-Esquerre, M. *et al.* Vascular disease in COPD: Systemic and pulmonary expression of PARC (Pulmonary and Activation-Regulated Chemokine). *PLoS One*, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177218> (2017).
- Linàs, L. *et al.* Similar gene expression profiles in smokers and patients with moderate COPD. *Pulm. Pharmacol. Ther.*, <https://doi.org/10.1016/j.pupt.2010.10.010> (2011).
- GOLD. Gold 2017. *Glob. Initiative Chronic Obstr. Lung Dis.*, <https://doi.org/10.1164/rccm.201701-0218PP> (2017).
- Smyth, G. K., Yang, Y. H. & Speed, T. Statistical Issues in cDNA Microarray Data Analysis. *Funct. genomics Methods Protoc.*, <https://doi.org/10.1385/1-59259-364-X:111> (2003).

Acknowledgements

We thank Ms. María José Manuel and Ms. Montserrat Navarro from the COPD Unit of Bellvitge University Hospital for their help with subject recruitment. We also thank the thoracic surgery team and pathologists of Bellvitge University Hospital for their assistance in sample collection, the Centres Científics i Tecnològics at the University of Barcelona for their technical assistance, and Anna Carrera-Salinas for her assistance in developing the heat maps. We acknowledge the CERCA Programme/Generalitat de Catalunya for institutional support. The research was funded by Instituto de Salud Carlos III through the grant PI16/00193 (co-funded by the European

Regional Development Fund (ERDF) 'A Way to Build Europe', as well as by grants from Menarini and SEPAR (Grant SEPAR 067/2015). E. Cuevas received a post-MIR C. Recerca grant from Bellvitge University Hospital.

Author Contributions

O.C. participated in sample processing, TLDA experiments, data analysis, statistical analysis and figure preparation. E.C. participated in subject recruitment and data analysis. M.M.-E. performed the subject recruitment, participated in sample collection and performed sample processing. M.L.-S. participated in subject recruitment, sample collection and sample processing. Y.P.-G. participated in subject recruitment and data analysis. J.D. participated in subject recruitment, interpreting the results and providing a critical review of the manuscript for important intellectual content. E.A. is the co-corresponding author who contributed to the design of the study, sample processing and TLDA experiments, as well as being involved in obtaining funding, data interpretation, manuscript drafting, and critically reviewing the manuscript for important intellectual content. S.S. is the corresponding author who contributed to the study concept and design, as well as being involved in obtaining funding, study supervision, data interpretation, manuscript drafting, and critically reviewing the manuscript for important intellectual content. All authors have read and approved the final manuscript.

Additional Information

Competing Interests: The authors declare no competing interests.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2019

Article 2: Effect of a soluble guanylate cyclase stimulator on the purinergic pathway in an animal model of emphysema induced by cigarette smoke

Ester Cuevas, Elisabet Aliagas, Tanja Paul, Yuliana Pascual-González, Marta López-Sánchez, Joan Albert Barberà, Víctor Ivo Peinado, Salud Santos

Purinergic Pathway. Q3 (under review)

Resum: Les vies de senyalització purinèrgica i de l'òxid nítric (NO) semblen estar implicades en el desenvolupament de l'emfisema i la remodelació vascular de la malaltia pulmonar obstructiva crònica (MPOC). Estudis prèvis han demostrat que l'administració d'un estimulador de la de guanilat ciclase soluble (sGC) en un model animal prevé el desenvolupament d'emfisema.

Mètodes: S'avalua l'expressió gènica i proteica d'ENTPD1/CD39 i NT5E/CD73, i l'efecte d'un estimulador de sGC sobre la seva expressió en quaranta-dos conillets d'índies que van ser exposats a placebo (SHAM) o al fum de tabac (CS) de tres a sis mesos. Es van dividir en sis grups (exposició placebo, fumadors o ex-fumadors) i es van tractar amb un vehicle (VH) o BAY 41-2272 (estimulador GC) durant tres mesos. Es van realitzar assajos d'immunohistoquímica, Western blot i qPCR en mostres de teixit pulmonar.

Resultats: La quantificació relativa de l'expressió gènica de ENTPD1 i NT5E respecte al grup control (SHAM + VH) va mostrar una reducció d'ambdós enzims en el grup CS + VH (1 ± 0 vs. $0,78 \pm 0,51$, $p > 0,05$ i 1 ± 0 vs. $0,45 \pm 0,27$, $p = 0,027$ respectivament). El tractament amb BAY 41-2272 va augmentar l'expressió ENTPD1 i NT5E a $1,06 \pm 0,4$ i $0,71 \pm 0,35$, respectivament. No s'han trobat canvis significatius en el grup Ex-CS+BAY. L'anàlisi de l'expressió proteica d'aquests enzims, va en línia amb aquestes troballes.

Conclusions: El tractament amb un estimulador de sGC va mostrar tendència a restaurar l'expressió gènica i proteica d'ENTPD1/CD39 i NT5E/CD73 en animals exposats al fum, fet que suggeriria un potencial mecanisme d'acció de sGC a través de la via purinèrgica en aquest model i determina una interacció entre ambdues vies de senyalització.

EFFECT OF A SOLUBLE GUANYLATE CYCLASE STIMULATOR ON THE PURINERGIC PATHWAY IN AN ANIMAL MODEL OF EMPHYSEMA INDUCED BY CIGARETTE SMOKE

Ester Cuevas^{1,2,3}, Elisabet Aliagas^{1,3}, Tanja Paul^{4,5}, Yuliana Pascual-González^{1,2,3}, Marta López-Sánchez^{1,2,3}, Joan Albert Barberà^{4,5}, Víctor Ivo Peinado^{4,5*}, Salud Santos^{1,2,3,5*}

1. Pulmonology Research Group, Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge – IDIBELL, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain.

2. Department of Pulmonary Medicine, Bellvitge University Hospital, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain.

3. Department of Clinical Sciences, University of Barcelona, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain.

4. Department of Pulmonary Medicine, Hospital Clínic, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer, University of Barcelona, Barcelona, Spain.

5. Biomedical Research Networking Center in Respiratory Diseases (CIBERES), Madrid, Spain.

***Correspondence to:**

Salud Santos, MD, PhD, E-mail: saludsantos@bellvitgehospital.cat

Víctor Ivo Peinado, PhD, E-mail: vpeinado@clinic.cat

Abstract:

Purinergic and nitric oxide (NO) signaling pathways appear to be involved in the development of emphysema and vascular remodeling of chronic obstructive pulmonary disease (COPD).

In an animal model, we evaluate the gene and protein expression of *ENTPD1*/CD39 and *NT5E*/CD73, and the effect on this expression of a guanylate cyclase (GC) stimulator. Forty-two guinea pigs underwent sham exposure (SHAM) or cigarette smoke (CS) exposure from three to six months. They were divided into six groups (sham-exposed, smokers or former smokers) and treated with vehicle (VH) or BAY 41-2272 (GC stimulator) for three months. Immunohistochemistry, western blot and qPCR assays were performed on lung tissue samples.

Compared to SHAM+VH, *ENTPD1* and *NT5E* were downregulated in the CS+VH group (1 ± 0 vs. 0.78 ± 0.51 , $p > 0.05$, and 1 ± 0 vs. 0.45 ± 0.27 , $p = 0.027$ respectively). Treatment with BAY 41-2272 increased *ENTPD1* and *NT5E* expression to 1.06 ± 0.4 and 0.71 ± 0.35 , respectively. No changes in the Ex-CS+BAY group were found. *NT5E*/CD73 was downregulated in the lungs of an animal model of emphysema.

Treatment with a soluble GC stimulator tended to restore the gene and protein expression of *ENTPD1*/CD39 and *NT5E*/CD73 in smoke-exposed animals, suggesting an interaction between both pathways and a new prevention mechanism in the development of emphysema.

Keywords: COPD, purinergic signaling, nitric oxide signaling, vascular remodeling, inflammation.

1. Introduction

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is characterized by chronic inflammation in the small airways. It causes structural changes in the bronchus and vessels, as well as systemic manifestations, leading to the development of comorbidities [1–3]. Exposure to cigarette smoke (CS) is the major risk factor, but host genetic factors, immune dysregulation or alterations in repair mechanisms can also lead to the development of COPD [4, 5].

Purinergic signaling appears to be involved in the pathogenesis of COPD, since extracellular ATP can promote the chronic inflammation that characterizes the disease [6–11]. Different families of hydrolysing enzymes, alone or acting sequentially, are responsible for hydrolysing ATP into adenosine diphosphate (ADP) and adenosine monophosphate (AMP); the NTPDase1/CD39 ectoenzyme is the most frequently expressed in human lungs [11]. Finally, Ecto-5'-NT/CD73 dephosphorylates AMP, generating adenosine [12].

An association has been observed between extracellular ATP levels in plasma samples and the patient's condition, quality of life and disease progression, suggesting that extracellular ATP could be a possible

diagnostic or prognostic biomarker [13]. Moreover, a previous study demonstrated that CD39 deficiency induces the progression of emphysema and lung inflammation in mice, and that the administration of an external functional NTPDase1/CD39 analogue (apyrase) can limit their development [14]. Furthermore, reduced expression and activity of NTPDase1/CD39 and differences in the expression of genes in the purinergic pathway have been described in the lung tissues of moderate-mild stable COPD patients compared to non-smokers [15, 16], suggesting that this may be a mechanism that underlies the development of COPD. COPD is associated with early vascular changes in pulmonary arteries. It is well established that patients can develop pulmonary hypertension due to vascular remodeling, emphysema and chronic hypoxemia in the advanced stages of COPD [17–20]. Nitric oxide (NO) signaling is involved in many physiological processes, such as vascular homeostasis, through its ability to stimulate soluble guanylate cyclase (sGC) [21, 22]. NO signaling is altered in COPD patients, with a downregulation of sGC expression in the lungs correlating with disease severity [23, 24]. Interestingly, chronic administration of the sGC stimulators BAY 41-2272 and BAY 63-2521 in guinea pigs (GP) and mice respectively prevented vessel remodeling and emphysema [24]. Although additional studies demonstrated that sGC stimulation in GPs prevented the oxidative stress induced by CS and attenuated inflammatory responses in the lung [25], the molecular mechanisms underlying the reduction in emphysema in this animal model were not fully clarified [26]. We hypothesized that one of the mechanisms involved in this improvement might be related to the restoration of purinergic enzyme levels.

Accordingly, the aims of this study were to evaluate the gene and protein expression of *ENTPD1*/CD39 and *NT5E*/CD73, the main enzymes involved in purinergic signaling, in lung samples from our previous animal model of CS-induced emphysema, and to analyse the potential effect of BAY 41-2272 (which stimulates sGC) on their expression [26].

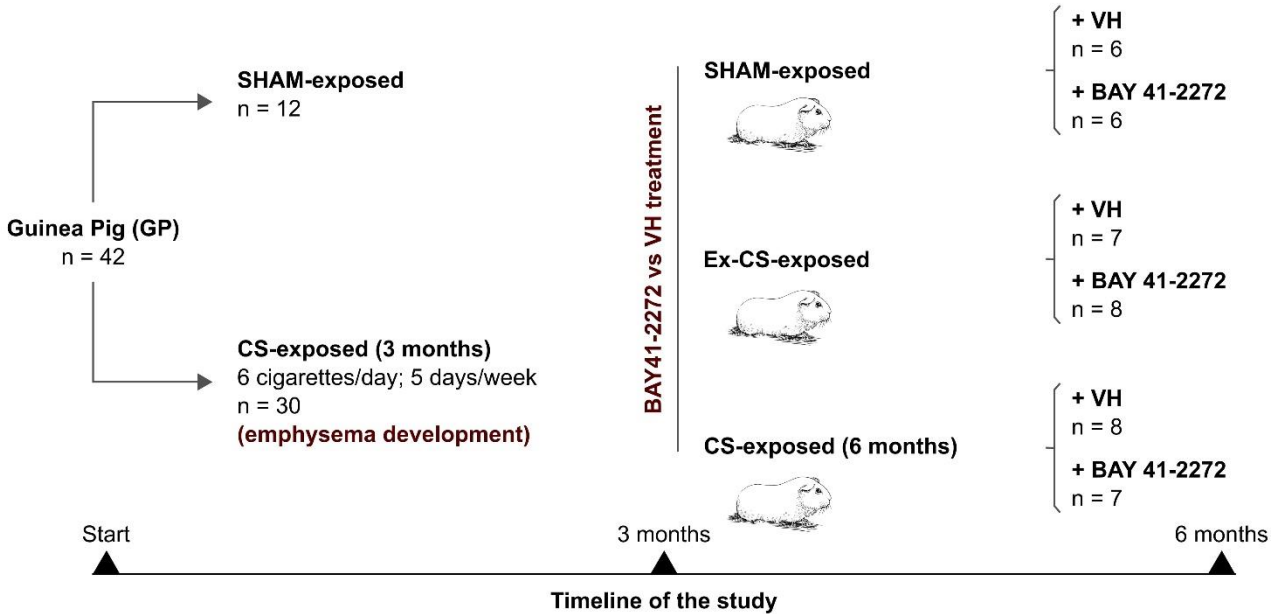
2. Materials and Methods

2.1 Animal model and samples

Lung samples from animals from our previously established animal model of emphysema induced by CS were used in this study [26]. Briefly, Dunkin Hartley guinea pigs (GPs) were sham-exposed (control group) or exposed to CS (smokers, or the CS group) for a total of six months, or exposed to CS for three months before sham exposure for another three months (former smokers, or the Ex-CS group) (Figure 1). From the third to the sixth month, animals were daily treated with a vehicle (VH) or BAY 41-2272 (an sGC stimulator) (at a dose of 3 mg/kg administered by oral gavage) and divided into six groups: (1) sham-exposed treated with a vehicle (SHAM + VH; n = 6); (2) sham-exposed treated with BAY 41-2272 (SHAM + BAY; n = 6); (3) former smokers treated with a vehicle (Ex-CS + VH; n = 7); (4) former smokers treated with BAY 41-2272 (Ex-CS + BAY; n = 8); (5) smokers treated with a vehicle (CS + VH; n = 8); and (6) smokers treated with BAY 41-2272 (CS + BAY; n =

7). At the end of the experiment, animals were euthanized and the lungs (n = 42) were removed and processed for histological, protein and RNA studies following standard protocols. All procedures were approved by the local ethics committee for animal experimentation of the University of Barcelona (registry: 2009/5026).

Figure 1. Study design and groups. CS, cigarette smoke; Ex-CS, former smoker; VH, vehicle. Adapted from Paul et al. [26].



2.2 Quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) analysis of *ENTPD1* and *NT5E*

Quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) was performed as previously described [15]. Custom TaqMan gene expression assays (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) for guinea pig *ENTPD1* and *NT5E* were designed as follows: for *ENTPD1* gene, forward primer, 5'-CTTCATCTGGGAACCCATTCTT-3', reverse primer, 5'-GTTAATGTCTGCTTTATGCTTGGATCTT-3' and probe, 5'-CAGGAATGCTGGTATTTAG-3'; and for *NT5E* gene, forward primer, 5'-CTTCATCTGGGAACCCATTCTT-3'; reverse primer, 5'-GTTAATGTCTGCTTTATGCTTGGATCTT3' and probe, 5'-TCTAAATACCAGCATTCTGAAGAT-3'. GAPDH (Cp03755742_g1, Thermo Fisher Scientific) was used as endogenous control for normalization. Data are expressed as a relative quantification (fold change ratio) of mRNA.

2.3 Western blot for NTPDase1/CD39 and Ecto-5'-NT/CD73

Briefly, 20-μg of protein was loaded onto pre-cast 4-20% Mini-Protean TGX stain free gels (Bio-Rad, Hemel Hempstead, Great Britain) for electrophoresis and then transferred onto nitrocellulose membranes (Bio-Rad). Membranes were blocked with 5% non-fat milk (Nestle, Vevey, Switzerland) in tris-buffered saline

(TBS) containing 0.1% Tween® 20 (TBS-T) at pH 7.4, for 1 hour at room temperature (RT). Anti-CD73 (ab175396) or anti-CD39 (ab178572) primary antibodies (1/1000) were incubated overnight at 4°C. After 3 washes with TBS-T, the appropriate secondary antibody horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit or anti-mouse (1/8000; Sigma-Aldrich) was incubated at RT for 1 hour. Immunoreactive bands were detected using ECL Select™ Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare, Chicago, Illinois) and digitized using the ChemiDoc™ Touch Imaging System (Bio-Rad). Band density was quantified by densitometry using Image J software 2.1 and normalized to β -actin levels (4970L, Cell Signalling).

2.4 Immunohistochemistry for NTPDase1/CD39 and Ecto-5'-NT/CD73

The procedure used for the immunohistochemistry was performed as previously described [16]. Briefly, formalin-fixed, paraffin-embedded lung section were underwent dewaxing, dehydration, antigen retrieval, and quenching of endogenous peroxidase activity. After three rinses in phosphate buffered saline (PBS), tissue sections were pre-incubated for 1 hour at room temperature in 10% normal goat serum (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, MO, USA). The following primary antibodies were incubated overnight at 4°C: anti-CD39 antibody [IMG17B5F11] (ab178572) at 1:400 and anti-CD73 antibody (ab175396) at 1:50 (Abcam, Cambridge, UK). Nuclei were counterstained with haematoxylin. Human lung tissue samples were used as positive control. The intensity of the labeling in the samples from the parenchyma, bronchus and pulmonary arteries was semi-quantitatively evaluated by two investigators blinded to study conditions following a visual scale previously defined as negative (–), weak (+), intermediate (++), or strongly positive (+++).

2.5 Lung morphometry and inflammatory cells

For the purposes of correlation only, in this study we used previously published data on emphysema and inflammatory cells [26]. Emphysema was assessed by histological hematoxylin staining, measuring the mean linear intercept (MLI). Inflammatory cells (intra-septal neutrophils and alveolar macrophages) were counted on histological sections. The methodology used for lung histological assessments has been described elsewhere [24].

2.6 Statistical analysis

Gene expression data are shown as means $\pm$ standard deviations (SD) and were statistically analysed by two-way analysis of variance (ANOVA), considering CS exposure and treatment with BAY 41-2272 as independent factors. If necessary, the data were transformed to natural logarithm to achieve normal distribution. Comparisons between the groups were evaluated by one-way ANOVA or the Kruskal-Wallis test, as appropriate, and an overall p-value was calculated. Chi² test was used for qualitative variables. Spearman's correlation was also used to assess the relationship between morphometry, inflammatory cells in the lungs

and *ENTPD1* and *NT5E* gene expression. Statistical analysis was performed using IBM SPSS version 19.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA). A p-value < 0.05 was considered statistically significant.

3. Results

3.1 *ENTPD1* and *NT5E* gene expression in lung samples

The relative expression (RQ) of *ENTPD1* and *NT5E* per group is detailed in Table 1 and Figure 2. Compared to the control group (SHAM + VH), only the expression of *NT5E* was downregulated in the group exposed to CS for six months (CS + VH) (1 ± 0 vs. 0.45 ± 0.27 , $p = 0.027$). In the CS + BAY group, after sGC stimulation, the expression levels of *NT5E* increased to 0.71 ± 0.35 , bringing them closer to those of the control group. *NT5E* gene expression trended to be also downregulated in the group of former smokers (1 ± 0 vs. 0.66 ± 0.25) compared to the control group and did not change after treatment with BAY 41-2272 (0.63 ± 0.33). *ENTPD1* gene expression did not vary between the control and the Ex-CS + VH and CS + VH groups and its expression remained stable after treatment with BAY 41-2272.

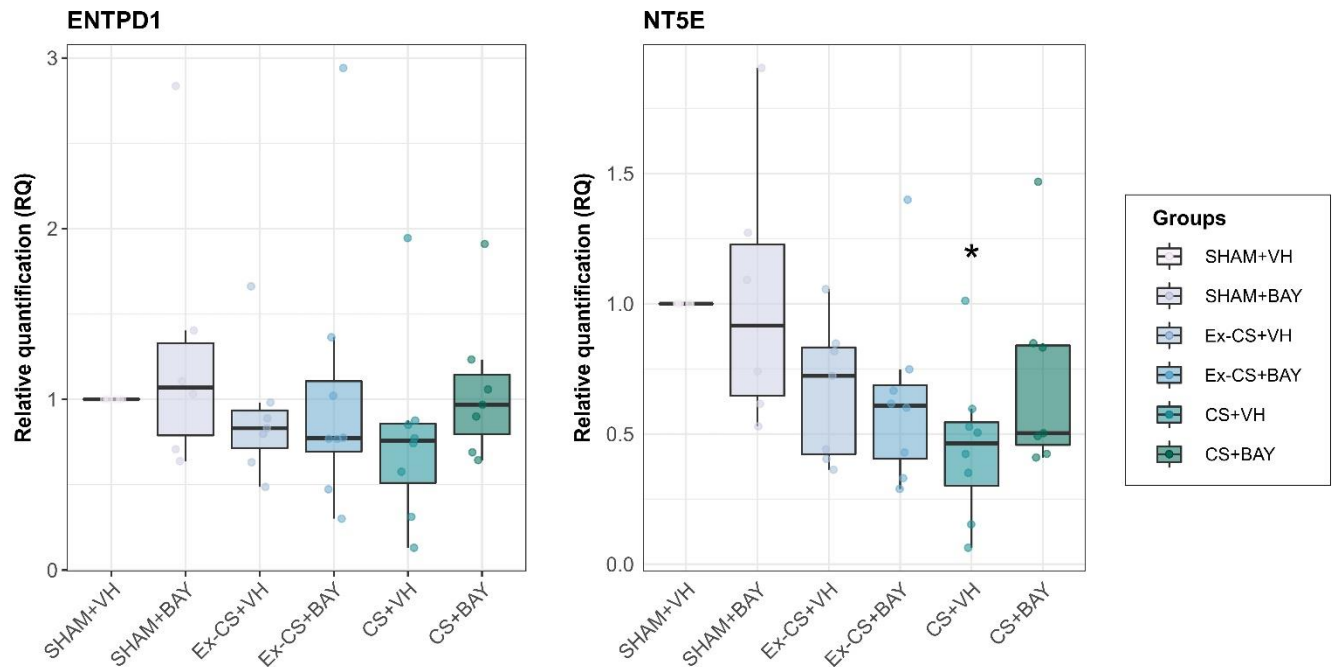
A significant decrease in the expression of *NT5E* in relation to tobacco was observed (two-way ANOVA, $p = 0.007$). The expression of *ENTPD1* was not significantly decreased by the tobacco factor ($p = 0.35$), but a numerical trend was observed. The two-way ANOVA did not show a statistically significant effect of the BAY treatment on the gene expression.

Table 1. Gene expression of *ENTPD1* and *NT5E* in guinea pigs exposed to cigarette smoke or sham and with or without treatment with BAY 41-2272, a stimulator of soluble guanylate cyclase. Relative expression (RQ) compared to the control SHAM + VH group. * $p < 0.05$.

	<i>ENTPD1</i>	<i>NT5E</i>
	RQ $\pm$ SD	RQ $\pm$ SD
SHAM + VH (n=6)	1 ± 0	1 ± 0
SHAM + BAY (n=6)	1.29 ± 0.74	1.03 ± 0.47
Ex-CS + VH (n=7)	0.9 ± 0.35	0.66 ± 0.25
Ex-CS + BAY (n=8)	1.05 ± 0.77	0.63 ± 0.33
CS + VH (n=8)	0.78 ± 0.51	$0.45 \pm 0.27^*$
CS + BAY (n=7)	1.06 ± 0.4	0.71 ± 0.35

Figure 2. Gene expression of *ENTPD1* and *NT5E* in CS and Ex-CS guinea pigs with or without BAY 41-2272 treatment compared to the control group (SHAM + VH). Differences between groups were evaluated using the Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparison tests, in which six conditions were simultaneously tested. P values were considered significant when the mean differed from control (SHAM+VH) group (* $p < 0.05$).

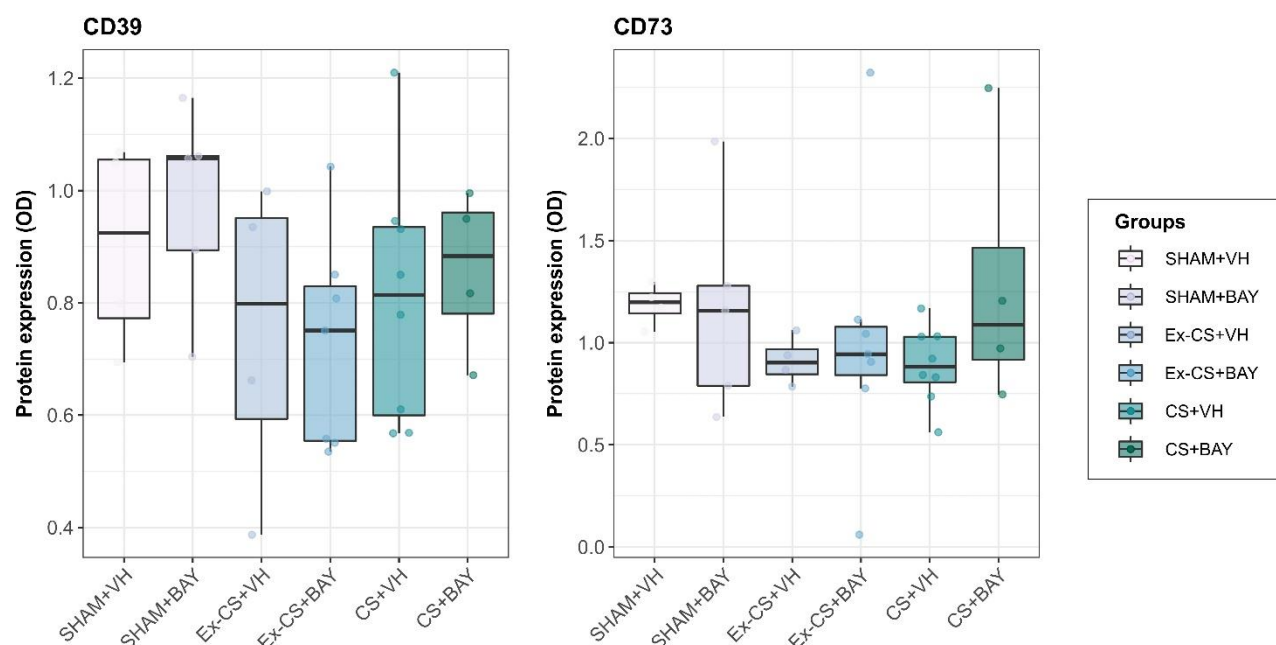
0.05). Compared to the control group (SHAM + VH), only the expression of *NT5E* was downregulated in the group exposed to CS for six months (CS + VH). Each box plot shows the median, upper and lower quartiles (boxes) and the 1.5 x IQR (inter-quartile range) values (vertical lines) for each group.



3.2 Western blot of NTPDase1/CD39 and Ecto-5'-NT/CD73 in GP lung samples

Western blot assays were performed in order to evaluate NTPDase1/CD39 and Ecto-5'-NT/CD73 expression in GP lung samples. The expression of CD39 and CD73 statistically did not differ between the group exposed to CS for three and six months and the control group. After sGC stimulation, the expression levels of CD73 increased bringing them closer to the control group and even higher for the CS+BAY group (figure 3).

Figure 3. Protein expression analysis of NTPDase1/CD39 and Ecto-5'-NT/CD73 in CS and Ex-CS guinea pigs with or without BAY 41-2272 treatment compared to the control group (SHAM + VH) by western blot. Each box plot shows the median, upper and lower quartiles (boxes) and the 1.5 x IQR (inter-quartile range) values (vertical lines) for each group.



3.3 Immunolabeling of NTPDase1/CD39 and Ecto-5'-NT/CD73 in GP lung samples

NTPDase1/CD39 and Ecto-5'-NT/CD73 were expressed in the lung parenchyma, bronchus and pulmonary arteries. Both proteins were expressed in all the tunics of the pulmonary arteries (endothelial and muscular cells), with no differences observed between them. Therefore, we used the immunoexpression in the muscular layer for our analysis of pulmonary arteries (Table 2). Semiquantitative NTPDase1/CD39 analysis showed that its expression was reduced in the parenchyma in the untreated CS and Ex-CS groups compared to the SHAM + VH group, but not in the bronchus and pulmonary arteries. BAY 41-2272 treatment showed a tendency to raise NTPDase1/CD39 expression in the parenchyma and bronchus of the CS and Ex-CS groups and in the pulmonary arteries of the CS group.

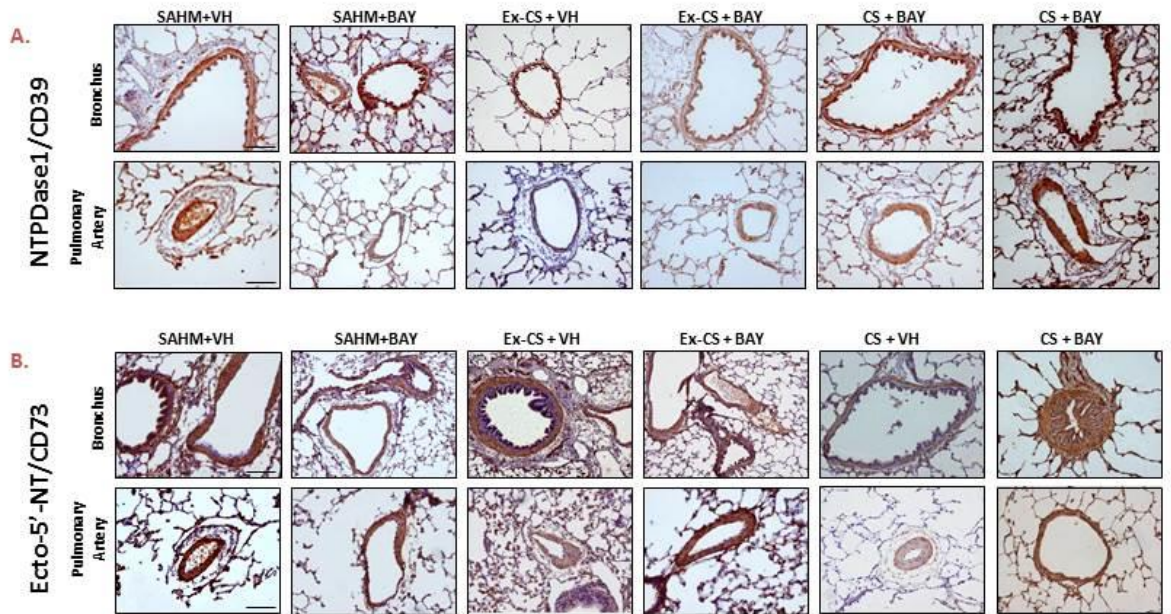
Ecto-5'-NT/CD73 immunolabeling was weaker in the parenchyma, bronchus and pulmonary arteries of the untreated CS and Ex-CS groups compared to the SHAM + VH group. In the control group, BAY 41-2272 treatment enhanced Ecto-5'-NT/CD73 expression in the pulmonary arteries. The lungs of the CS and Ex-CS groups treated with BAY 41-2272 showed increased expression of Ecto-5'-NT/CD73 in all the structures analysed (parenchyma, bronchus and pulmonary arteries) compared to the untreated groups.

No statistically significant differences were found in immunolabeling of NTPDase1/CD39 and Ecto-5'-NT/CD73 in GP lung samples compared to the SHAM + VH group. Representative images of the CD39 and CD73 immunolabeling and the effect of BAY 41-2272 treatment are shown in Figure 4.

Table 2. NTPDase1/CD39 and Ecto-5'-NT/CD73 immunostaining intensity by groups. Data are expressed as n (%). No statistical differences were found between groups (Chi2 test, $p>0.05$).

Parenchyma		SHAM + VH	SHAM BAY	SHAM + BAY	ExCS + VH	ExCS BAY	CS + VH	CS + BAY	Parenchyma		SHAM VH	SHAM + BAY	SHAM + BAY	ExCS + VH	ExCS BAY	CS + VH	CS + BAY
		N = 6	N = 6	N = 6	N = 7	N = 8	N = 8	N = 7			N = 5	N = 6	N = 6	N = 7	N = 8	N = 8	N = 7
+++		4 (66.67%)	1 (16.67%)	1 (16.67%)	1 (14.29%)	2 (25%)	0 (0%)	3 (42.86%)	+++		3 (60%)	3 (50%)	3 (50%)	2 (28.6%)	4 (50%)	2 (25%)	3 (42.9%)
++		1 (16.67%)	2 (33.33%)	2 (33.33%)	3 (42.85%)	6 (75%)	5 (62.5%)	2 (28.58%)	++		2 (40%)	3 (50%)	3 (50%)	4 (57.1%)	2 (25%)	2 (25%)	2 (28.6%)
+		1 (16.67%)	3 (50%)	3 (50%)	3 (42.86%)	0 (0%)	2 (25%)	2 (28.58%)	+		0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (14.3%)	2 (25%)	2 (25%)	1 (14.3%)
-							1 (12.5%)		-							2 (25%)	1 (14.3%)
Bronchus		SHAM + VH	SHAM BAY	SHAM + BAY	ExCS + VH	ExCS BAY	CS + VH	CS + BAY	Bronchus		SHAM VH	SHAM + BAY	SHAM + BAY	ExCS + VH	ExCS BAY	CS + VH	CS + BAY
		N = 6	N = 6	N = 6	N = 7	N = 8	N = 8	N = 7			N = 5	N = 6	N = 6	N = 7	N = 8	N = 8	N = 7
+++		3 (50%)	4 (66.67%)	4 (66.67%)	5 (71.43%)	7 (87.5%)	5 (62.5%)	5 (71.43%)	+++		4 (80%)	5 (83.3%)	5 (83.3%)	2 (28.6%)	5 (63%)	1 (13%)	2 (28.6%)
++		3 (50%)	2 (33.33%)	2 (33.33%)	1 (14.29%)	1 (12.5%)	3 (37.5%)	1 (14.29%)	++		1 (20%)			4 (57.1%)	3 (37%)	5 (63%)	3 (42.9%)
+		0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (14.29)	0 (0%)	0 (0%)	1 (14.29%)	+		0 (0%)	1 (16.7%)	1 (16.7%)	1 (14.3%)	0 (0%)	1 (13%)	2 (28.6%)
-									-							1 (13%)	
Pulmonary artery		SHAM + VH	SHAM BAY	SHAM + BAY	ExCS + VH	ExCS BAY	CS + VH	CS + BAY	Pulmonary artery		SHAM VH	SHAM + BAY	SHAM + BAY	ExCS + VH	ExCS BAY	CS + VH	CS + BAY
		N = 6	N = 6	N = 6	N = 7	N = 8	N = 8	N = 7			N = 5	N = 6	N = 6	N = 7	N = 8	N = 8	N = 7
+++		1 (16.67%)	2 (33.33%)	2 (33.33%)	3 (42.86%)	1 (12.5%)	0 (0%)	3 (42.86)	+++		2 (40%)	5 (83.3%)	5 (83.3%)	2 (28.6%)	5 (63%)	1 (12%)	1 (14.3%)
++		4 (66.67%)	2 (33.33%)	2 (33.33%)	3 (42.86%)	7 (87.5%)	6 (75%)	2 (28.58%)	++		3 (60%)			4 (57.1%)	3 (37%)	5 (63%)	4 (57.1%)
+		1 (16.67%)	2 (33.33%)	2 (33.33%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (25%)	2 (28.58%)	+		0 (0%)	1 (16.7%)	1 (16.7%)	1 (14.3%)	0 (0%)	2 (25%)	2 (28.6%)
-									-								

Figure 4. NTPDase1/CD39 (4A) and Ecto-5'-NT/CD73 (4B) immunostaining by groups in the bronchus (upper panels) and pulmonary arteries (lower panels) (4A). In the parenchyma, NTPDase1/CD39 expression was decreased in the untreated CS and ex-CS groups compared with control group. Treatment with BAY 41-2272 increased the NTPDase1/CD39 expression in the parenchyma and bronchus of the CS and Ex-Cs groups compared with the control group. In the pulmonary arteries, NTPDase1/CD39 immunolabeling remained unchanged between groups. (4B) Ecto-5'-NT/CD73 expression was weaker in all structures in untreated CS and Ex-CS groups than in with controls; treatment with BAY 41-2272 showed increased expression of Ecto-5'-NT/CD73 in parenchyma, bronchus and pulmonary arteries. Bar size is 100 μ m.



3.4 Morphometry and inflammatory cells in lung samples

Data on lung morphometry and inflammatory infiltrates in this animal model have been previously reported [25]. No significant correlation was found between inflammatory cell counts (macrophages and neutrophils) and the gene expression of *ENTPD1* and *NT5E*, based on the analysis of individual data (data not shown).

4. Discussion

The focus of the present study was to analyse the gene and protein expression of *ENTPD1*/CD39 and *NT5E*/CD73 and the effect of BAY 41-2272, a stimulator of sGC, in lung tissue in an animal model of emphysema. To the best of our knowledge, this is the first study to analyse the effect of an sGC stimulator on the expression of genes and proteins associated with purinergic signaling in experimental COPD.

In our animal model of emphysema, we demonstrated a lower gene expression of both *ENTPD1* and *NT5E* in the lungs of both smokers (CS group) and former smokers (Ex-CS group) compared to the control group (SHAM group). Although our findings were not statistically significant, except for *NT5E* in the CS + VH group, the results are in line with those of other studies indicating that purinergic signaling is involved in the development of COPD. Differences in the expression pattern of certain genes associated with the purinergic pathway have been reported in the lung tissues of COPD patients and smokers without obstruction [15]. These changes may be responsible for the pulmonary inflammation that characterizes this disease.

Our group previously observed reductions in lung expression and activity of CD39 in patients in the initial stages of COPD [16]. Consistent with our findings, Kratzer et al. [27] found a significant downregulation of CD39 in the lungs of rats with emphysema caused by CS exposure. In contrast, other studies have reported an upregulation in CD39 in peripheral blood samples from COPD patients with an acute exacerbation compared to patients with stable COPD and healthy patients [28]. Lazar et al. also found increased cell levels of CD39 in BALF and sputum cells from COPD patients compared to those from smokers and non-smokers [14]. These contradictory findings may be attributable to the differences in the samples used in the studies, or to the fact that patients were at different stages of the disease. The influence on CD39 expression of an acute condition such as a respiratory infection in the exacerbation of COPD or active tobacco consumption may be different from that of chronic lung damage.

The role in COPD of CD73, another key enzyme in purinergic signaling, is still not well understood. Its encoding gene, *NT5E*, seems to be overexpressed in the lungs of smokers without obstruction but not in COPD patients, suggesting that adenosine generated by the hydrolysis of AMP by CD73 may contribute to a decrease in the inflammatory environment in the lungs [15]. These findings for *NT5E*/CD73 support the idea that the upregulation of *ENTPD1*/CD39 and *NT5E*/CD73 could be a compensatory mechanism in acute lung damage (active smoking and acute exacerbation) [15, 16].

Treatment with an sGC stimulator tends to restore the expression of *ENTPD1* in all groups, including the control group (SHAM +VH vs SHAM+BAY), although our study not showed statistically significant differences. Therefore, hypothesis that treatment with BAY 41-2272 could act by enhancing *ENTPD1* expression and could revert the downregulation of *ENTPD1* and *NT5E* observed after CS exposure cannot be confirmed. On the other hand, the effect of BAY 41-2272 treatment on the expression of *NT5E* remains unclear since its expression remained almost unchanged in the SHAM and Ex-CS groups after treatment. In contrast, the expression of *NT5E* was partially restored in the smoker group (CS+VH vs CS+BAY). These differences in *NT5E* may be due to the length of exposure to CS (3 months in Ex-CS group vs 6 months in CS group). The results of the protein expression analysed by immunohistochemistry and western blot were in line with those of the gene expression studies, as the protein expression of NTPDase1/CD39 and Ecto-5'-NT/CD73 increased after treatment with BAY 41-2272.

Treatment with a sGC stimulator has been previously studied in COPD, where it has been shown to reduce oxidative stress and attenuate the inflammatory response in the lungs induced by CS [24–26]. sGC stimulator treatment also has beneficial effects on lung vasculature, reducing pulmonary arterial pressure and right ventricular hypertrophy. Our findings may suggest a new beneficial effect of treatment with an sGC stimulator in COPD that upregulates *ENTPD1*/CD39 and *NT5E*/CD73 expression in lung tissues, thus reducing ATP levels and inflammation. However, further studies of this issue are required.

Data on lung morphometry and inflammatory infiltrates in lung tissue from this animal model have been reported previously [26]. In our study, we failed to find a significant correlation between lung morphometry, inflammatory cell counts and the gene expression of *ENTPD1* and *NT5E* based on the analysis of individual data. However, Paul et al. [26] reported an increase in inflammatory cells in the lung tissue of animals exposed to tobacco smoke which had developed emphysema as well as an inhibitory effect of BAY 41-2272 on inflammatory cell infiltration.

Several studies have described an interaction between nitric oxide (NO) and ATP. For example, Ruiz-Stewart et al. showed that NO and sGC are involved in ATP supply/demand as mediators, with changes in ATP levels regulating NO signaling through sGC [29]. Moreover, ATP and ADP have been shown to induce endothelial nitric oxide synthase (eNOS) via P2 receptors (also involved in the purinergic pathway), increasing NO generation [30].

Although it is not well established how purinergic and NO signaling interact in modulating ATP levels, or whether the two pathways share some signaling mechanisms, our findings suggest that sGC stimulation could activate the purinergic pathway, thereby enhancing *ENTDP1*/CD39

and *NTE5/CD73* expression in lung tissues and consequently reducing ATP levels and leading to a decreased inflammatory environment in COPD. Other ways of measuring ATP levels, such as exhaled breath condensate, have been previously used, but no differences have been found between healthy patients and COPD patients, suggesting that airway ATP levels are under the complex control of multiple factors [31] More studies are required to shed more light on the relationship between the purinergic and NO signaling pathways in COPD.

The main limitation of this study was the large number of groups, which meant that each group produced only a limited number of samples. This made it difficult to draw conclusions about the effect of BAY 41-2272 on the genes and proteins associated with purinergic signaling. Secondly, we only analyzed the gene and protein expression of the main purinergic enzymes. In future work it would be interesting to extend the study to other molecules of the purinergic pathway, using new molecular techniques to better understand the interaction of this complex signalling pathway.

In summary, this study showed a downregulation in the gene expression of *NT5E/CD73* in the lungs of an animal model of CS-induced emphysema, with a guanylate cyclase stimulator that tends to upregulate the expression of *ENTPD1* and *NT5E*, thereby partially reversing the effects of CS. The findings suggest the involvement of a new mechanism in the prevention of emphysema with this treatment. We observed, for the first time, an interaction between the NO and purinergic signaling pathways in COPD. More studies are needed to better understand how the NO and purinergic signaling pathways interact with ATP and inflammation in COPD pathophysiology so as to identify new possible therapeutic strategies.

Author Contributions: **EC:** participated in the design of the study, gene expression experiments, immunohistochemistry experiments, data analysis, statistical analysis, figure preparation, manuscript drafting and obtaining funding. **EA:** participated in the gene expression experiments, immunohistochemistry experiments, data analysis, statistical analysis and figure preparation. **TP:** participated in data analysis and interpretation. **YPG:** participated in the data analysis and interpretation. **MLS:** participated in the data analysis and interpretation. **JAB:** participated in the data interpretation and critical revision of the manuscript for important intellectual content. **VIP:** the co-corresponding author contributed to the development of the study, obtaining funding, data analysis and interpretation and critical revision of the manuscript for important intellectual content. **SS:** the corresponding author contributed

to the development of the study concept and design, obtaining funding, study supervision, data interpretation, manuscript drafting, and critical revision of the manuscript for important intellectual content. All the authors have read and approved the final manuscript.

Funding: The research was funded by the Instituto de Salud Carlos III through the grant PI16/00193, PI16/01147 and PI17/01515 (co-funded by the European Regional Development Fund (ERDF) 'A Way to Build Europe'), as well as by grants from Menarini and SEPAR (Grant SEPAR 067/2015 and SEPAR 888/2019) and an unrestricted educational grant from Bayer AG. E. Cuevas received a post-MIR C. Recerca grant from Bellvitge University Hospital.

Institutional Review Board Statement: The animal study protocol was approved by the local ethics committee for animal experimentation of the University of Barcelona (registry: 2009/5026).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Acknowledgments: The authors thank Nadia García Lozano and the Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge for their technical assistance. We also acknowledge the CERCA Programme/Generalitat de Catalunya for institutional support.

Conflicts of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

References

1. (2020) Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease
2. Barnes PJ, Celli BR (2009) Systemic manifestations and comorbidities of COPD. *European Respiratory Journal* 33:1165–1185
3. Negewo NA, Gibson PG, McDonald VM (2015) COPD and its comorbidities: Impact, measurement and mechanisms. *Respirology* 20:1160–1171
4. Wood AM, Stockley RA (2006) The genetics of chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Res* 7

5. MacNee W, Tudor RM (2009) New paradigms in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease I. In: Proceedings of the American Thoracic Society. Proc Am Thorac Soc, pp 527–531
6. Burnstock G, Brouns I, Adriaensen D, Timmermans JP (2012) Purinergic signaling in the airways. *Pharmacol Rev* 64:834–868
7. Pelleg A, Schulman ES, Barnes PJ (2016) Extracellular Adenosine 5'-Triphosphate in Obstructive Airway Diseases. *Chest* 150:908–915.
<https://doi.org/10.1016/j.chest.2016.06.045>
8. Mortaz E, Folkerts G, Nijkamp FP, Henricks PAJ (2010) ATP and the pathogenesis of COPD. *Eur J Pharmacol* 638:1–4. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2010.04.019>
9. Esther CR, Lazaar AL, Bordonali E, et al (2011) Elevated airway purines in COPD. *Chest* 140:954–960. <https://doi.org/10.1378/chest.10-2471>
10. Lommatzsch M, Cicko S, Müller T, et al (2010) Extracellular adenosine triphosphate and chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 181:928–934.
<https://doi.org/10.1164/rccm.200910-1506OC>
11. Fausther M, Pelletier J, Ribeiro CM, et al (2010) Cystic fibrosis remodels the regulation of purinergic signaling by NTPDase1 (CD39) and NTPDase3. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 298:. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00019.2010>
12. Antonioli L, Pacher P, Vizi ES, Haskó G (2013) CD39 and CD73 in immunity and inflammation. *Trends Mol Med* 19:355–367
13. Hlapčić I, Hulina-Tomašković A, Somborac-Baćura A, et al (2019) Extracellular adenosine triphosphate is associated with airflow limitation severity and symptoms burden in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Sci Rep* 9:.
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-51855-w>
14. Lazar Z, Müllner N, Lucattelli M, et al (2016) NTPDase1/CD39 and aberrant purinergic signalling in the pathogenesis of COPD. *European Respiratory Journal* 47:254–263.
<https://doi.org/10.1183/13993003.02144-2014>
15. Careta O, Cuevas E, Muñoz-Esquerre M, et al (2019) Imbalance in the Expression of Genes Associated with Purinergic Signalling in the Lung and Systemic Arteries of COPD Patients. *Sci Rep* 9:. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39233-y>
16. Aliagas E, Muñoz-Esquerre M, Cuevas E, et al (2018) Is the purinergic pathway involved in the pathology of COPD? Decreased lung CD39 expression at initial stages of COPD. *Respir Res* 19:. <https://doi.org/10.1186/s12931-018-0793-0>
17. Sakao S, Voelkel NF, Tatsumi K (2014) The vascular bed in COPD: Pulmonary hypertension and pulmonary vascular alterations. *European Respiratory Review* 23:350–355
18. Muñoz-Esquerre M, López-Sánchez M, Escobar I, et al (2016) Systemic and pulmonary vascular remodelling in chronic obstructive pulmonary disease. *PLoS One* 11:.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152987>

19. Peinado VI, Barberà JA, Ramírez J, et al (1998) Endothelial dysfunction in pulmonary arteries of patients with mild COPD. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 274:. <https://doi.org/10.1152/ajplung.1998.274.6.I908>
20. Santos S, Peinado VI, Ramírez J, et al (2002) Characterization of pulmonary vascular remodelling in smokers and patients with mild COPD. *European Respiratory Journal* 19:632–638. <https://doi.org/10.1183/09031936.02.00245902>
21. Ghimire K, Altmann HM, Straub AC, Isenberg JS (2017) Nitric oxide: What's new to NO? *Am J Physiol Cell Physiol* 312:C254–C262. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00315.2016>
22. Gerassimou C, Kotanidou A, Zhou Z, et al (2007) Regulation of the expression of soluble guanylyl cyclase by reactive oxygen species. *Br J Pharmacol* 150:1084–1091. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707179>
23. Glynos C, Dupont LL, Vassilakopoulos T, et al (2013) The role of soluble Guanylyl Cyclase in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 188:789–799. <https://doi.org/10.1164/rccm.201210-1884OC>
24. Weissmann N, Lobo B, Pichl A, et al (2014) Stimulation of soluble guanylate cyclase prevents cigarette smoke-induced pulmonary hypertension and emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 189:1359–1373. <https://doi.org/10.1164/rccm.201311-2037OC>
25. Paul T, Salazar-Degracia A, Peinado VI, et al (2018) Soluble guanylate cyclase stimulation reduces oxidative stress in experimental Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *PLoS One* 13:. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190628>
26. Paul T, Blanco I, Aguilar D, et al (2019) Therapeutic effects of soluble guanylate cyclase stimulation on pulmonary hemodynamics and emphysema development in guinea pigs chronically exposed to cigarette smoke. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 317:L222–L234. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00399.2018>
27. Kratzer A, Salys J, Sévigny J, et al (2012) Second hand smoke exposure impairs CD39 expression and function in the lung. *European Respiratory Journal* 40:
28. Tan DBA, Ong NE, Zimmermann M, et al (2016) An evaluation of CD39 as a novel immunoregulatory mechanism invoked by COPD. *Hum Immunol* 77:916–920. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2016.07.007>
29. Ruiz-Stewart I, Tiyyagura SR, Lin JE, et al (2004) Guanylyl cyclase is an ATP sensor coupling nitric oxide signaling to cell metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:37–42. <https://doi.org/10.1073/pnas.0305080101>
30. Gonçalves Da Silva C, Specht A, Wegiel B, et al (2009) Mechanism of purinergic activation of endothelial nitric oxide synthase in endothelial cells. *Circulation* 119:871–879. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.108.764571>
31. Lázár Z, Huszár É, Kullmann T, et al (2008) Adenosine triphosphate in exhaled breath condensate of healthy subjects and patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Inflammation Research* 57:. <https://doi.org/10.1007/s00011-008-8009-6>

Article 3. Expression of CD73 ectonucleotidase and inflammatory profile by clinical phenotypes in COPD.

Ester Cuevas, Elisabet Aliagas, Paula Camps, Carmen Lores, Mariana Muñoz-Esquerre, Marta López-Sánchez, Sara Martí Martí, Salud Santos

Sumbitted

Resum: L'ATP extracel·lular s'associa amb la persistència de la inflamació crònica en pacients amb MPOC, especialment en aguditzadors freqüents. L'objectiu va ser analitzar l'expressió de l'ectonucleotidasa CD73 en pacients amb MPOC amb diferents fenotips clínics definits per les aguditzacions i la seva relació amb les principals cèl·lules i citocines inflamatòries.

Mètodes: Es tracta d'un estudi prospectiu i observacional que inclou pacients amb MPOC estable classificats en: aguditzadors (≥ 2 exacerbacions/any) i no aguditzadors. Es van recollir mostres de sang i d'esput tant en condicions estables com durant episodis d'agudització (AMPOC). Es van analitzar citocines i marcadors inflamatoris (IL-6, IL-8, IL-13, TNF α , fibrinogen i PCR) i es va determinar l'expressió proteica de CD73 mitjançant ELISA.

Resultats: Es van incloure un total de 47 pacients (24 aguditzadors i 23 no aguditzadors). Els nivells d'interleucines i de CD73 en sang i esput no va variar significativament entre els dos grups. Durant l'AMPOC, el CD73 sèric dels pacients va disminuir significativament en comparació amb els nivells basals en situació d'estabilitat, però només en els pacients que no rebien tractament crònic amb azitromicina ($n=17$; $p=0.013$), mantenint-se sense canvis significatius en aquells que si es trobaven sota aquest tractament ($n=6$).

Es va observar una correlació positiva entre els nivells de CD73 en esput i l'eosinofília durant l'AMPOC. No es va observar correlació entre CD73 i altres cèl·lules o marcadors inflamatoris.

Conclusions: El perfil inflamatori i els nivells de CD73, basat en el fenotip clínic per aguditzacions, no mostra diferències significatives. Tanmateix, la correlació positiva entre l'enzim CD73 i l'eosinofília podria indicar una potencial implicació de la via

purinèrgica en la inflamació eosinofílica d'aquests pacients. El tractament amb azitromicina podria tenir un efecte immunomodulador en l'agudització de l'MPOC actuant a través de la via purinèrgica.

EXPRESSION OF CD73 ECTONUCLEOTIDASE AND INFLAMMATORY PROFILE BY CLINICAL PHENOTYPES IN COPD.

Ester Cuevas^{1,2,3}, Elisabet Aliagas^{1,3}, Paula Camps^{1,3}, Carmen Lores^{1,2,3}, Mariana Muñoz-Esquerre^{1,2,3}, Marta López-Sánchez^{1,2,3}, Sara Martí Martí^{4,5}, Salud Santos^{1,2,3,5}.

1. Pneumology Research Group, Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge – IDIBELL, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain.

2. Department of Respiratory Medicine, Bellvitge University Hospital, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain.

3. Department of Clinical Sciences, University of Barcelona, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain.

4. Department of Microbiology, Hospital Universitari de Bellvitge, IDIBELL, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

5. Biomedical Research Networking Center in Respiratory Diseases (CIBERES), Madrid, Spain.

Correspondence to:

Salud Santos, MD, PhD

Department of Respiratory Medicine, Bellvitge University Hospital - IDIBELL, University of Barcelona, c/ Feixa Llarga s/n. CP 08907, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain.

Tel.: +34 93 260 76 85; fax: +34 93 260 76 39

E-mail: saludsantos@bellvitgehospital.cat

ABSTRACT

Extracellular ATP from the purinergic pathway is associated with the persistence of chronic inflammation in certain clinical phenotypes of COPD, particularly in frequent exacerbators. The aim of this study was to analyze the expression of the ectonucleotidase CD73 in COPD patients with different clinical phenotypes defined by exacerbations and its relationship with key inflammatory cells and cytokines.

This is a prospective and observational study involving stable COPD patients classified into: exacerbators (≥ 2 exacerbations/year) and non-exacerbators. Blood and sputum samples were collected both during stable conditions and during exacerbation episodes (AECOPD). Cytokines and inflammatory markers (IL-6, IL-8, IL-13, TNF-alpha, fibrinogen, and CRP) were analysed, and CD73 protein expression was determined by ELISA.

A total of 24 exacerbators and 23 non-exacerbators COPD patients were included. CD73 expression in blood and sputum samples did not differ significantly between groups. During AECOPD, serum CD73 decreased compared to the patient's baseline level during the stable phase. There was a trend to higher CD73 expression in sputum at higher eosinophil levels. No correlation was observed between CD73 and other inflammatory markers. A significant decrease in serum CD73 levels during exacerbations was observed in patients without azithromycin treatment compared with those under chronic treatment with azithromycin ($p < 0.013$). In sputum, a greater but not significant decrease in CD73 was observed in patients under azithromycin treatment ($p = 0.064$).

Our findings do not show differences in the inflammatory profile based on the exacerbator phenotype. However, the positive correlation between CD73 and eosinophilia may indicate a potential involvement of the purinergic pathway in eosinophilic inflammation in these patients. Additionally, azithromycin as an immunomodulator treatment could play a role in modulating the purinergic pathway.

Key words: CD73, purinergic signalling, inflammation, eosinophils, COPD, AECOPD.

INTRODUCTION

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is a systemic inflammatory disease in which acute exacerbations have an effect in the natural history of the disease and also impact quality of life and mortality rates [1]. Different interventions to prevent exacerbations are used according to guidelines such as, non-pharmacological measures (quitting smoking, regular exercise...) and pharmacological measures (bronchodilator, inhaled corticosteroid...) [2]. However, up to one third of patients with COPD still suffer AECOPD despite appropriate treatment indicating the existence of different COPD phenotypes [3, 4]. Because of these, new biomarkers and/or therapeutic strategies are needed to improve control and prevent exacerbations in COPD patients.

Different inflammatory phenotypes and endotypes in COPD have been described. COPD inflammation is usually due to neutrophil and macrophage cells [5] but up to 15% of patients with COPD have elevated blood eosinophils [6, 7] and, eosinophilia in COPD seems to be associated with more exacerbations [8]. The role of eosinophils in COPD is still not well understood and therapies such as inhaled corticosteroids and anti-IL5, have minor or insignificant effects in eosinophilic COPD patients compared to asthma patients [9, 10]. Different subpopulations of eosinophils have been described in asthma [11] and recently distinguished between asthma and COPD [12]. These findings, could suggest that eosinophils involved in COPD behave differently from those in asthma, which could explain the differences in patient's treatment responses.

Extracellular adenosine 5- triphosphate (ATP) is involved in the pathogenesis of COPD [13]. ATP is hydrolysed by CD39 to adenosine 5-monophosphate (AMP), and subsequently to adenosine by ecto-5'-nucleotidase / CD73 [14]. In COPD, ATP accumulation induces the recruitment and activation of neutrophils and macrophages in the lung which in turn stimulates the release of pro-inflammatory mediators promoting a pro-inflammatory environment and emphysema [13, 15–17]. An inflammatory environment in COPD, would activate the purinergic signalling including CD39 and CD73, as a way to diminish inflammation. In the last decades, the purinergic pathway has been widely studied in respiratory diseases and also in COPD but, the role of CD73 in COPD is less well known, as it is the second step of ATP hydrolysis [18].

The objective of this study is to analyse and compare the expression of CD73 enzyme in blood and sputum samples in different phenotypes of COPD patients defined by the number of

exacerbations and its relationship with inflammatory cytokines. A secondary objective, is to analyse the possible relationship of CD73 with the etiology of the exacerbation (infectious, inflammatory, heart failure). The findings from this study may contribute to the identification of novel biomarkers and improve the understanding of COPD heterogeneity.

MATERIALS AND METHODS

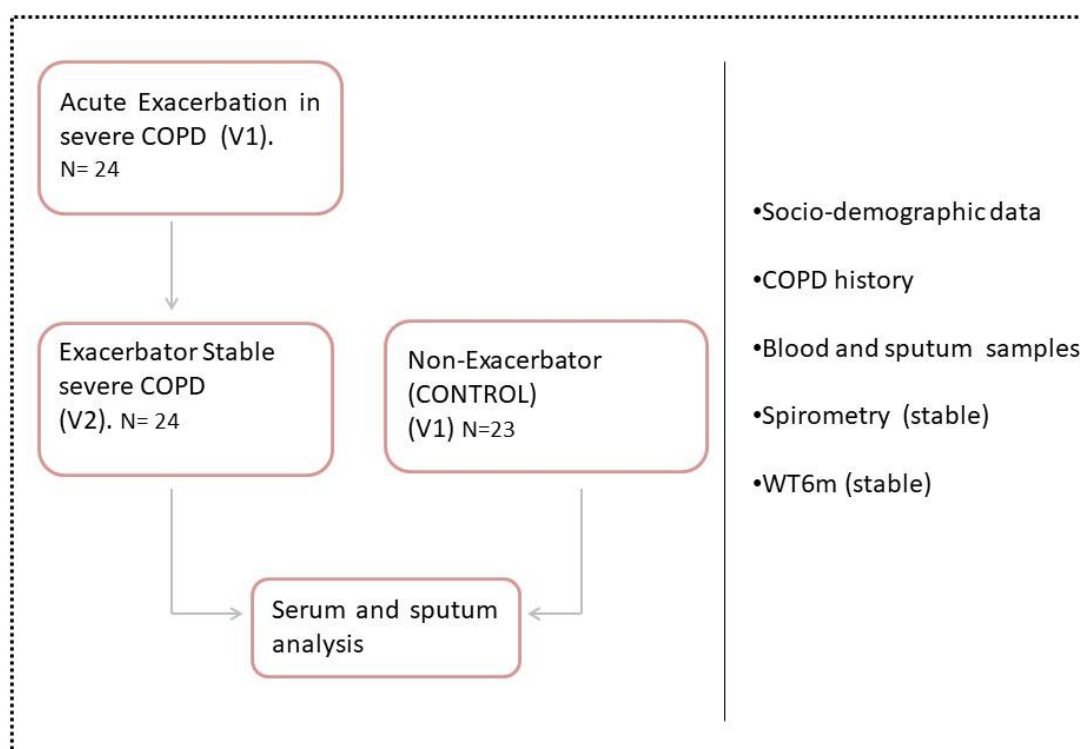
Study population and follow up

This is a prospective and observational study performed in severe COPD patients with different clinical phenotypes based on their exacerbation history. The severity of COPD was defined according to the GOLD guidelines as FEV1/FVC <70% and frequent exacerbations as 2 or more in the last year [19]. Exacerbations were defined as increases in respiratory symptoms that worsen within less than 14 days and may be accompanied by tachypnoea and/or tachycardia and are often associated with increased local and systemic inflammation [20]. Patients were divided into two groups: Exacerbator COPD and Non-Exacerbator COPD.

COPD patients were consequently included from a monographic outpatient clinic of a tertiary hospital. Patients were classified as frequent exacerbators if they had two or more exacerbations in the previous year, and non-frequent exacerbators if they had less than two exacerbations. Blood and sputum samples as well as a functional study (spirometry and WT6m) were performed on all of these patients. All socio-demographic and anthropometric data, COPD history and symptoms test (CAT, mMRC), were assessed at all visits in both groups. In the Exacerbator group, an additional visit during an exacerbation was performed, where sputum and blood samples were also collected (figure 1).

All patients signed an informed consent form in accordance with the principles outlined in the Declaration of Helsinki, and the study was approved by the local ethics committee (CEIC, ref. PR036/18).

Figure1. Study design. COPD: Chronic Obstructive Pulmonary Disease



Sample collection and processing.

Serum: venous blood samples were obtained. After 2 hours at room temperature, they were centrifuged for 15 minutes at 1000. The supernatant was frozen at -80 °C until analysis.

Sputum collection and bacterial load detection: Sputum samples were obtained spontaneously or induced during the exacerbation (AECOPD) before starting any antimicrobial treatment and during a stable situation (in both groups, Exacerbator COPD and Non- Exacerbator COPD). Only good-quality sputum samples were considered (i.e., with 25 leukocytes per low-power field) following the microbiological routine [21]. Briefly, samples were homogenised with dithiothreitol (Sputasol, Oxoid Ltd., Hants, United Kingdom), and plated onto blood agar, chocolate agar, and MacConkey agar before overnight incubation at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere (blood and chocolate agar) or ambient air (MacConkey agar). Bacterial colonies were sub-cultured for identification by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany)

CD73 analysis in serum and sputum.

To measure serum and sputum levels of CD73 commercial Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) kits (ab213761) were used. These procedures were performed according to the

manufacturer's instructions. Results were obtained with a spectrophotometer (length of 450 nm).

Inflammation quantification in serum and sputum samples

Analysis was performed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Cytokine concentrations (IL-4, IL-6, IL-13 and TN α) were measured in serum samples and supernatants of sputum samples using a multiplex immune-bead assay (Milliplex MAP High Sensitivity Human T cell panel Kit; Merck Millipore). All procedures were performed according to the manufacturer's instructions. Results were obtained with a spectrophotometer (length 450 nm).

Other serum inflammatory and cardiac parameters were obtained by the usual laboratory analysis, including leucocytes, neutrophils, eosinophils, troponins, fibrinogen, N-terminal Pro-B type natriuretic peptide (BNP), c reactive protein (CPR).

Statistical analysis

Data are expressed as means $\pm$ standard deviation (SD) or medians [25th–75th percentile] for continuous data and as frequencies (percentage) for categorical data. T-student for independent and paired data (parametric), or Mann–Whitney (non-parametric) tests, applying the Bonferroni method if the Kruskal–Wallis test found significant differences, were used to make comparisons. Statistical analysis was performed using IBM SPSS version 22.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA). A p-value < 0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

Study population.

Forty-seven patients were included: 24 Exacerbator COPD patients, corresponding to group E of the current GOLD classification and 23 non-Exacerbator COPD patients corresponding to groups A-B of the current GOLD classification [19]. The mean age was 68 ± 8 years. Exacerbator COPD phenotype had more airway obstruction (FEV_1 $43.8 \pm 15.9\%$ vs $61.4 \pm 18.8\%$, $p = 0.001$) and a higher score in Modified Medical Research Council (mMRC) dyspnea symptom scale (2 [2-2] vs 1 [1-2] $p = 0.007$) than the Non-Exacerbator COPD phenotype. COPD patients with frequent exacerbations had a severe respiratory disease and a higher risk of mortality than the non-Exacerbator phenotype measured by the BODE (Body Mass Index, Airflow Obstruction, Dyspnoea, and Exercise capacity) score (4 [3-5] vs 1 [1-3], $p < 0.001$) and had more exacerbations per year than the Non- Exacerbator COPD phenotype (3 [2-3] vs 0 [0-0]; $p < 0.001$). At the time

of inclusion, inhaled corticosteroids (ICS) therapy was used in 22 patients (91.7%) in the Exacerbator phenotype and only eight patients (34.8%) in Non-Exacerbator COPD phenotype. PaCO₂ was higher in Exacerbator COPD patients than in Non-Exacerbator COPD patients (44.57 ± 7.35 mmHg vs 40.3 ± 2.62 mmHg; p = 0.06). These results are shown in Table 1.

Table 1. Study population.

	TOTAL, STUDY POPULATION (N=47)	NON-EXACERBATOR COPD (N=23)	EXACERBATOR COPD (STABLE PHASE) (N=24)	p-VALUE
AGE*	67.68 ± 7.94	66.87 ± 6.52	68.46 ± 9.17	0.5
MALE (%)	36 (76.6)	18 (78.26)	18 (75)	1
HYPERTENSION (%)	28 (59.6)	12 (52.17)	16 (66.7)	0.47
DYSLIPIDEMIA (%)	20 (42.6)	8 (34.78)	12 (50)	0.45
DIABETES MELLITUS (%)	13 (27.7)	5 (21.74)	8 (33.33)	0.57
ISCHEMIC HEART DISEASE (%)	11 (23.4)	5 (21.74)	6 (25)	1
BRONCHIECTASIS (%)	23 (50)	12 (52.17)	11 (45.83)	0.77
CHARLSON INDEX*	3.61 ± 1.99	3.78 ± 2.35	3.71 ± 2.05	0.45
SMOKING (%)	46 (97.9)	22 (95.6)	24 (100)	0.48
PACK-YEAR INDEX*	54.18 ± 25.36	56.72 ± 23.45	51.9 ± 26.63	0.43
BMI (kg/m ²)*	27.99 ± 5.12	28.21 ± 5.94	27.58 ± 47.26	0.68
FVC POST-BRONCHODILATOR (L)*	2.72 ± 0.71	2.79 ± 0.68	2.30 ± 0.64	0.016
FVC POST-BRONCHODILATOR (%)*	87.80 ± 20.09	91.44 ± 20.33	76.25 ± 14.24	0.005
FEV1 POST-BRONCHODILATOR (L)*	1.30 ± 0.50	1.40 ± 0.49	1.02 ± 0.45	0.007
FEV1 POST-BRONCHODILATOR (%)*	53.89 ± 18.72	61.39 ± 18.81	43.79 ± 15.92	0.001
FEV1/FVC (%)*	47.87 ± 12.72	51.44 ± 13.81	44.13 ± 10.16	0.046
POSITIVE BRONCHODILATOR RESPONSE (%)*	5 (10.6)	5 (21.73)	2 (8.33)	1
TLC (%)*	120.0 ± 21.54	119 ± 25.84	123.9 ± 19.11	0.47
RV (%)*	176.7 ± 59.59	163.0 ± 53.66	194.4 ± 63.26	0.10
DLCO (%)*	55.69 ± 18.50	63.89 ± 18.17	52.02 ± 14.28	0.01
KCO (%)*	65.68 ± 24.19	73.83 ± 21.30	61.89 ± 21.89	0.068
DYSPNEA (mmRC)*	1.80 ± 0.69	2.52 ± 0.73	3.08 ± 0.50	0.007
NUMBER OF EXACERBATIONS IN THE PAST YEAR*	1.61 ± 1.60	1.43 ± 1.47	3.83 ± 1.13	<0.001
LAMA TREATMENT (%)	43 (91.5)	21 (91.3)	22 (91.67)	1
LABA TREATMENT (%)	44 (93.6)	20 (86.95)	24 (100)	0.11
INHALED CORTICOSTEROIDS TREATMENT (%)	31 (66.0)	8 (34.78)	22 (91.67)	0.008
AZITHROMYCIN TREATMENT (%)	7 (14.9)	0	7 (29.17)	0.009
HOME OXYGEN THERAPY (%)	4 (8.5)	0	4 (16.67)	0.11
DISTANCE 6MWT (m)*	372.45 ± 112.25	401.7 ± 107.23	342.95 ± 108.3	0.38
PaCO ₂ (mmHg)*	42.41 ± 5.86	40.3 ± 2.62	44.57 ± 7.35	0.06
PaO ₂ (mmHg)*	81.95 ± 16.98	80.45 ± 15.90	88.26 ± 21.23	0.66
CARBOXYHEMOGLOBIN (%)*	2.10 ± 1.66	2 ± 1.37	2 ± 1.91	0.98

*Data presented as mean ± standard deviation.
p-value <0.05: statistically significant.

Inflammation and CD73 expression.

Comparing the stable situation (Exacerbator COPD and Non-Exacerbator COPD phenotypes), a significantly higher levels of troponins and fibrinogen in blood samples in Exacerbator-COPD patients (22.5 ± 20.47 vs 12.19 ± 7.26 , $p = 0.036$ and 3.86 ± 0.85 vs 3.28 ± 0.71 ; $p = 0.017$ respectively) was observed. No differences in the white cell count (leucocytes, neutrophils, eosinophils) were observed during stable situation in both groups, but a higher number of total eosinophils was found in the Non-Exacerbator group (238.6 ± 200.2 vs 157.7 ± 127.5 , $p > 0.05$). Inflammatory cytokines didn't show statistically differences between phenotypes (table 2).

For paired data, comparing stable Exacerbator patients vs acute exacerbation, higher levels of leucocytes and neutrophils in patients during the acute exacerbation ($7882,61 \pm 2214,76$ vs $10691,67 \pm 4317$, $p = 0,04$ and 5492 ± 2079.19 vs 11908 ± 16414.63 , $p = 0,02$ respectively) were found (table 2). No differences in the other white cell count were found. Fibrinogen, CRP and NT-proBNP, also had higher levels during AECOPS compared with stable Exacerbator COPD ($3,28 \pm 0,71$ vs $4,97 \pm 1,01$, $p < 0.001$; $5,04 \pm 8,24$ vs $51,88 \pm 54,1$, $p < 0,001$ and $191,48 \pm 291,46$ vs $435,78 \pm 587,72$, $p = 0,006$, respectively). IL-6 was also significantly higher during the acute exacerbation (13.45 ± 16.91 vs 4.42 ± 3.66 ; $p = 0.003$).

In serum, CD73 expression was higher in Exacerbator COPD patients in both situations, during the stable phase and during the acute exacerbation, compared with Non-Exacerbator patients (table 2). However, a decrease in CD73 levels during an acute exacerbation compared with stable Exacerbator patients was observed (2465.7 ± 1625.8 vs 1985.6 ± 1235.5 ; $p > 0.05$).

In sputum, CD73 expression was higher in Exacerbator patients compared with the acute exacerbation (955 ± 815.7 vs 479.7 ± 444.5 ; $p > 0.05$) and Non- Exacerbator patients (955 ± 815.7 vs 650.27 ± 510.8). Otherwise, CD73 expression was lower during the acute exacerbation compared with Non- Exacerbator patients (479.7 ± 444.5 vs 650.27 ± 510.8) (Table 2).

Table 2. Inflammatory markers and CD73 expression in stable COPD (Non-Exacerbator COPD vs Exacerbator COPD phenotypes) and in an acute exacerbation (AECOPD).

CRP: C- reactive protein; NT-proBNP: N-terminal pro-B type natriuretic peptide

STABLE COPD

	Non-Exacerbator COPD	Exacerbator COPD	p- value	AECOPD	p-value ⁺
CD73 SERUM (PG/ML)	3311,2 ± 2714,5	2465,7 ± 1625,78	0,181	1985,6 ± 1235,48	0,296
CD73 SPUTUM (PG/ML)	650,10 ± 510,79	955,3 ± 815,74	0,647	479,7 ± 444,46	0,207
IL-4 (PG/ML)	19,10 ± 25,34	13,5 ± 13,07	0,881	14,39 ± 14,68	0,743
IL-6 (PG/ML)	6,4 ± 5,74	4,42 ± 3,66	0,384	13,45 ± 16,91	0,003
IL -13 (PG/ML)	7 ± 13,48	5,85 ± 8,07	0,373	5,73 ± 6,18	0,750
TNF-A (PG/ML)	14,9 ± 5,3	12,23 ± 5,27	0,817	15,82 ± 6,82	0,935
LEUCOCYTES (CEL/μL)	8095,83 ± 2270,89	7882,61 ± 2214,76	0,75	10691,67 ± 4317	0,004
EOSINOPHILS (CEL/μL)	238,6 ± 200,2	157,7 ± 127,5	0,106	128,6 ± 93,47	0,622
NEUTROPHILS (CEL/μL)	5631 ± 2850, 77	5492 ± 2073,19	0,752	11908 ± 16414,63	0,02
FIBRINOGEN	3,86 ± 0,85	3,28 ± 0,71	0,016	4,97 ± 1,01	<0,001
CRP	8,45 ± 12	5,04 ± 8,24	0,26	51,88 ± 54,1	<0,001
NT-PROBNP	267,58 ± 411,78	191,48 ± 291,46	0,62	435,78 ± 587,72	0,006
TROPONIN	22,5 ± 20,47	12,19 ± 7,26	0,036	25,04 ± 21,09	0,37

* P-VALUE <0,005: STATISTICALLY SIGNIFICANT. T-TEST FOR INDEPENDENT GROUPS (STABLE COPD: NON-EXACERBATOR VS EXACERBATOR COPD)

*P-VALUE: <0,005: STATISTICALLY SIGNIFICANT. PAIRED T-TEST (STABLE EXACERBATOR COPD VS AECOPD)

Correlation analysis between inflammation parameters and CD73 was completed. A trend toward higher levels of eosinophils and increased CD73 expression in serum was observed ($p > 0.05$). This trend was also observed in sputum (figure 2). No correlation between CD73 and cytokines, white cell count or inflammatory and cardiac parameters was observed (figure 3).

Figure 2. Correlation between sputum CD73 levels and blood eosinophilia in stable COPD (Non-Exacerbator COPD and Exacerbator-COPD) and acute exacerbation (AECOPD).

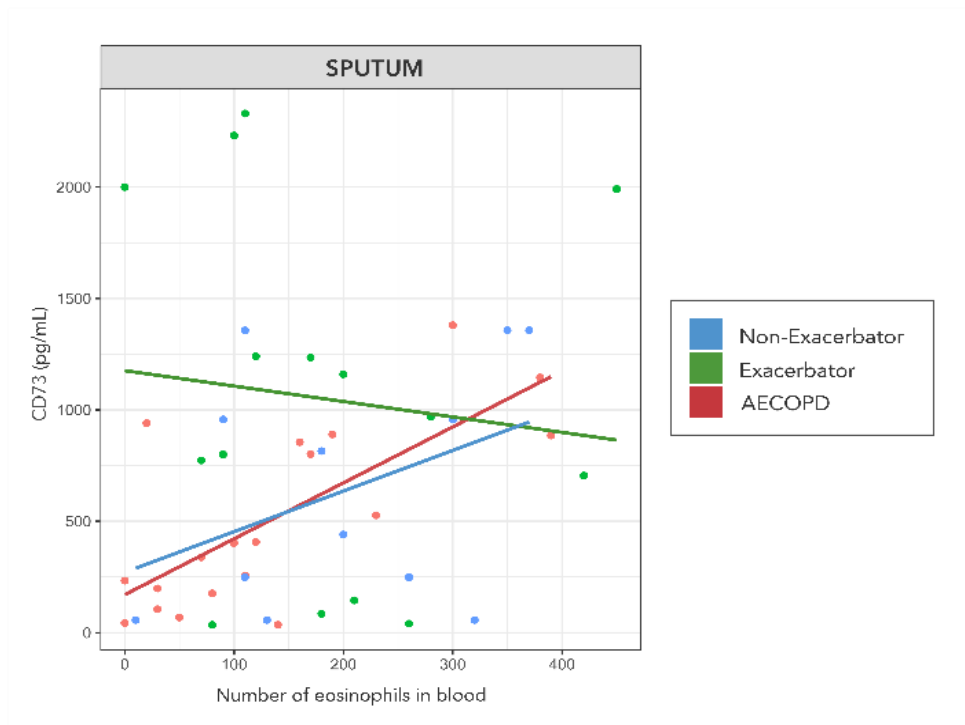
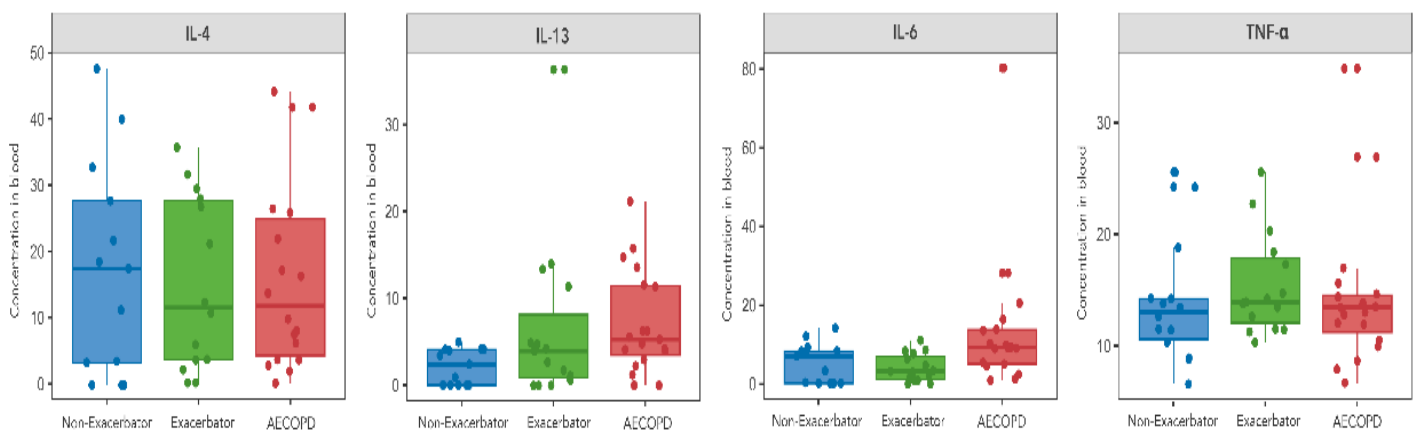


Figure 3. Correlation between CD73 and cytokines in stable COPD (NonExacerbator COPD and Exacerbator-COPD) and acute exacerbation (AECOPD).



A sub analysis based on treatment with or without azithromycin was conducted in the Exacerbator group during stable situation and during AECOPD. CD73 count was significantly lower in serum during an exacerbation in patients without treatment with azithromycin (2381,25 [1208,75-3310] vs 1742,5 [1254,38-2726,25], $p < 0.013$) compared with patients under

chronic treatment with azithromycin. In sputum, a higher decrease of CD73 was observed in patients with chronic treatment with azithromycin ($1311,11 \pm 918,72$ vs $386 \pm 349,13$; $p=0,064$) compared with patients without chronic treatment with azithromycin ($747,12 \pm 674,46$ vs $510,13 \pm 129,66$, $p=0.065$).

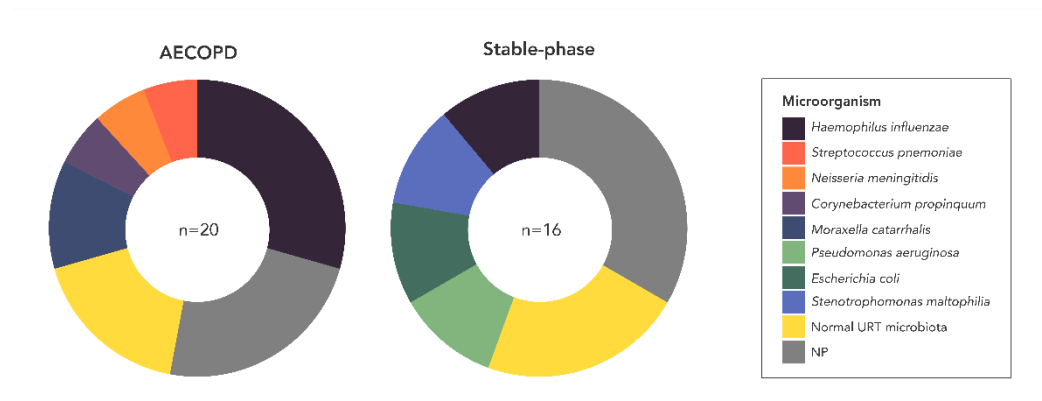
Table 3. CD73 and inflammatory markers by treatment with or without azithromycin.

Azithromycin N =6				No azithromycin N=17		
	EXACERBATOR COPD (stable)	AECOPD	p	EXACERBATOR stable COPD	AECOPD	p
CD73 serum (pg/mL)	$2773,75 \pm 2409,63$	$2292,29 \pm 1859,13$	0,14	$2381,25 [1208,75-3310]$	$1742,5 [1254,38-2726,25]$	0,013
CD73 sputum (pg/mL)	$1311,11 \pm 918,72$	$386 \pm 349,13$	0,064	$747,12 \pm 674,46$	$510,13 \pm 129,66$	0,65
IL-4 (pg/mL)	$14,21 \pm 13,64$	$14,14 \pm 13,89$	0,85	$6,64 [2,7-23,8]$	$7,4 [3,7-21,43]$	0,23
IL-6 (pg/mL)	$5,87 \pm 4,04$	$7,7 \pm 4,21$	0,46	$3,2 [1,06-6,81]$	$9,62 [5,17-19,83]$	0,002
IL -13 (pg/mL)	$2,69 [0,88-8,83]$	$4,92 [2,99-14,11]$	0,25	$3,02 [0,86-6,73]$	$3,98 [0,11-5,93]$	0,5
TNF- α (pg/mL)	$14,63 \pm 3,54$	$16,35 \pm 5,33$	0,29	$14,55 [10,9-21,55]$	$13,92 [10,9-22,4]$	0,89
NEUTROPHILS (cel/ μ L)	$4326,67 \pm 1831,62$	$5736,67 \pm 2802,75$	0,73	$5280 [4465-7060]$	$9300 [6785-10670]$	0,001
Eosinophils (cel/ μ L)	$221,68 \pm 185,41$	$153,33 \pm 139,81$	0,13	$131,18 \pm 92,73$	$119,41 \pm 87,84$	0,58

Acute exacerbation characteristics in Exacerbator COPD.

Twenty-three patients were included with AECOPD. Data and complementary examinations were collected according to the study protocol and were carried out by a pulmonologist from the unit. All patients included in the study received systemic corticosteroid therapy and empirical antibiotic treatment according to medical criteria. A total of 8.7% received diuretic treatment for suspected concomitant heart failure. None of them required hospital admission. Patients were re-evaluated 4 to 6 weeks after the exacerbation, at this time sputum samples were also collected in addition to the examinations from visit 2 (spirometry, WT6m, analysis...).

Sputum was obtained from all patients in AECOPD. Twenty sputum cultures were obtained and pathogenic microorganisms were isolated in 60% of them, with *Haemophilus influenzae* being the most frequent bacteria isolated (58%) followed by *Branhamella catarrhalis* (16%). At baseline, 16 sputum samples were obtained and pathogenic germs were isolated in only 4 of them (16.6%).



DISCUSSION

This is a prospective observational study focused on characterising the clinical and biological differences between severe COPD patients with frequent exacerbations (Exacerbator phenotype) and those without frequent exacerbations (Non-exacerbator phenotype).

To our knowledge, this is the first study of the purinergic pathway in different phenotypes of COPD and its correlation with the main inflammatory markers. We evaluate CD73 expression in serum and sputum samples and its relationship with the main inflammatory markers in the different phenotypes of COPD patients defined by the number of AECOPD: Non-exacerbators (<2 AECOPD/year) vs Exacerbators (>2 AECOPD/year).

Our main result was a positive correlation between CD73 in sputum and the number of eosinophils in serum suggesting a potential implication of the purinergic pathway in the eosinophilic inflammation in COPD patients. It is known, that high levels of eosinophils in sputum, in both, stable conditions and during exacerbations in COPD patients, exist [22] and that eosinophils are able to secrete ATP and stimulate the secretion of pro-inflammatory mediator by activating P2Y2 receptors [23]. The secretion of ATP produced by eosinophils would

activate the purinergic pathway in order to degrade ATP and this could explain the increased levels of CD73 in sputum found in this study. Different subtypes of eosinophils in serum and sputum could explain that we did not find correlation between CD73 in serum and eosinophils, as it has been described before that different subtypes exist in COPD blood samples [12].

We could not find CD39 in serum or sputum even though we used different ELISA kits; however, we were able to find CD73, as it had been previously isolated from serum and plasma [24]. CD73 is a transmembrane protein that converts AMP to adenosine [18]. Adenosine has pro- or anti-inflammatory effect depending on the receptor where it acts [25] and on acute or chronic disease states. In acute situations adenosine acts as a protective mechanism under acute stress by diminishing inflammation [26]. By contrast, chronic high levels of adenosine can promote tissue injury and fibrosis [27]. In COPD, *Careta et al*, showed an overexpression of NT5E (CD73 encoding gene) in the lungs of smokers without COPD, but not in COPD patients, suggesting that the hydrolysis of AMP made by CD73, resulting in adenosine could help reduce the inflammatory lung environment in these patients [28]. These findings for *NT5E/CD73* support the idea that, in acute lung damage (active smoking and acute exacerbation), the upregulation of *ENTPD1/CD39* and *NT5E/CD73* could be a compensatory mechanism [28, 29].

Our findings, show higher levels of CD73 in serum in Non-Exacerbator COPD patients than in Exacerbator patients during stable conditions but (table 2), higher levels of CD73 were found in sputum samples of stable Exacerbator patients compared to non-Exacerbator COPD patients ($p>0.05$). In AECOPD, CD73 in serum and sputum decreased compared with those patients in stable situation ($p>0.05$). These seemingly contradictory findings in CD73 isolation between Non-Exacerbator and Exacerbator COPD patients and in AECOPD, could be explained by different hypotheses: 1) the purinergic pathway may act in different ways depending on the tissue studied (serum and sputum), 2) the exacerbator phenotype has a severe disease as they have a lower FEV₁ ($p < 0.07$) and the CD39/CD73 axis could be more dysfunctional; 3) the purinergic pathway has a different role during the acute and chronic inflammation. These apparently contrary findings in the purinergic pathway have been previously documented in COPD. For example, *Tan et al* [30], showed enhanced expression of CD39 on circulating T-cell subsets in patients with an exacerbation of COPD compared with patients with stable COPD. On the other hand, other studies have shown decreased levels of CD39 in stable COPD patients in lung tissues [29, 31]. These findings show the complexity of the role of purinergic pathway in COPD.

We did not find differences in the inflammatory profile between Non-exacerbator COPD patients and Exacerbator patients [34]. During AECOPD, as expected, leucocytes, neutrophils, fibrinogen, CRP and NT-proBNP were enhanced compared with Exacerbator COPD in the stable phase. We also found significantly higher levels of IL-6 during AECOPD ($p<0,003$). IL-6 has been widely studied in COPD and seems to play an important role in maintaining chronic inflammation and increasing the risk of death [32].

All AECOPD were treated with antibiotics because of a suspected respiratory infection and only two patients received diuretic treatment for suspected heart failure. As expected, the most frequently isolated microorganism during AECOPD was *Haemophilus influenzae* (58%) followed by *Moraxella catarrhalis* (16%). Azithromycin is recommended in COPD patients with frequent exacerbations [3, 33, 34] as it has immunomodulatory and anti-inflammatory effects that reduce exacerbations and inflammatory markers [35–37]. Since nearly 30% of Exacerbator COPD patients in our study received chronic treatment with azithromycin we analysed the inflammatory profile based on treatment with or without azithromycin. Interestingly, we found that CD73 in serum was significantly lower during AECOPD ($p<0,013$) in patients without chronic treatment with azithromycin compared with those under chronic treatment with azithromycin. In sputum, a higher decrease of CD73 was observed in patients receiving chronic treatment with azithromycin ($p=0,064$) compared with patients without chronic treatment with azithromycin. These differences in the expression of CD73 in serum and sputum observed depending on the treatment with azithromycin, could suggest that azithromycin could also act as an immunomodulator on the purinergic pathway.

The main limitation of this study is that we only found CD73 in serum and sputum, despite using different ELISA kits in an attempt to also find CD39 (Cusabio (CSB-EL007690HU); LSBIO (LS-F11376) and MYBIOSOURCE (MBS907317). We also tried to find ATP in serum unsuccessfully. Another limitation is that, only a few sputum samples were obtained from Non-Exacerbator patients, even though induced sputum was performed. This made it difficult to draw conclusions on the implication of the purinergic findings in different COPD phenotypes and during an exacerbation. Nevertheless, this study serves to generate new hypotheses about the role of the purinergic pathway in COPD and encourages further investigation into eosinophils in COPD and its relationship with the purinergic pathway as these cells seem to be more involved in chronic pulmonary disease than has been traditionally thought.

CONCLUSIONS:

The inflammatory profile of patients with COPD does not show differences based on the exacerbation phenotype. However, a positive correlation between CD73 in sputum and the number of eosinophils suggests a potential implication of the purinergic pathway in the eosinophilic inflammation in COPD patients. Treatment with azithromycin as immunomodulator could have a role on the purinergic pathway.

Acknowledgments

The authors thank Ms. María José Manuel and Ms. Montserrat Navarro from the Unit of COPD, Bellvitge University Hospital for her help with subject inclusion. We also thank the Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge for their technical assistance and the CERCA Programme/Generalitat de Catalunya for institutional support.

Funding

The research was funded by the Instituto de Salud Carlos III through the grant PI16/00193 and PI20/0777 as well as by grants from Menarini. E. Cuevas received a post-MIR C. Recerca grant from Bellvitge University Hospital.

Author's contribution

EC: participated in the study design, patient's inclusion, ELISA experiments, data analysis, statistical analysis, figure preparation, manuscript drafting and obtaining funding; **EA:** participated in the study design, ELISA experiments, data and statistical analysis, figure preparation and critical revision of the manuscript; **PC:** participated in data and statistical analysis and figure preparation; **CL:** participated in data analysis and interpretation; **MME:** participated in data analysis and interpretation; **MLS:** participated in patients inclusion, data analysis and interpretation; **SS:** the corresponding author contributed to the development of the study concept and design, obtaining funding, study supervision, data interpretation, manuscript drafting, and critical revision of the manuscript for important intellectual content. All the authors have read and approved the final manuscript.

REFERENCES

- 1 Suissa S, Dell'Aniello S, Ernst P. Long-term natural history of chronic obstructive pulmonary disease: Severe exacerbations and mortality. *Thorax* BMJ Publishing Group; 2012; 67: 957–963.
- 2 Marchetti N, Criner GJ, Albert RK. Preventing acute exacerbations and hospital admissions in COPD. *Chest* Chest; 2013; 143: 1444–1454.

- 3 GLOBAL INITIATIVE FOR CHRONIC OBSTRUCTIVE LUNG DISEASE GLOBAL STRATEGY FOR THE DIAGNOSIS, MANAGEMENT, AND PREVENTION OF CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE (2023 REPORT) [Internet]. 2022. Available from: www.goldcopd.org.
- 4 Barnes PJ. Inflammatory endotypes in COPD. *Allergy* [Internet] John Wiley & Sons, Ltd; 2019 [cited 2024 Apr 15]; 74: 1249–1256. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/all.13760>.
- 5 Barnes PJ. Inflammatory endotypes in COPD. *Allergy* John Wiley & Sons, Ltd; 2019; 74: 1249–1256.
- 6 Hardin M, Cho M, McDonald ML, *et al*. The clinical and genetic features of the COPD asthma overlap syndrome. *Eur Respir J* NIH Public Access; 2014; 44: 341.
- 7 Cosio BG, Soriano JB, López-Campos JL, *et al*. Defining the Asthma-COPD Overlap Syndrome in a COPD Cohort. *Chest* Elsevier; 2016; 149: 45–52.
- 8 Bafadhel M, Peterson S, De Blas MA, *et al*. Predictors of exacerbation risk and response to budesonide in patients with chronic obstructive pulmonary disease: a post-hoc analysis of three randomised trials. *Lancet Respir Med* Elsevier; 2018; 6: 117–126.
- 9 Brightling CE, Bleecker ER, Panettieri RA, *et al*. Benralizumab for chronic obstructive pulmonary disease and sputum eosinophilia: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2a study. *Lancet Respir Med* NIH Public Access; 2014; 2: 891.
- 10 Jose A. Mepolizumab for eosinophilic chronic obstructive pulmonary disease. *Journal of Clinical Outcomes Management* Turner White Communications Inc.; 2018; 25.
- 11 Ferrari D, Vuerich M, Casciano F, *et al*. Eosinophils and Purinergic Signaling in Health and Disease. *Front Immunol* [Internet] Front Immunol; 2020 [cited 2024 Apr 15]; 11. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32733449/>.
- 12 López CC, Santos AS, Castellano AL, *et al*. Eosinophil Subtypes in Adults with Asthma and Adults with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med* American Thoracic Society; 2023; 208: 155–162.
- 13 Pelleg A, Schulman ES, Barnes PJ. Extracellular Adenosine 5'-Triphosphate in Obstructive Airway Diseases. *Chest* [Internet] Elsevier B.V.; 2016 [cited 2020 Dec 18]; 150: 908–915. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27568579/>.
- 14 Yegutkin GG. Enzymes involved in metabolism of extracellular nucleotides and nucleosides: Functional implications and measurement of activities [Internet]. *Crit Rev Biochem Mol Biol Informa Healthcare*; 2014 [cited 2021 Mar 1]. p. 473–497. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25418535/>.
- 15 Lommatzsch M, Cicko S, Müller T, *et al*. Extracellular adenosine triphosphate and chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* [Internet] Am J Respir

Crit Care Med; 2010 [cited 2020 Dec 18]; 181: 928–934. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20093639/>.

- 16 Mortaz E, Folkerts G, Nijkamp FP, *et al.* ATP and the pathogenesis of COPD. *Eur J Pharmacol* [Internet] *Eur J Pharmacol*; 2010 [cited 2020 Dec 18]; 638: 1–4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20423711/>.
- 17 Gerassimou C, Kotanidou A, Zhou Z, *et al.* Regulation of the expression of soluble guanylyl cyclase by reactive oxygen species. *Br J Pharmacol* John Wiley and Sons Inc.; 2007; 150: 1084–1091.
- 18 Antonioli L, Pacher P, Vizi ES, *et al.* CD39 and CD73 in immunity and inflammation [Internet]. *Trends Mol Med Trends Mol Med*; 2013 [cited 2020 Dec 18]. p. 355–367. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23601906/>.
- 19 GLOBAL INITIATIVE FOR CHRONIC OBSTRUCTIVE LUNG DISEASE GLOBAL STRATEGY FOR THE DIAGNOSIS, MANAGEMENT, AND PREVENTION OF CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE (2023 REPORT). 2022.
- 20 Celli BR, Fabbri LM, Aaron SD, *et al.* An Updated Definition and Severity Classification of Chronic Obstructive Pulmonary Disease Exacerbations: The Rome Proposal. *Am J Respir Crit Care Med* [Internet] *Am J Respir Crit Care Med*; 2021 [cited 2024 Oct 4]; 204: 1251–1258. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34570991/>.
- 21 Domenech A, Puig C, Martí S, *et al.* Infectious etiology of acute exacerbations in severe COPD patients. *J Infect J Infect*; 2013; 67: 516–523.
- 22 David B, Bafadhel M, Koenderman L, *et al.* Eosinophilic inflammation in COPD: from an inflammatory marker to a treatable trait. *Thorax* [Internet] BMJ Publishing Group; 2021 [cited 2024 Apr 15]; 76: 188. Available from: [/pmc/articles/PMC7815887/](https://pmc/articles/PMC7815887/).
- 23 Kobayashi T, Kouzaki H, Kita H. HUMAN EOSINOPHILS RECOGNIZE ENDOGENOUS DANGER SIGNAL CRYSTALLINE URIC ACID AND PRODUCE PROINFLAMMATORY CYTOKINES MEDIATED BY AUTOCRINE ATP. *J Immunol* NIH Public Access; 2010; 184: 6350.
- 24 De Gassart A, Géminard C, Février B, *et al.* Lipid raft-associated protein sorting in exosomes. *Blood* [Internet] American Society of Hematology; 2003 [cited 2024 Apr 18]; 102: 4336–4344. Available from: <https://dx.doi.org/10.1182/blood-2003-03-0871>.
- 25 Borea PA, Gessi S, Merighi S, *et al.* Pharmacology of adenosine receptors: The state of the art. *Physiol Rev* [Internet] American Physiological Society; 2018 [cited 2024 Apr 16]; 98: 1591–1625. Available from: <https://journals.physiology.org/doi/10.1152/physrev.00049.2017>.
- 26 Karmouty-Quintana H, Xia Y, Blackburn MR. Adenosine Signaling During Acute and Chronic Disease States. *J Mol Med (Berl)* [Internet] NIH Public Access; 2013 [cited 2024 Apr 18]; 91: 173. Available from: [/pmc/articles/PMC3606047/](https://pmc/articles/PMC3606047/).

- 27 Zhou Y, Schneider DJ, Blackburn MR. Adenosine signaling and the regulation of chronic lung disease. *Pharmacol Ther* [Internet] NIH Public Access; 2009 [cited 2024 Apr 18]; 123: 105. Available from: [/pmc/articles/PMC2743314/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC2743314/).
- 28 Careta O, Cuevas E, Muñoz-Esquerre M, *et al.* Imbalance in the Expression of Genes Associated with Purinergic Signalling in the Lung and Systemic Arteries of COPD Patients. *Sci Rep* Nature Publishing Group; 2019; 9.
- 29 Aliagas E, Muñoz-Esquerre M, Cuevas E, *et al.* Is the purinergic pathway involved in the pathology of COPD? Decreased lung CD39 expression at initial stages of COPD. *Respir Res* [Internet] BioMed Central Ltd.; 2018 [cited 2020 Dec 18]; 19. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29807526/>.
- 30 Tan DBA, Ong NE, Zimmermann M, *et al.* An evaluation of CD39 as a novel immunoregulatory mechanism invoked by COPD. *Hum Immunol* [Internet] Elsevier Inc.; 2016 [cited 2020 Dec 18]; 77: 916–920. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27430193/>.
- 31 Kratzer A, Salys J, Sévigny J, *et al.* Second hand smoke exposure impairs CD39 expression and function in the lung. *European Respiratory Journal* 2012; 40.
- 32 Huang H, Huang X, Zeng K, *et al.* Interleukin-6 is a Strong Predictor of the Frequency of COPD Exacerbation Within 1 Year. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* [Internet] Dove Press; 2021 [cited 2024 Apr 19]; 16: 2945. Available from: [/pmc/articles/PMC8560075/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC8560075/).
- 33 Pomares X, Montón C, Huertas Alicia Marín D, *et al.* Clinical Investigations Efficacy of Low-Dose versus High-Dose Continuous Cyclic Azithromycin Therapy for Preventing Acute Exacerbations of COPD Keywords Chronic obstructive pulmonary disease · Exacerbations · Azithromycin · Dose. *Respiration* [Internet] 2021 [cited 2022 Sep 26]; 100: 1070–1077. Available from: www.karger.com/res.
- 34 Wenzel RP, Fowler AA, Edmond MB. Antibiotic Prevention of Acute Exacerbations of COPD. *New England Journal of Medicine* [Internet] New England Journal of Medicine (NEJM/MMS); 2012 [cited 2020 Dec 22]; 367: 340–347. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22830464/>.
- 35 Martinez FJ, Curtis JL, Albert R. Role of macrolide therapy in chronic obstructive pulmonary disease. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* [Internet] Dove Press; 2008 [cited 2024 Apr 19]; 3: 331. Available from: [/pmc/articles/PMC2629987/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC2629987/).
- 36 Friedlander AL, Albert RK. Chronic Macrolide Therapy in Inflammatory Airways Diseases. *Chest* Elsevier; 2010; 138: 1202–1212.
- 37 Cuevas E, Huertas D, Montón C, *et al.* Systemic and functional effects of continuous azithromycin treatment in patients with severe chronic obstructive pulmonary disease and frequent exacerbations. *Front Med (Lausanne)* [Internet] Frontiers Media SA; 2023 [cited 2024 Apr 19]; 10. Available from: [/pmc/articles/PMC10406447/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC10406447/).

Article 4: Systemic and functional effects of continuous azithromycin treatment in patients with severe chronic pulmonary disease and frequent exacerbations.

Ester Cuevas, Daniel Huertas, Concepción Montón, Alicia Marin, Anna Carreras-Salinas, Xavier Pomares, Marian García-Nuñez, Sara Martí, Salud Santos

Resum: El tractament continu amb azitromicina pot disminuir les aguditzacions de la malaltia pulmonar obstructiva crònica (AMPOC), però es coneix poc el seu impacte a nivell sistèmic i funcional en pacients de vida real.

Mètodes: Es tracta d'un estudi observacional prospectiu multicèntric de pacients amb MPOC greu que van iniciar tractament amb azitromicina. Diferents proves es van realitzar previ a l'inici del tractament i després de 3 i 12 mesos de tractament. Aquestes incloïen proves de funció pulmonar, un test de la marxa de 6 minuts (6MWT) i estudis d'immunoabsorció enzimàtica (ELISA) de marcadors sèrics i d'esput, com les interleucines (IL-6, IL-8, IL-13, IL-5), el receptor 2 del factor de necrosi tumoral (TNFR2) i marcadors inflamatoris. Es van reportar les ràtios d'incidència (IRR) i els seus intervals de confiança del 95% (IC 95%).

Resultats: De 478 pacients amb MPOC sever, 42 van iniciar tractament amb azitromicina i van experimentar disminució de les AMPOC (IRR, 0,34; IC 95%, 0,26-0,45) i les hospitalitzacions (IRR, 0,39; IC 95%, 0,28-0,49). El tractament també es va associar amb una millora significativa de la pressió arterial parcial d'oxigen (9,2 mmHg, IC del 95% 1,4-16,9) als 12 mesos. Mentre que TNFR2 va disminuir significativament tant en mostres de sèrum com d'esput, IL-13 i IL-6 només es van reduir significativament en sèrum. A més, un nivell elevat d'IL-8 sèric i d'esput va predir una bona resposta clínica al tractament de forma significativa.

Conclusions: El tractament continu amb azitromicina en una cohort de pacients amb MPOC greu i aguditzacions freqüents pot reduir significativament el nombre i la gravetat de les aguditzacions i millorar l'intercanvi de gasos. El tractament canvia el patró dels aïllats de microorganismes i disminueix la resposta inflamatòria. Cal destacar que la IL-8 pot tenir utilitat com a predictor de la resposta clínica al tractament amb azitromicina.



OPEN ACCESS

EDITED BY

Amany F. Elbehairy,
Alexandria University, Egypt

REVIEWED BY

Zakaria Lahmar,
Centre Hospitalier Universitaire de Montpellier,
France
Sergey N. Avdeev,
I.M. Sechenov First Moscow State Medical
University, Russia

*CORRESPONDENCE

Sara Martí
✉ smartinm@bellvitgehospital.cat
Salud Santos
✉ saludsantos@bellvitgehospital.cat

RECEIVED 26 May 2023

ACCEPTED 06 July 2023

PUBLISHED 24 July 2023

CITATION

Cuevas E, Huertas D, Montón C, Marin A, Carrera-Salinas A, Pomares X, García-Núñez M, Martí S and Santos S (2023) Systemic and functional effects of continuous azithromycin treatment in patients with severe chronic obstructive pulmonary disease and frequent exacerbations.

Front. Med. 10:1229463.

doi: 10.3389/fmed.2023.1229463

COPYRIGHT

© 2023 Cuevas, Huertas, Montón, Marin, Carrera-Salinas, Pomares, García-Núñez, Martí and Santos. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Systemic and functional effects of continuous azithromycin treatment in patients with severe chronic obstructive pulmonary disease and frequent exacerbations

Ester Cuevas¹, Daniel Huertas², Concepción Montón³, Alicia Marin^{4,5}, Anna Carrera-Salinas⁶, Xavier Pomares³, Marian García-Núñez^{3,4}, Sara Martí^{4,6*} and Salud Santos^{1,4*}

¹Department of Respiratory Medicine, Hospital Universitari de Bellvitge, Institut d'Investigació Biomedica de Bellvitge – IDIBELL, Universitat de Barcelona, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain,

²Department of Respiratory Medicine, Consorci Sanitari Alt Penedès Garraf, Barcelona, Spain,

³Department of Respiratory Medicine, Hospital de Sabadell, Institut Universitari Parc Taulí-UAB, Sabadell, Spain, ⁴Research Network for Respiratory Diseases (CIBERes), ISCIII, Madrid, Spain,

⁵Department of Respiratory Medicine, Hospital Germans Trias i Pujol, Institut d'Investigació en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol – IGTP, Universitat Autònoma de Barcelona, Badalona, Spain,

⁶Department of Microbiology, Hospital Universitari de Bellvitge, IDIBELL, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

Background: Continuous treatment with azithromycin may lead to fewer acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease (AECOPD), but little is known of its impact on systemic and functional outcomes in real-life settings.

Methods: This was a multicenter prospective observational study of patients with severe COPD who started treatment with azithromycin. Tests were compared at baseline and after 3 and 12 months of treatment. These included lung function tests, a 6-min walking test (6MWT), and enzyme-linked immunosorbent assays of serum and sputum markers, such as interleukins (IL-6, IL-8, IL-13, IL-5), tumor necrosis factor receptor 2 (TNFR2), and inflammatory markers. Incidence rate ratios (IRR) and their 95% confidence intervals (95% CI) are reported.

Results: Of the 478 eligible patients, the 42 who started azithromycin experienced reductions in AECOPDs (IRR, 0.34; 95% CI, 0.26–0.45) and hospitalizations (IRR, 0.39; 95% CI, 0.28–0.49). Treatment was also associated with significant improvement in the partial arterial pressure of oxygen (9.2 mmHg, 95% CI 1.4–16.9) at 12 months. While TNFR2 was reduced significantly in both serum and sputum samples, IL-13 and IL-6 were only significantly reduced in serum samples. Moreover, an elevated serum and sputum IL-8 level significantly predicted good clinical response to treatment.

Conclusion: Continuous azithromycin treatment in a cohort of patients with severe COPD and frequent exacerbations can significantly reduce the number and severity of exacerbations and improve gas exchange. Treatment changes the pattern of microorganism isolates and decreases the inflammatory response. Of note, IL-8 may have utility as a predictor of clinical response to azithromycin treatment.

KEYWORDS

inflammatory markers, interleukins, exacerbations, COPD, azithromycin, microorganisms

1. Introduction

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is an inflammatory and systemic disease that affects the airways. Acute exacerbations of COPD (AECOPD) affect not only the natural history of the disease but also quality of life, the number of hospitalizations, and mortality rates (1). Exacerbations, which are frequently caused by respiratory viral or bacterial infections, are events characterized by increases in respiratory symptoms that worsen in <14 days, may be accompanied by tachypnea and/or tachycardia, and are often associated with increased local and systemic inflammation (2). Various interventions have been shown to prevent AECOPDs, including both non-pharmacological measures (e.g., quitting smoking, respiratory rehabilitation, and vaccines) and pharmacological measures (e.g., bronchodilator and corticosteroid inhalers) (3). Nevertheless, 25–30% of patients still experience AECOPD, indicating that these measures do not prevent all cases (4).

Randomized controlled trials have demonstrated the efficacy of prophylactic azithromycin in reducing AECOPDs, and as such, current clinical guidelines recommend its use in patients with frequent exacerbations despite optimal inhaled therapy (5–7). However, there is limited evidence on the most appropriate time of administration or the most effective dose needed to control exacerbations and minimize side effects. Albert et al. compared the use of 250 mg of azithromycin per day for 1 year irrespective of COPD severity or frequency of AECOPD. They showed both an increased time lag between exacerbations and a decrease in the frequency of exacerbations compared to placebo (5). The COLUMBUS trial also showed that 500 mg of azithromycin three times a week for 1 year significantly reduced (42%) the exacerbation rate compared with placebo in patients with three or more AECOPDs annually (6). Finally, a more recent study found that doses of 250 mg and 500 mg three times a week had comparable effectiveness at preventing exacerbations in patients with severe COPD and frequent exacerbations, and that this could minimize the potential side effects of a long-term antibiotic therapy (7).

Antibiotic prophylaxis in AECOPDs may increase the risk of selection for resistant bacteria, facilitating the spread of antimicrobial resistance. Even though azithromycin is usually well-tolerated drug, undesirable side effects can still result from polypharmacy, advanced age, and comorbidities in real-world settings. Moreover, the therapeutic response can vary depending on the characteristics and baseline statuses of patients. Investigating what factors predict a

favorable response, both in the number of exacerbations and their functional effects, is of particular clinical interest.

This study aimed to analyze the systemic and pulmonary functional changes associated with severe COPD in patients with frequent exacerbations after continuous azithromycin treatment, their effect on microbiological isolates in residual exacerbations, and the potential involvement of inflammatory and immunomodulatory mechanisms.

2. Methods

2.1. Study design

This was a multicenter, observational, and prospective study of patients with severe COPD and frequent exacerbations who regularly attended comprehensive care programs in the respiratory day hospitals of three university hospitals in Barcelona. The participating hospitals were Hospital Universitari de Bellvitge (HUB), Hospital Parc Taulí (HPT), and Hospital Germans Trias i Pujol (HGTiP). All patients who started treatment with azithromycin according to clinical guideline recommendations and practice (8) were included consecutively between January and December, 2017.

2.2. Patient selection

COPD was defined according to the GOLD recommendations: a history of smoking (>10 pack-years) and an FEV1 (forced exhalation volume in 1 second) to FVC (forced vital capacity) ratio <70% (8). By clinical consensus, and with the objective of homogenizing the selection between the different centers, we included patients at the maximum therapeutic step in the 6 months prior to inclusion if they had frequent exacerbations, defined as ≥ 4 moderate AECOPDs in the last year (≥ 3 if two were severe), and had sputum cultures negative for mycobacteria. Patients with contraindications to macrolide therapy (allergy, long QT syndrome), different respiratory pathologies, lack of suitability for macrolide treatment, according to the clinician's criteria (severe cardiovascular disease, hearing loss, use of co-therapies that prolong the QT interval or drug interactions) and prior use of azithromycin or inhaled colimycin (not concomitant initiation) were excluded.

All patients signed an informed consent form in accordance with the principles outlined in the Declaration of Helsinki, and the local ethics committee approved the study (CEIC, ref. SSP-AZI-2016-01).

2.3. Visits and follow-up

All included patients started treatment with azithromycin 250 mg three times per week for 1 year. Sociodemographic data, anthropometrics, COPD history, and symptom evaluations were

Abbreviations: 6MWT, 6-min walking test; AECOPD, acute exacerbation of COPD; AMI, Acute myocardial infarction; COPD, Chronic obstructive pulmonary disease; CRP, C-reactive protein; ELISA, Enzyme-linked immunosorbent assay; HGTiP, Hospital Germans Trias i Pujol; HPT, Hospital Parc Taulí; HUB, Hospital Universitari de Bellvitge; ICS, inhaled corticosteroids; JNK, c-Jun N-terminal kinase; LABA, long-acting β_2 -agonist; LAMA, long-acting muscarinic antagonist; MMP9, Matrix metalloproteinase 9; MUC5AC, Mucin 5AC; URT, Upper respiratory tract.

collected in all patients. Symptom tests included the COPD Assessment Test (CAT), London Chest Activity of Daily Living Scale (LCADL) (9), and the modified Medical Research Council (mMRC) Dyspnea Scale. In addition, participants underwent a 6-min walking test (6MWT), respiratory functional test, and arterial blood gas analyzes at baseline and after 3 and 12 months of follow-up. Blood and sputum samples were collected at all visits for laboratory determinations. All moderate and severe exacerbations were recorded and treated according to appropriate criteria and guidelines. Exacerbations from the year before starting treatment were also registered. An exacerbation was defined as any event that caused a worsening of respiratory symptoms and that required modification of the patient's usual treatment.

2.4. Quantification of inflammatory parameters in blood and sputum

Serum samples were obtained from venous blood. After allowing the sample to stand at room temperature for 2 h, it was centrifuged for 15 min at $1000 \times g$, and the supernatant was taken for analysis.

Sputum was separated from contaminating saliva by macroscopic examination, before being weighed and homogenized with 4 volumes of dithiothreitol (Sputasol, Oxoid Ltd., Hants, United Kingdom). After 15 min at room temperature, the same volume of phosphate-buffered saline was added and the whole mixture was filtered and centrifuged at $600 \times g$ for 15 min. The supernatant was stored at -80°C for determinations.

Analysis was performed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Cytokine concentrations (IL-5, IL-6, IL-8, IL-13) were measured in serum samples and supernatant sputum samples using a multiplex immune-bead assay (Milliplex MAP High Sensitivity Human T cell panel Kit; Merck Millipore). TNF2 was analyzed with a Human soluble TNF Receptor 2 ELISA Kit (sTNFR2; RAB0490). All procedures were performed according to the manufacturer's instructions, centralized in one of the centers.

2.5. Sputum collection and bacterial load detection

Sputum samples were obtained spontaneously at visits and during AECOPD episodes before starting any antimicrobial treatment. Only good quality sputum samples were considered (i.e., 25 leukocytes per low-power field) following the microbiological routine (10). Briefly, samples were homogenized with dithiothreitol (Sputasol, Oxoid Ltd., Hants, United Kingdom), and plated onto blood agar, chocolate agar, and MacConkey agar before overnight incubation at 37°C in a 5% CO_2 atmosphere (blood and chocolate agar) or ambient air atmosphere (MacConkey agar). Bacterial colonies were sub-cultured for identification by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany).

2.6. Statistical analyzes

Data are expressed as means $\pm$ standard deviation (SD) or medians [25th–75th percentile] for continuous data and as frequencies (percentage) for categorical data. Multiple

comparisons were evaluated by chi-squared (categorical), student *t* (parametric), or Mann–Whitney (nonparametric) tests, applying the Bonferroni method if the Kruskal–Wallis test found significant differences. A negative binomial regression model was used to study the number of exacerbations after treatment, reporting the incidence rate ratio (IRR) and 95% confidence interval (95%CI). Different predictive statistical models were fitted for each analytical or clinical variable of interest, adjusted by age and Charlson index. A value of *p* of 0.05 was considered statistically significant. IBM SPSS version 22 (IBM Corp., Armonk, NY, United States) was used for all analyzes.

3. Results

3.1. Study subjects

Of the 478 eligible patients with severe COPD in three respiratory day hospitals, we included 42 (8.8%) who started azithromycin (Figure 1; mean age 72.2 ± 7.09 years). Fifty-eight patients were already under treatment with long-term azithromycin therapy and were excluded; therefore, 21% of patients in this cohort were treated. At the time of inclusion, all patients were receiving combined inhaled bronchodilator therapy, long-acting β_2 -agonists (LABAs) and long-acting muscarinic antagonists (LAMAs), 39 (93%) inhaled corticosteroids (ICS) and nine (21%) long-term oxygen therapy. Participants corresponded to group E of the current GOLD classification (8), having severe airflow obstruction (mean FEV_1 $44.5\% \pm 13.8\%$), an average mMRC dyspnea symptom score of 2, and a median of 5 (4–6) exacerbations during the previous year (Table 1). Patient characteristics were comparable among the three participating hospitals. Only 37 patients finished the study, with patients withdrawn due to cardiac pathology ($n=3$; 1 acute myocardial infarction, 2 QT prolongations), diarrhea ($n=1$), and personal preference ($n=1$).

3.2. Clinical and functional effects after continuous azithromycin treatment

A significant improvement in the partial arterial pressure of oxygen (PaO_2) was observed after treatment with azithromycin at 3 and 12 months compared with the baseline visit (9.21 mmHg increase at 12 months; 95%CI, 1.45–16.97). This was also associated with a significant improvement in oxygen saturation both at rest and during exercise. However, symptoms (except for a slight improvement in CAT and LCADL scores), the 6MWT distance, and lung function did not differ significantly after 12 months (Table 2).

3.3. Inflammatory changes in serum and sputum

Most serum and sputum inflammatory parameters improved after treatment with azithromycin (Table 3). Of note, treatment significantly lowered serum IL-13, IL-6, and TNFR2 levels, but only lowered sputum TNFR2 levels, with no significant correlation found between serum and sputum levels (data not shown). The decreased

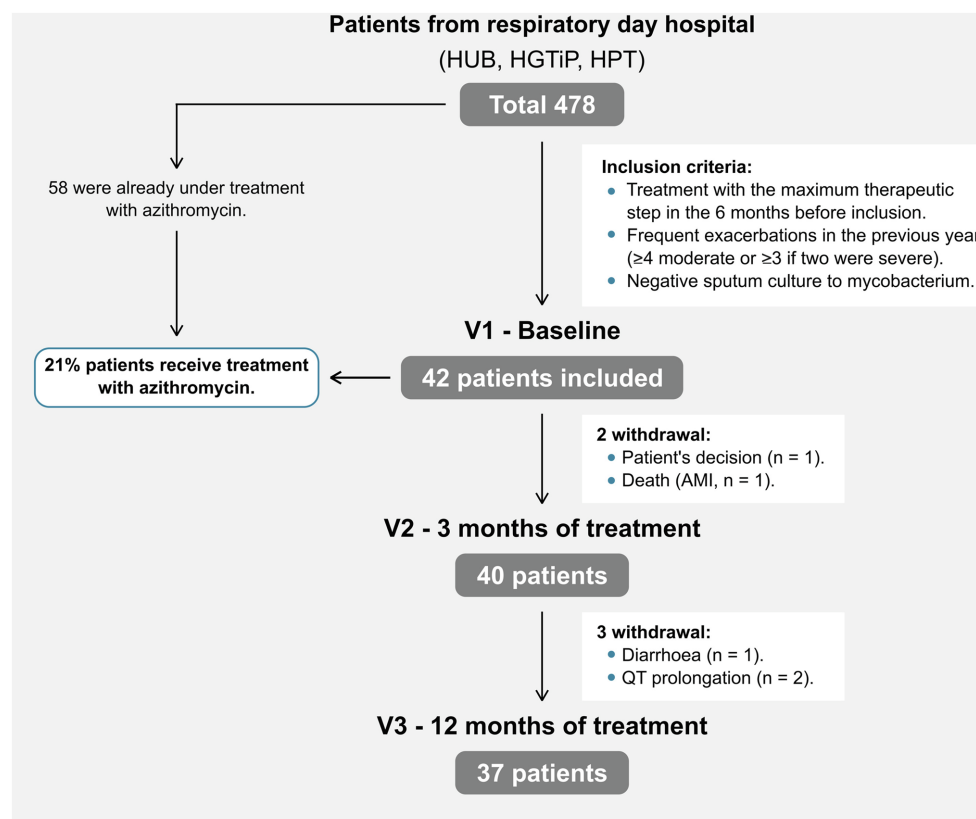


FIGURE 1

Patient flowchart. AMI, acute myocardial infarction; HUB, Hospital Universitari de Bellvitge; HGTiP, Hospital Germans Trias I Pujol; HPT, Hospital Parc Taulí.

inflammatory response was more consistent in serial serum determinations.

3.4. Predictors of clinical response in study participants

After analyzing all serum markers and functional variables, an increase in baseline IL-8 predicted a positive response to azithromycin treatment and a reduction in exacerbations (Supplementary Table S1). Among the sputum markers, a high IL-8 level was also independently associated with good clinical response (Supplementary Table S2).

3.5. Effect of treatment with azithromycin on COPD exacerbations

The 37 participants had 188 exacerbations (5.1 ± 1.6 AECOPD/patient) in the year before starting azithromycin compared with only 65 during treatment (1.8 ± 1.4 AECOPD/patient; $p < 0.0001$; Figure 2). The IRR of AECOPD after treatment was 0.34 (95%CI, 0.26–0.45), indicating that patients had an approximate 66% reduction in acute exacerbations after treatment. Before treatment, 162 (86%) exacerbations were moderate and 26 (14%) were severe and required hospitalization (mean, 184 days in hospital). During treatment, 55 (84.6%) exacerbations were moderate and 10 (15%) were severe and

required hospitalization (mean, 74 days; Table 4). Therefore, hospitalizations fell by 61.5% at 12 months (IRR, 0.39; 95%CI, 0.28–0.49). Although fewer patients required hospital admission, their mean hospital stays tended to be longer (7.7 ± 3.7 vs. 12.3 ± 14.7 days).

3.6. Microbiological effect of continuous azithromycin treatment

A total of 95 microorganisms were obtained during the 188 AECOPD in the year before starting treatment with azithromycin, which decreased to only 41 microorganisms during 65 AECOPD throughout the follow-up period. There was a significant reduction in frequent sputum isolates, such as *Haemophilus influenzae* ($p = 0.0128$) and *Moraxella catarrhalis* ($p = 0.0031$) (Table 4), and a significant increase in infrequent microorganisms, such as *Stenotrophomonas maltophilia* (from 2.2 to 10.3%; $p = 0.0448$). Microorganisms otherwise increased in the upper respiratory tract, and sputum isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Streptococcus pneumoniae* did not change.

Overall, the pattern of microbiological isolates changed with the intensity of AECOPD from before to after azithromycin therapy (Figure 3). In moderate AECOPD, *M. catarrhalis* decreased from 26.6 to 2.8% ($p = 0.0026$) and *S. maltophilia* increased from 0 to 11.1% ($p = 0.0026$), with a reset observed in the usual upper respiratory tract bacterial microbiota from 11.4 to 47.2% ($p < 0.0001$). In severe AECOPD, *P. aeruginosa* isolates increased from 1 to 3 ($p = 0.0075$) and

TABLE 1 Clinical and functional characteristics of study patients.

	Total	HUB	HGTiP	HPT	<i>p</i> -value
	<i>n</i> = 42	<i>n</i> = 15	<i>n</i> = 13	<i>n</i> = 14	
Age, years	72.2 (7.09)	71.5 (4.76)	72.2 (7.91)	73.1 (8.7)	0.838
Male, <i>n</i> (%)	38 (90.5)	13 (86.7)	12 (92.3)	13 (92.9)	0.947
BMI, kg/m ²	27 (5.31)	26.7 (4.48)	28.7 (5.01)	25.7 (6.2)	0.326
Charlson index	2 [1–3]	1 [1–2.75]	2.5 [1.75–4]	1 [1–2]	0.074
Current smokers, <i>n</i> (%)	4 (9.52)	0 (0)	3 (23.1)	1 (7.14)	0.174
Pack-years	57.9 (28.9)	59.6 (24.5)	60 (44)	53.9 (17.1)	0.865
FEV ₁ , % reference	44.5 (13.8)	40 (7.2)	47.3 (14.3)	49.2 (23.9)	0.407
FEV ₁ /FVC, % reference	45.4 (11.5)	39.5 (8.57)	54.7 (8.57)	39 (12)	0.003
RV, % reference	153 (43.5)	165 (46.5)	126 (36.9)	169.4 (30.3)	0.098
DLCO, % reference	45.6 (21)	46.8 (15.5)	54.5 (24.9)	28.8 (18)	0.092
6MWT, meters	341 (107)	326 (106)	371 (124)	333 (97)	0.562
PaO ₂	69.2 (17.07)	72.2 (9.28)	69.3 (28.8)	66.1 (66.1)	0.675
PaCO ₂	42.2 (8.39)	42.4 (6.69)	45.3 (11.3)	40.8 (6.6)	0.378
Dyspnea mMRC	2 [2–2]	2 [2–2]	2 [1–2]	2 [2–2.75]	0.007
CAT	16 [11–21]	16 [11.2–21]	14 [11–19]	17 [11.5–21]	0.749
LCADL	21 [17–29.5]	21 [17–24]	21.5 [18–24]	18 [14–30]	0.579
BQ index	4 [1–6]	2 [0–6.5]	2 [0–7.5]	6 [4.25–10.5]	0.061
Previous exacerbations	5 [4–6]	6 [4–7.5]	4 [4–5]	5 [4.75–5.75]	0.135

Data are presented as mean (SD) or median [25th–75th percentile]. 6MWT, 6-min walking test; BMI, body mass index; BQ index, bronchiectasis index; CAT, COPD Assessment Test; DLCO, diffusing lung capacity for carbon monoxide; Dyspnea mMRC, dyspnea scale modified Medical Research Council; FEV₁, forced expiratory volume in one second; FVC, forced vital capacity; HUB, Hospital Universitari de Bellvitge; HGTiP, Hospital Germans Trias I Pujol; HPT, Hospital Parc Taulí; LCADL, London chest activity of daily living scale; PaO₂, partial arterial pressure of oxygen; PaCO₂, partial arterial pressure of carbon dioxide; RV, residual volume; SD, standard deviation; **p* < 0.05 significant.

TABLE 2 Clinical and functional effects of continuous azithromycin in patients with severe COPD.

Parameters	Baseline	3 months	12 months	<i>p</i> -value
Dyspnea mMRC, <i>n</i> (%)				0.697
1	7 (18.9)	7 (18.9)	7 (19.4)	
2	26 (70.3)	23 (62.2)	23 (63.9)	
3	4 (10.8)	7 (18.9)	6 (16.67)	
CAT	16.2 (6.2)	14.5 (4.8)	13.9 (4.8)	0.059
LCADL	23.9 (12.7)	23.6 (12.4)	28.4 (12.7)	0.141
FEV ₁ , % reference	38.3 (14.3)	37 (14.5)	37 (13.8)	0.696
FVC, % reference	64.9 (17.2)	64.1 (17.2)	60.1 (20.8)	0.292
PaO ₂ , mmHg	69.2 (18.0)	74.7 (14.0)	79.2 (14.6)	0.008*
PaCO ₂ , mmHg	43.2 (8.7)	42.9 (6.5)	43.3 (6.1)	0.944
6MWT				
Meters	345 (105)	354 (79)	352 (83.9)	0.539
SatO ₂ initial, %	92.2 (4.0)	93.1 (3.5)	94.3 (1.9)	0.002*
SatO ₂ end, %	87 (7.8)	87.1 (8.6)	89.7 (5.5)	0.035*

Data are expressed as mean (SD). **p* < 0.05 significant (in bold). 6MWT, 6-min walking test; CAT, COPD Assessment Test; Dyspnea mMRC, dyspnea scale modified Medical Research Council; COPD, chronic obstructive pulmonary disease; FEV₁, forced expiratory volume in one second; FVC, forced vital capacity; LCADL, London Chest Activity of Daily Living scale; PaCO₂, partial arterial pressure of carbon dioxide; PaO₂, partial arterial pressure of oxygen.

S. pneumoniae isolates increased from 0 to 2 (*p* = 0.0078) after azithromycin therapy.

4. Discussion

This multicenter, prospective, observational study analyzed the systemic and functional real-life effects of continuous treatment with azithromycin in patients with severe COPD and frequent exacerbations managed in respiratory day hospitals. In addition to confirming that azithromycin effectively reduced the rate of moderate to severe COPD exacerbations, we provide the first evidence that treatment also improves gas exchange, both at rest and during exercise, after 1 year of treatment. Of the interleukin profiles analyzed in this study, IL-8 and TNF α presented as the major inflammatory mediators in the immunomodulatory response to azithromycin in patients with COPD. Baseline elevations of IL-8 in both blood and sputum samples predicted the therapeutic response and may indicate its potential utility as a biomarker. Changes were also observed in the microbial composition of subsequent AECOPD episodes after treatment, with the identification of potentially pathogenic microorganisms with unusual patterns of intrinsic antibiotic resistance that required treatment. This increases our knowledge about how azithromycin treatment affects the inflammatory response and bacteria selection in the airways, together with the implications for future COPD exacerbations.

TABLE 3 Inflammatory changes at baseline and after 3 and 12 months of treatment with azithromycin.

Parameters	SERUM				SPUTUM			
	Baseline	3 mo.	12 mo.	p-value	Baseline	3 mo.	12 mo.	p-value
Fibrinogen, mmol/L	4.53 (1.4)	3.85 (0.8)	2.91 (0.99)	0.168	–	–	–	–
CRP, mg/L	15.9 (30.2)	9.42 (21)	5.46 (6.08)	0.142	–	–	–	–
Leukocytes, cels/ μ L	8,844 (3,128)	7,580 (1,830)	7,000 (1,480)	0.051	–	–	–	–
Eosinophils, cels/ μ L	188 (167)	200 (152)	223 (167)	0.801	–	–	–	–
TNFR2, pg/mL	1,386 (476)	1,246 (535)	1,148 (419)	0.001*	1,590 (1,978)	1,073 (1,638)	624 (886)	0.005*
IL-13, pg/mL	6.53 (12.5)	5.33 (8.64)	2.21 (2.42)	0.021*	86.1 (83.6)	47.7 (44.1)	69.1 (102)	0.339
IL-5, pg/mL	2.71 (7.69)	2.06 (3.25)	2.24 (1.71)	0.65	58.1 (73.2)	61.8 (91.7)	94.5 (149)	0.124
IL-6, pg/mL	3.8 (4.70)	2.95 (2.81)	1.34 (3.14)	0.003*	1,993 (3,744)	1,653 (1,869)	1,664 (1,969)	0.568
IL-8, pg/mL	9.17 (5.04)	8.88 (3.95)	8.23 (3.26)	0.26	212,852 (648,466)	97,954 (70,014)	98,734 (98,487)	0.169

Data are expressed as mean (SD). * $p < 0.05$ significant (in bold). CRP, C-reactive protein; IL, interleukin; Mo., months; TNFR2, tumor necrosis factor receptor 2.

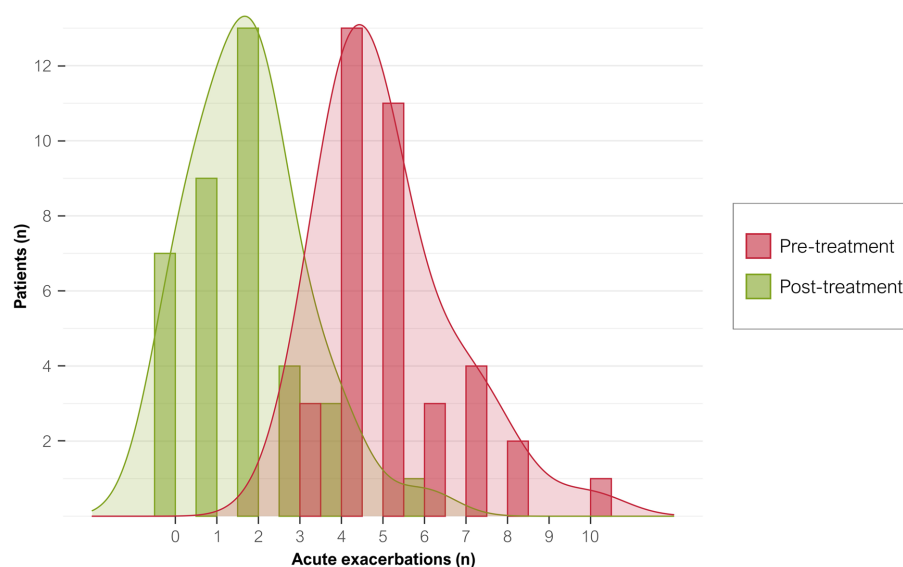


FIGURE 2

Distribution of exacerbations per patient before and after treatment. Graph shows the number of exacerbations in the year before starting azithromycin treatment (red bars) and after 12 months of treatment (green bars).

As expected, continuous azithromycin treatment in patients with severe COPD and frequent exacerbations led to fewer exacerbations (up to 66%) after 1 year of treatment, even using a dosage of 250 mg 3 times a week. From the limited published evidence available (only two clinical trials (5, 6), both carried out in a different profile of COPD patients) does not allow a categorical and unanimous recommendation for the type of patient chosen and the dose to be administered (8). In other chronic inflammatory respiratory diseases, such as bronchiectasis, the dosage of 250 mg 3 times a week for 1 year has been used successfully, minimizing side effects. Moreover, in airways of these patients, this dosage has demonstrated a significant reduction in host neutrophilic inflammatory response (11). The high effectiveness in the control of exacerbations achieved in this study and the few side effects also support the use of this dosage in clinical practice in COPD

patients. Previous studies have shown that patients with more severe COPD and higher numbers of exacerbations during the previous year had higher reductions in AECOPD with azithromycin treatment (5–7). These results are consistent with the high effectiveness observed in this study and support the need to identify candidates for preventive therapy accurately and to avoid the use of azithromycin in patients with less severe disease who may not benefit. However, it was notable that neither baseline lung function nor the number of previous exacerbations predicted treatment response in this cohort. Instead, baseline elevations of IL-8 in both blood and sputum samples predicted the therapeutic response, suggesting that this could be a useful biomarker in clinical practice (12, 13).

Another novel finding was the improved arterial oxygenation in patients after 12 months of treatment with azithromycin, both at

TABLE 4 AECOPD characteristics before and after 1 year of azithromycin treatment.

	Pre-treatment	Post-treatment	p-value
Patients with AECOPD, n (%)	37 (100)	30 (81.1)	0.0054*
AECOPD cases (mean $\pm$ SD)	188 (5.1 $\pm$ 1.6)	65 (1.8 $\pm$ 1.4)	<0.0001*
AECOPD intensity, n (%)			
Severe	26 (13.8)	10 (15.4)	0.8370
Moderate	162 (86.2)	55 (84.6)	0.8370
Hospitalization, n (%)	26 (13.8)	10 (15.4)	0.8370
Days of hospital stay (mean $\pm$ SD)	184 (7.7 $\pm$ 3.7)	74 (12.3 $\pm$ 14.7)	0.0709
Microbiology pattern AECOPD, n (%)			
Cultured samples	91 (48.4)	39 (60.0)	0.1069
Uncultured samples**	97 (51.6)	26 (40.0)	0.1069
Potential pathogenic bacteria (%)#			
<i>Haemophilus influenzae</i>	28 (30.8)	4 (10.3)	0.0128*
<i>Moraxella catarrhalis</i>	22 (24.2)	1 (2.6)	0.0031*
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12 (13.2)	5 (12.8)	0.9547
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	6 (6.6)	5 (12.8)	0.2424
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	2 (2.2)	4 (10.3)	0.0448*
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	2 (2.2)	2 (5.1)	0.3753
<i>Corynebacterium</i> spp.	2 (2.2)	2 (5.1)	0.3753
<i>Enterobacter</i> spp.	2 (2.2)	0 (0)	0.3508
<i>Escherichia coli</i>	2 (2.2)	0 (0)	0.3508
<i>Serratia marcescens</i>	2 (2.2)	0 (0)	0.3508
<i>Citrobacter freundii</i>	1 (1.1)	0 (0)	0.5111
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1 (1.1)	0 (0)	0.5111
<i>Pasteurella multocida</i>	1 (1.1)	0 (0)	0.5111
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	0 (0)	1 (2.6)	0.1252
Normal URT bacterial microbiota	12 (13.2)	17 (43.6)	<0.0001*

**Low quality sputum or no expectoration; #more than one microorganism was isolated in some samples; * $p < 0.05$ significant (in bold). AECOPD, acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease; URT, upper respiratory tract.

rest and after exercise, which was associated with effective control of AECOPD. To the best of our knowledge, gas exchange analysis has not been evaluated in studies of azithromycin in patients with COPD. Given that exercise tolerance and lung functional parameters did not improve with azithromycin therapy, this indicates a dissociation between systemic functional data and gas exchange. There are some mechanisms through which azithromycin may improve gas exchange in patients with COPD. The most important is provided by the drug's anti-inflammatory properties, which reduce the chronic inflammatory response that occurs in the lungs of COPD patients. The decrease in inflammatory markers in blood and sputum after starting prolonged treatment with azithromycin would indicate less airway inflammation and, as a result, an improvement in the pulmonary ventilation-perfusion ratios of treated patients, which presumably contributes to the improvement of gas exchange. In addition, azithromycin can modulate the immune response in the lungs, which may help reduce inflammation; finally, by reducing the frequency and severity of exacerbations, further lung damage can be prevented, leading to more effective lung function.

After analyzing the inflammatory parameters in serum and sputum samples, we observed a numerical improvement in most variables. This was particularly notable in the significant reductions of serum IL-13 and IL-6, as well as serum and sputum TNFR2, after 12 months of treatment. The decreased inflammatory response was more consistent in serial serum determinations than in sputum determinations. Moreover, our predictive models showed that high inflammatory marker and IL-8 levels at baseline predicted a good response to treatment. These immunomodulatory and anti-inflammatory effects of macrolides are well described in the literature (14, 15). Of the interleukin profiles analyzed in this study, IL-8 and TNFR2 presented as the major inflammatory mediators in the immunomodulatory response to azithromycin in patients with COPD. Studies indicate that macrolides take part in proinflammatory cytokine suppression (16–18) and inhibit the transcription and liberation of IL-8, which is important to neutrophil chemotaxis (19). Azithromycin has also been shown to inhibit TNF α -induced production of IL-8 via the JNK signaling pathway and to inhibit MUC5AC production and MMP9. These factors combine to reduce mucus production, which is beneficial for patients with COPD (18).

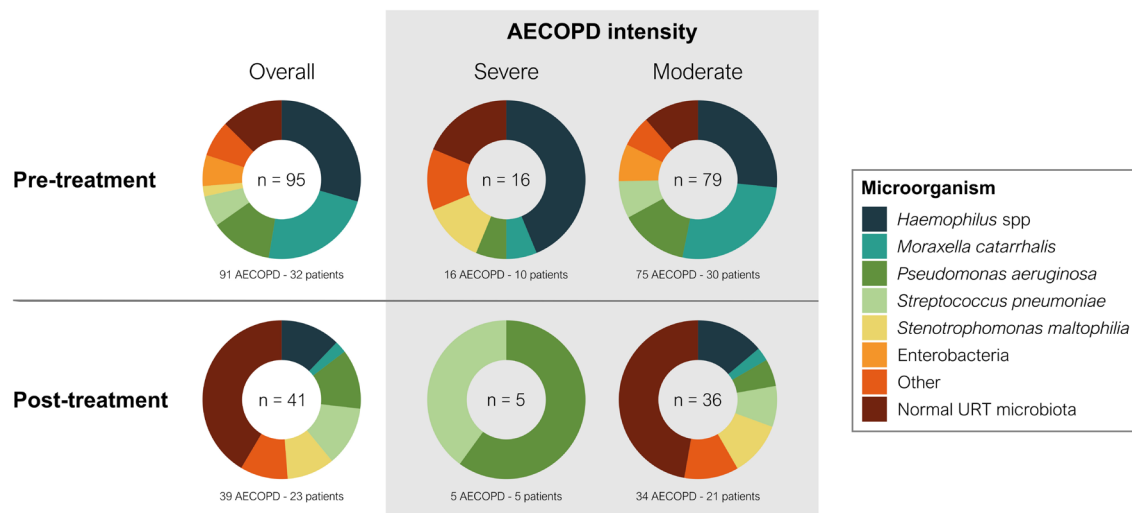


FIGURE 3
Change of microbiology by AECOPD severity during long-term azithromycin therapy. The number inside each donut chart indicates the number of bacterial isolates. Pre-treatment indicates the year before azithromycin treatment, and post-treatment indicates the first year of azithromycin treatment.

An animal model further showed that TNF α levels were reduced after macrolide treatment, and that this was associated with inhibited neutrophil recruitment in the lungs (12). Other effects of macrolides on cytokines include the modulation of dendritic cells by inhibiting IL-6 and stimulating IL-10 (13). In addition, a potential role of azithromycin in the T helper 2 (Th2) inflammatory pathway has been described, with evidence that it inhibits the expression of different IL-13-induced genes to reduce mucus expression (i.e., MUC5AC) (20). Overall, our results therefore support previous findings, showing a reduction in cytokine levels associated with neutrophil and eosinophil inflammatory pathways. These help to resolve acute infections and reduce exacerbations in patients with chronic airway diseases.

Despite the significant reduction in exacerbations under continuous azithromycin treatment, some patients still had further AECOPD episodes. Although these patients had fewer hospitalizations, they required more days in hospital to treat severe AECOPD. They also showed changes in the patterns of microbiological isolates in sputum samples after continuous azithromycin treatment, with fewer frequent (*H. influenzae* and *M. catarrhalis*) and more potentially pathogenic microorganisms with unusual patterns of intrinsic antibiotic resistance that required treatment (e.g., *S. maltophilia* or *Achromobacter xylosoxidans* in 15% of isolates). This has clear implications when selecting empirical antibiotics for residual AECOPDs in patients receiving continuous azithromycin. Viral infections usually act as the trigger of the exacerbation, but no routine study of viral infections was performed in our study. Further research is therefore required.

Although it was not the scope of our study, many antibiotic resistance mechanisms have been described among the common microorganisms after continuous macrolide treatment (21–24). Indeed, the antimicrobial properties of azithromycin seem to affect the respiratory microbiota, and this may change the clinical evolution of COPD. Future studies should therefore look at the impact of

limiting the use of some antibiotics in future AECOPD episodes based on the resistance mechanisms that develop after continuous azithromycin therapy.

The main limitation of the present study is the small sample size and absence of a control group. However, we did not want to demonstrate the efficacy of the treatment with azithromycin in a clinical trial. Instead, we wanted to analyze the effectiveness of azithromycin in real-world settings among patients with severe COPD (e.g., older, comorbidities, and frequent exacerbations), who clinical trials might miss, and to study the role of azithromycin on inflammation and bacterial isolates in these cases.

In conclusion, continuous azithromycin treatment for patients with severe COPD, comorbidities, and frequent exacerbations not only significantly reduces exacerbation and severity rates after 1 year of treatment but also improves gas exchange. Changes are also seen in microorganism patterns and inflammatory responses after treatment. Of note, high serum and sputum IL-8 levels at baseline also appear to predict a good clinical response to azithromycin and may indicate its potential utility as a biomarker. If proven, IL-8 as could be used to improve patient selection and reduce microbial resistance in clinical practice.

Data availability statement

The original contributions presented in the study are included in the article/[Supplementary material](#), further inquiries can be directed to the corresponding authors.

Ethics statement

The studies involving human participants were reviewed and approved by local ethics committee (Comité Ética Investigación Clínica, CEIC, ref. SSP-AZI-2016-01). The patients/participants

provided their written informed consent to participate in this study.

Author contributions

EC participated in patient's inclusion, statistical analysis, figure preparation, data interpretation, and manuscript drafting. DH participated in the study design, patient's inclusion, statistical analysis, data interpretation, and obtaining funding. CM and AM participated in the study design, patient's inclusion, and data interpretation. AC-S participated in sputum analysis, figure and table preparation, and data interpretation. XP participated patient's inclusion and data interpretation. MG-N participated in sputum analysis and ELISA experiments. SM participated in sputum analysis, data interpretation, and critical revision of the manuscript. SS contributed to the study concept and design, patient inclusion, funding, study supervision, data interpretation, manuscript drafting, and critical revision of the manuscript for important intellectual content. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

Funding

The research was funded by the Instituto de Salud Carlos III (grant PI20/00777 and PI16/00977), co-funded by the European Regional Development Fund (ERDF) "A Way to Build Europe" and grants from Menarini to SS and from SEPAR 088/2016, SEPAR 1116/2020 and FUCAP-2017.

References

1. Suissa S, Dell'Aniello S, Ernst P. Long-term natural history of chronic obstructive pulmonary disease: severe exacerbations and mortality. *Thorax*. (2012) 67:957–63. doi: 10.1136/thoraxjnl-2011-201518
2. Celli BR, Fabbri LM, Aaron SD, Agusti A, Brook R, Criner GJ, et al. An updated definition and severity classification of chronic obstructive pulmonary disease exacerbations: the Rome proposal. *Am J Respir Crit Care Med*. (2021) 204:1251–8. doi: 10.1164/rccm.202108-1819PP
3. Marchetti N, Criner GJ, Albert RK. Preventing acute exacerbations and hospital admissions in COPD. *Chest*. (2013) 143:1444–54. doi: 10.1378/chest.12-1801
4. Ni W, Shao X, Cai X, Wei C, Cui J, Wang R, et al. Prophylactic use of macrolide antibiotics for the prevention of chronic obstructive pulmonary disease exacerbation: a meta-analysis. *PLoS One*. (2015) 10:e0121257. doi: 10.1371/journal.pone.0121257
5. Albert RK, Connett J, Bailey WC, Casaburi R, Cooper JA Jr, Criner GJ, et al. Azithromycin for prevention of exacerbations of COPD. *N Engl J Med*. (2011) 365:689–98. doi: 10.1056/nejmoa1104623
6. Uzun S, Djamin RS, Kluytmans JAJW, Mulder PGH, van't Veer NE, Ermens AAM, et al. Azithromycin maintenance treatment in patients with frequent exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease (COLUMBUS): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Respir Med*. (2014) 2:361–8. doi: 10.1016/S2213-2600(14)70019-0
7. Pomares X, Montón C, Huertas D, Marín A, Cuevas E, Casabella A, et al. Efficacy of low-dose versus high-dose continuous cyclic azithromycin therapy for preventing acute exacerbations of COPD. *Respiration*. (2021) 100:1070–7. doi: 10.1159/000517781
8. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease I. *Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease*. (2020). Available at: (www.goldcopd.org).
9. Garrod R, Bestall JC, Paul EA, Wedzicha JA, Jones PW. Development and validation of a standardized measure of activity of daily living in patients with severe COPD: the London chest activity of daily living scale (LCADL). *Respir Med*. (2000) 94:589–96. doi: 10.1053/RMED.2000.0786
10. Domenech A, Puig C, Martí S, Santos S, Fernández A, Calatayud L, et al. Infectious etiology of acute exacerbations in severe COPD patients. *J Infect*. (2013) 67:516–23. doi: 10.1016/j.jinf.2013.09.003
11. Keir H, Shoemark A, Dicker A, Perea L, Pollock J, Giam YH, et al. Neutrophil extracellular traps, disease severity, and antibiotic response in bronchiectasis: an international, observational, multicohort study. *Lancet Respir Med*. (2021) 9:873–84. doi: 10.1016/S2213-2600(20)30504-X
12. Tsai WC, Rodríguez ML, Young KS, Deng JC, Thannickal VJ, Tateda K, et al. Azithromycin blocks neutrophil recruitment in pseudomonas endobronchial infection. *Am J Respir Crit Care Med*. (2004) 170:1331–9. doi: 10.1164/rccm.200402-200OC
13. Sugiyama K, Shirai R, Mukae H, Ishimoto H, Nagata T, Sakamoto N, et al. Differing effects of clarithromycin and azithromycin on cytokine production by murine dendritic cells. *Clin Exp Immunol*. (2007) 147:540–6. doi: 10.1111/j.1365-2249.2007.03299.x
14. Friedlander AL, Albert RK. Chronic macrolide therapy in inflammatory airways diseases. *Chest*. (2010) 138:1202–12. doi: 10.1378/chest.10-0196
15. Martinez FJ, Curtis JL, Albert R. Role of macrolide therapy in chronic obstructive pulmonary disease. *Int J COPD*. (2008) 3:331–50. doi: 10.2147/copd.s681
16. Uli O, Erakovi V, Parnham MJ. Anti-inflammatory effects of macrolide antibiotics. *Eur J Pharmacol*. (2001) 429:209–29. doi: 10.1016/S0014-2999(01)01321-8
17. Rubin B, Tamaoki J. Macrolide antibiotics as biological response modifiers. *Curr Opin Investig Drugs*. (2000) 1:169–72.
18. Yang J. Mechanism of azithromycin in airway diseases. *J Int Med Res*. (2020) 48:030006052093210. doi: 10.1177/0300060520932104
19. Takizawa H, Desaki M, Ohtoshi T, Kawasaki S, Kohyama T, Sato M, et al. Erythromycin modulates IL-8 expression in normal and inflamed human bronchial epithelial cells. *Am J Respir Crit Care Med*. (1997) 156:266–71. doi: 10.1164/ajrccm.156.1.9612065

Acknowledgments

The authors thank the nursing staff of the Day hospitals for their dedication to patient care. We also thank to the Institut d'Investigació Biomedica de Bellvitge for their technical assistance, as well as the CERCA Programme/Generalitat de Catalunya for providing institutional support.

Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Supplementary material

The Supplementary material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmed.2023.1229463/full#supplementary-material>

20. Mertens TCJ, Hiemstra PS, Taube C. Azithromycin differentially affects the IL-13-induced expression profile in human bronchial epithelial cells. *Pulm Pharmacol Ther.* (2016) 39:14–20. doi: 10.1016/j.pupt.2016.05.005
21. Roberts MC. Update on macrolide-lincosamide-streptogramin, ketolide, and oxazolidinone resistance genes. *FEMS Microbiol Lett.* (2008) 282:147–59. doi: 10.1111/j.1574-6968.2008.01145.x
22. Serisier DJ. Risks of population antimicrobial resistance associated with chronic macrolide use for inflammatory airway diseases. *Lancet Respir Med.* (2013) 1:262–74. doi: 10.1016/S2213-2600(13)70038-9
23. Yamaya M, Azuma A, Takizawa H, Kadota JI, Tamaoki J, Kudoh S. Macrolide effects on the prevention of COPD exacerbations. *Eur Respir J.* (2012) 40:485–94. doi: 10.1183/09031936.00208011
24. Carrera-Salinas A, González-Díaz A, Ehrlich RL, Berbel D, Tubau F, Pomares X, et al. Genetic adaptation and acquisition of macrolide resistance in *Haemophilus* spp. during persistent respiratory tract colonization in chronic obstructive pulmonary disease (COPD) patients receiving long-term azithromycin treatment. *Microbiol Spectr.* (2023) 11:e0386022. doi: 10.1128/SPECTRUM.03860-22

Discussió

La present tesi doctoral pretén ampliar el coneixement dels mecanismes inflamatoris i de senyalització purinèrgica que regulen els canvis fisiopatològics que caracteritzen la complexitat de l'MPOC. Per això, s'ha estudiat aquests mecanismes tant en estadis inicials de la malaltia (fumadors sense obstrucció i obstrucció lleu), com en estadis avançats, analitzant les diferents respostes cel·lulars (T1 i T2) i en diferents situacions clíniques (estabilitat vs. agudització). S'ha avaluat l'expressió gènica i proteica dels principals enzims que hidrolitzen l'ATP extracel·lular i marcadors inflamatoris en mostres de malalts amb MPOC (teixit pulmonar, artèries sistèmiques, esput i sèrum) i en un model animal d'emfisema induït pel fum del tabac. També s'ha estudiat l'efecte que tenen certs fàrmacs sobre la inflamació i l'expressió dels principals enzims de la via purinèrgica. Els resultats de la present tesi obren la porta a desenvolupar noves línies d'investigació que permetrien, en el futur, avançar en l'anàlisi de les diferències per fenotip clínic en l'MPOC, identificar als pacients d'acord amb la seva resposta biològica i buscar noves dianes terapèutiques, indispensable en una malaltia crònica sense tractaments curatius disponibles.

Implicació de la via purinèrgica en l'MPOC

En les **fases inicials de l' MPOC** (GOLD I-II), hem caracteritzat per primera vegada els patrons d'expressió dels principals gens involucrats en la via purinèrgica comparant, en els mateixos pacients, la seva expressió en teixit pulmonar i en artèries intercostals, per tal d'identificar els mecanismes que inicien i perpetuen els canvis patològics en aquesta malaltia amb afectació principalment pulmonar, però també sistèmica. Utilitzant low-density TaqMan arrays, hem trobat un desequilibri entre els enzims que regulen els nivells extracel·lulars de l'ATP i d'adenosina, fet que afavoreix l'acumulació de l'ATP (la qual actua com a molècula proinflamatòria a través dels receptors P2), i

nivells baixos d'adenosina (la qual actua com a molècula antiinflamatòria a través dels receptors P1) i que, per tant, causarien un estat d'inflamació mantinguda a escala pulmonar en aquests pacients (145).

Els nostres resultats suggereixen que una disminució de l'expressió dels enzims que regulen la degradació de l'ATP (CD39) i dels enzims productors d'adenosina (CD73) al pulmó i a les artèries sistèmiques, podria produir un estat proinflamatori en els pacients amb MPOC en fases inicials. A diferència dels pacients amb MPOC, en fumadors sense obstrucció, tot i que els enzims que degraden l'ATP es troben també disminuïts, els enzims que afavoreixen la producció d'adenosina es troben augmentats, suggerint un mecanisme compensatori en resposta al fum del tabac que no s'observa quan ja hi ha una obstrucció pulmonar establerta. Per tant, en el cas dels fumadors sense obstrucció, aquest desequilibri, es corregiria amb l'augment de l'expressió de NT5E, el gen que codifica el principal enzim de la via purinèrgica (NT5E/CD73) que regula la producció d'adenosina extracel·lular.

En les fases més avançades de l'MPOC (GOLD III-IV), hem analitzat per primer cop, els enzims de la via purinèrgica en fenotips definits pel nombre d'AMPOC: MPOC no aguditzador (< 2 AMPOC/any) i MPOC amb aguditzacions freqüents (>2AMPOC/any) tant en mostres d'esput com en sèrum en situació d'estabilitat clínica.

Tot i que no vam poder trobar CD39 ni en esput ni en sèrum tot i utilitzar diferents mètodes, si vam poder analitzar CD73, el principal productor d'adenosina (146). Els nostres resultats mostren nivells més alts de CD73 en sèrum de pacients amb MPOC no aguditzadors respecte els pacients aguditzadors en situació d'estabilitat. Per contra, vam observar nivells més alts de CD73 en esput en MPOC aguditzador estable que en MPOC no aguditzador. No vam trobar correlació entre els nivells de CD73 en sèrum i en esput en els diferents fenotips clínics. Per altra banda, al comparar la fase aguda vs. l'estable en els pacients aguditzadors, vam observar nivells de CD73 en sèrum i esput disminuïts en la situació aguda respecte a l'estable. Aquests resultats aparentment

contraris en l'aïllament de CD73 entre pacients amb MPOC no aguditzador i aguditzador i en AMPOC, podrien explicar-se per diferents hipòtesis: 1) la via purinèrgica podria actuar de manera diferent depenent del teixit estudiat (sèrum i esput), 2) el fenotip aguditzador té una malaltia més greu i l'eix CD39/CD73 podria estar més disfuncional; 3) la via purinèrgica té un paper diferent durant la inflamació aguda i crònica. Aquests resultats van en línia amb les nostres troballes en les fases inicials de l'MPOC en les que es va observar un augment de l'expressió de *NT5E* (gen que codifica CD73) en teixit pulmonar dels pacients fumadors sense obstrucció i no en el teixit d'artèries sistèmiques dels mateixos pacients i, també donen suport a la hipòtesi que l'adenosina produïda per la hidròlisi de l'AMP per part de CD73, ajudaria a disminuir l'entorn inflamatori de la malaltia tal com s'ha descrit prèviament a la literatura existent sobre la via purinèrgica.

El tabac indueix l'acumulació de l'ATP extracel·lular a la via respiratòria assolint nivells alts d'ATP en pacients amb MPOC, fins i tot, quan s'ha abandonat l'hàbit tabàquic (120). Mitjançant l'activació dels receptors P2, l'ATP indueix als macròfags i neutròfils a la secreció de molècules proinflamatòries i mediadors de degradació tissular contribuint així, a un estat d'inflamació crònica en l'MPOC (117). Per altra banda, l'adenosina té funcions immunomoduladores, per tant, el seu paper pot ser important en l'MPOC. De fet, els receptors d'adenosina s'han proposat com a possibles dianes terapèutiques en el tractament de l'MPOC (147). No obstant això, els estudis realitzats fins ara, s'han centrat en etapes més avançades de la malaltia (estadis GOLD III i IV) per avaluar el paper de l'ATP i l'adenosina en la fisiopatologia de l'MPOC. Donat el doble paper de l'adenosina segons la situació, és a dir, actuant com a molècula antiinflamatòria en processos associats amb malalties pulmonars agudes (148,149) o com a agent proinflamatori amb funcions de remodelació tissular en malalties pulmonars cròniques (150), és important distingir entre les etapes inicials i tardanes de l'MPOC a l'hora de determinar quin paper desenvolupa l'adenosina en aquesta malaltia. A més, alguns receptors d'adenosina també actuen com a molècules anti o proinflamatòries segons la situació de dany pulmonar agut o crònic davant la qual s'activen (151).

Altres estudis, realitzats tant en models animals com humans, recolzen els nostres resultats, ja que, han evidenciat una disminució en l'expressió de l'enzim CD39 pulmonar en fases inicials de l'MPOC (123,152). Per contra, en altres estudis, s'ha observat una sobreexpressió de l'enzim CD39 en pacients amb MPOC en situació d'agudització de l'MPOC en comparació amb pacients amb situació d'estabilitat i pacients sans (122). El grup de *Lazar et al.* també ha trobat nivells elevats de CD39 en el rentat broncoalveolar i en esputs de pacients amb MPOC comparant-los amb fumadors i no fumadors (121). Aquests resultats, aparentment contradictoris, poden ser atribuïbles a què s'han utilitzat diferents mostres en els estudis o bé al fet, d'haver-se realitzat en diferents situacions o fases de la malaltia. L'expressió de CD39 i CD73 davant d'una situació aguda com una infecció respiratòria en l'agudització de l'MPOC o el consum actiu de tabac pot ser diferent de l'expressió d'aquests enzims, en context de dany crònic pulmonar.

Nosaltres hem observat que els pacients fumadors sense obstrucció expressen més gens que afavoreixen un estat antiinflamatori que els pacients amb MPOC, tant en teixit pulmonar com en artèries sistèmiques, comparat amb els no fumadors. Un cop establerta l'MPOC, hem evidenciat que els pacients amb fenotip no aguditzador presenten nivells més elevats de CD73 en sèrum que els pacients amb fenotip aguditzador. Aquestes troballes, tant en fases inicials com més avançades i en els diferents fenotips, suggeririen una disfunció de l'eix CD39/CD73 a mesura que avança la malaltia que conduiria a un estat d'inflamació persistent.

Interacció entre la via purinèrgica i la via del NO

La via purinèrgica no és l'única via de senyalització implicada en la fisiopatologia de l'MPOC sinó que n'hi intervenen d'altres, d'aquí el fet que l'MPOC sigui una malaltia heterogènia i complexa. Segons estudis previs, la via de senyalització de l'òxid nítric, també es troba alterada en l'MPOC a través d'una disminució de l'expressió de guanilat-

ciclasa soluble (sGC) (153,154) essent un dels mecanismes implicats en la gravetat de la malaltia (140,155). De fet, s'ha observat que l'administració d'estimuladors de la sGC (BAY 41-2272 i BAY 63-2521) en conillets d'índies i ratolins, prevenen el remodelatge vascular i el desenvolupament d'emfisema (155). Tot i que també s'ha demostrat que l'estimulació amb sGC també prevé l'estrès oxidatiu induït pel fum del tabac i disminueix la resposta inflamatòria pulmonar (141), els mecanismes moleculars que produeixen la disminució de l'emfisema no són encara del tot coneguts (156). Diversos estudis han descrit una interacció entre l'òxid nítric (NO) i l'ATP. Per exemple, *Ruiz-Stewart et al.* van mostrar que el NO i sGC estan involucrats en la demanda/subministrament d'ATP com a mediadors, produint canvis en els nivells d'ATP i regulant la senyalització de NO a través de sGC (143). A més, s'ha demostrat que l'ATP i l'ADP indueixen la síntesi d'òxid nítric endotelial (eNOS) a través dels receptors P2 (també involucrats en la via purinèrgica), augmentant la generació de NO (144).

Els resultats del nostre estudi sobre l'efecte del tractament d'un estimulador de la sGC (BAY 41-2272) sobre la via purinèrgica en un model animal d'emfisema en teixit pulmonar, augmenten l'evidència sobre la interacció entre aquestes dues vies de senyalització i l'efecte d'aquest tractament sobre la via purinèrgica. En el nostre estudi, vam demostrar una menor expressió gènica dels principals enzims de la via purinèrgica, tant de *ENTPD1* (gen que codifica CD39) com de *NT5E* (gen que codifica CD73) pulmonar tant dels grups d'animals amb emfisema (fumadors i exfumadors) en comparació amb el grup control (animals no exposats al fum del tabac i sense emfisema). El tractament amb un estimulador de la sGC, augmentava els nivells de *ENTPD1* i *NT5E* en la majoria dels grups (inclosos els controls), indicant un efecte d'aquest tractament sobre la via purinèrgica. Tot i que els nostres resultats no van ser estadísticament significatius en la majoria dels grups, en part al baix nombre de mostres per tractar-se d'un model animal, els resultats recolzen la hipòtesi que la via purinèrgica, a través dels seus principals enzims, pot tenir un paper en la patogènesi de l'MPOC i que, el tractament amb un estimulador de la sGC té tendència a incrementar l'expressió gènica d'aquests enzims, el que apunta a una interacció d'ambdues vies de senyalització i a un potencial efecte

terapèutic de la sGC a través de la via purinèrgica aplicable als pacients amb MPOC. Aquests resultats estan en línia amb altres estudis que suggereixen que la via purinèrgica està implicada en el desenvolupament de l'MPOC i també amb els resultats que hem obtingut sobre l'expressió gènica descrits prèviament en el nostre estudi en pacients en fases inicials i tardanes de l'MPOC, en els que observàvem un desequilibri en l'expressió gènica de *ENTPD1* i *NT5E* i els enzims purinèrgics (CD39 i CD73) promovent un estat d'inflamació crònica.

L'ús d'un estimulador del guanilat ciclasa com a tractament de l'MPOC, mostra una tendència a restablir els nivells del gen *ENTPD1* tant en el grup de conillets d'índies fumador com l'exfumador, inclús també en el grup control. Tot i observar-se aquesta tendència a restablir els nivells de *ENTPD1*, la hipòtesi que el tractament amb BAY 41-2272 podria actuar augmentant l'expressió d'*ENTPD1* i revertint la disminució d'*ENTPD1* i *NT5E* observada després de l'exposició a fum de tabac no es pot confirmar amb el nostre estudi, i seria necessari explorar en futurs estudis experimentals el paper que podria jugar aquest tractament per prevenir i tractar l'emfisema. D'altra banda, l'efecte del tractament amb BAY 41-2272 sobre l'expressió de *NT5E* va ser menys evident, ja que la seva expressió va romandre gairebé inalterada en els grups control i el grup de conillets d'índies exfumador després del tractament. En canvi, l'expressió de *NT5E* es va restaurar parcialment en el grup de fumadors. Aquestes diferències en *NT5E* poden deure's a la durada de l'exposició al fum del tabac (3 mesos en el grup exfumador vs. 6 mesos en el grup fumador). Els resultats de l'expressió proteica analitzats per immunohistoquímica i western blot es corresponen amb els dels estudis d'expressió gènica, ja que l'expressió proteica de CD39 i CD73 va augmentar després del tractament amb BAY 41-2272 en la majoria dels grups de l'estudi.

El tractament amb un estimulador de sGC ja s'ha avaluat prèviament en l'MPOC, on s'ha demostrat que redueix l'estrès oxidatiu i atenua la resposta inflamatòria als pulmons induïda pel fum del tabac (141,142). El tractament amb l'estimulador de sGC també té efectes beneficiosos sobre la vasculatura pulmonar, reduint la pressió arterial

pulmonar i la hipertròfia ventricular dreta. Els nostres resultats suggereixen un nou efecte beneficiós del tractament amb un estimulador de sGC en l'MPOC que augmenta l'expressió gènica i proteica d'*ENTPD1/CD39* i *NT5E/CD73* en teixit pulmonar, reduint així els nivells d'ATP extracel·lular i el consegüent estat d'inflamació. Tot i que encara no està ben establert com la senyalització purinèrgica i NO interactuen en la modulació dels nivells d'ATP, o si les dues vies comparteixen alguns mecanismes de senyalització, els nostres resultats suggereixen que l'estimulació de sGC podria activar la via purinèrgica, augmentant així l'expressió d'*ENTPD1/CD39* i *NT5E/CD73* en teixit pulmonar i reduint consegüentment els nivells d'ATP, disminuint així, l'entorn inflamatori en l'MPOC. Altres maneres de mesurar els nivells d'ATP, com el condensat d'aire exhalat, s'han utilitzat prèviament, però no s'han trobat diferències entre pacients sans i pacients amb MPOC, suggerint que els nivells d'ATP en les vies respiratòries estan sota el control complex de múltiples factors (157). Davant d'aquests resultats, es necessiten més estudis per aclarir més la relació entre les vies de senyalització purinèrgica i NO en l'MPOC.

Via purinèrgica i inflamació pulmonar i sistèmica en l'MPOC

Pel que fa als **tipus d'inflamació**, tot i que clàssicament en l'MPOC són tipus 1 o neutrofílic (5,8), es coneix que en un percentatge no menyspreable (30-50%) de pacients amb MPOC, la inflamació de tipus 2 o eosinofílica té un paper més rellevant (11). Per l'estudi dels diferents mecanismes inflamatoris implicats en l'MPOC, s'han analitzat diferents marcadors tant d'inflamació neutrofílica (IL-6, IL-8, PCR, TNF α ...) com d'inflamació eosinofílica (IL-13, IL-4...) entre d'altres. A més, s'ha avaluat la inflamació tant a nivell pulmonar com sistèmic.

En etapes inicials de l'MPOC, en mostres de teixit pulmonar i artèries sistèmiques hem trobat, com era esperable, que paràmetres inflamatoris com la PCR i el recompte de leucòcits i neutròfils en sang, eren més alts en pacients amb MPOC que en fumadors sense obstrucció pulmonar tot i que no va ser estadísticament significatiu. Per altra banda, hem trobat una expressió significativament més elevada d'IL-13 en

pacients amb MPOC i en fumadors sense obstrucció en teixit pulmonar comparat amb el grup control, suggerint una resposta inflamatòria tipus T2 provocada pel fum del tabac. En canvi, no s'ha trobat expressió de IL-13 a les artèries intercostals en cap dels dos grups fet que, podria suggerir que aquesta inflamació T2 no és tan rellevant a nivell vascular sistèmic en etapes inicials de la malaltia. Tampoc hem trobat relació entre la IL-13 i el desequilibri dels enzims purinèrgics (CD39/CD73). Pel que fa a IL-4, no vam poder avaluar cap amplificació d'aquest gen en el pulmó o les artèries intercostals ni tampoc vam poder determinar si això era perquè no hi havia expressió o si es devia a problemes metodològics. També es va analitzar CCL18, una quimiocina involucrada en els canvis vasculars (31), la qual va mostrar una expressió reduïda en els pulmons i les artèries sistèmiques de pacients amb MPOC similar al que ja s'ha evidenciat prèviament (158). Altres estudis han trobat algunes similituds en els perfils d'expressió d'altres gens entre pacients amb MPOC moderada i fumadors sense obstrucció, que no s'han observat en pacients amb MPOC severa (159).

En fases més avançades de la malaltia, la nostra principal troballa, ha estat una correlació positiva entre CD73 en esput i el nombre d'eosinòfils en sèrum, suggerint una possible implicació de la via purinèrgica en la inflamació eosinofílica en pacients amb MPOC. Es coneix que, tant en situacions d'estabilitat com en situacions d'agudització de l'MPOC, es troben nivells d'eosinòfils elevats en l'esput (28) i que aquests eosinòfils, són capaços de secretar ATP i estimular mediadors inflamatoris mitjançant l'activació dels receptors P2Y2 (134). La secreció d'ATP produïda pels eosinòfils activaria la via purinèrgica per degradar ATP, explicant els nivells augmentats de CD73 en esput trobats en aquest estudi. Diferents subtipus d'eosinòfils en sèrum i esput podrien explicar que no hàgim trobat una correlació entre CD73 en sèrum i eosinòfils, ja que s'han descrit diferents eosinòfils (els eosinòfils inflamatoris i els residents) en mostres de sang de MPOC. L'expressió d'aquests diferents subtipus d'eosinòfils, també és diferent en l'MPOC i en l'asma (160), expressant-se més eosinòfils de tipus inflamatoris en l'asma i sent el paper de cadascun d'ells diferent en ambdues malalties respiratòries. No vam trobar diferències en el perfil inflamatori entre pacients amb MPOC no aguditzador i pacients aguditzador en fase estable. Durant l'AMPOC, com era d'esperar, els leucòcits,

neutròfils, fibrinogen, PCR i NT-proBNP es van incrementar en comparació amb MPOC aguditzador en fase estable. També vam trobar nivells significativament més alts d'IL-6 durant l'AMPOC. L'IL-6 s'ha estudiat àmpliament en l'MPOC i sembla jugar un paper important en el manteniment de la inflamació crònica i en augmentar el risc de mort (161).

Efectes del tractament amb macròlids sobre la inflamació i la via de senyalització purinèrgica

Una troballa rellevant d'aquesta tesi, és el fet que, elevacions basals de la IL-8 tant en mostres de sang com d'esput en pacients amb MPOC greu i aguditzadors freqüents, prediuen la resposta terapèutica al tractament continu amb azitromicina i, poden indicar la seva utilitat potencial com a biomarcador útil en la pràctica clínica (76,78). A més, dels perfils d'interleucines analitzat en aquest estudi (T1 i T2), la IL-8 i el TNFR2 van ser els principals mediadors inflamatoris amb major resposta immunomoduladora a l'azitromicina. Després d'analitzar els paràmetres inflamatoris en mostres de sèrum i esput, vam observar una millora numèrica en la majoria de les variables. Això va ser particularment notable en IL-13 i IL-6 mostrant una reducció significativa de la seva expressió sèrica, i també ho va ser en l'expressió de TNFR2 en sèrum i esput després de 12 mesos de tractament. La millora en la resposta inflamatòria, va ser més consistent en les determinacions sèriques seriades que en les determinacions d'esput. A més, els nostres models predictius van mostrar que tenir nivells elevats dels marcadors inflamatoris i de IL-8 en el moment basal, prediuen una bona resposta al tractament. Aquests efectes immunomoduladors i antiinflamatoris dels macròlids han estat ben descrits a la literatura (65,66). Els estudis indiquen que els macròlids participen en la supressió de les citocines proinflamatòries (73,74,162) i inhibeixen la transcripció i alliberament de la IL-8, que és important per a la quimiotaxi de neutròfils (19). També s'ha demostrat que l'azitromicina inhibeix la producció de IL-8 induïda per TNF α a través de la via de senyalització JNK i inhibeix la producció de MUC5AC i MMP9. Aquests factors es combinen per reduir la producció de moc, la qual cosa és beneficiosa per a pacients

amb MPOC (74). Un model animal va mostrar a més que els nivells de TNF α es reduïen després del tractament amb macròlids i que això s'associava amb la inhibició del reclutament de neutròfils als pulmons (76). Altres efectes dels macròlids sobre les citocines inclouen la modulació de cèl·lules dendrítiques inhibint la IL-6 i estimulants la IL-10 (78). A més, s'ha descrit un paper potencial de l'azitromicina en la via inflammatòria de les cèl·lules T2, amb evidència que inhibeix l'expressió de diferents gens induïts per la IL-13 per reduir l'expressió de muc (és a dir, MUC5AC) (79). En conjunt, els nostres resultats donen suport a troballes prèvies que mostren una reducció dels nivells de citocines associades a les vies inflammatòries de neutròfils i eosinòfils. Aquestes reduccions de citocines, ajuden a resoldre infeccions agudes i reduir les aguditzacions en pacients amb malalties cròniques de les vies respiratòries.

Sorprenentment, tot i que no vam trobar diferències en el perfil d'expressió de marcadors inflamatoris en l'estudi de la via purinèrgica segons els diferents fenotips d'MPOC, si vam evidenciar un efecte del tractament amb azitromicina sobre l'expressió de CD73. En la fase estable, els pacients amb fenotip aguditzador que estaven en tractament amb azitromicina, tenien nivells de CD73 més elevats que els pacients sense tractament amb azitromicina. En canvi, de nou, els nivells de CD73 durant l'AMPOC disminuïen respecte a la situació d'estabilitat sent més evident en els pacients sense tractament amb azitromicina en sèrum. Aquestes troballes observades en l'expressió de CD73, suggereixen un possible efecte de l'azitromicina sobre la via purinèrgica que augmentaria els nivells de CD73 i, per tant, ajudaria a disminuir l'estat inflamatori de la malaltia.

Efectes del tractament amb macròlids sobre les aguditzacions en l'MPOC

En el nostre estudi, el tractament continu amb azitromicina en pacients amb MPOC greu i aguditzacions freqüents va disminuir el nombre d'aguditzacions (fins a un 66%) després d'un any de tractament, fins i tot utilitzant una dosi de 250 mg 3 vegades per setmana. La poca evidència científica disponible (només dos assaigs clínics (80,82),

tots dos realitzats en un perfil diferent de pacients amb MPOC) no permeten una recomanació categòrica i unànime per a qui indicar el tractament i a quina dosi administrar-la (2). En altres malalties respiratòries inflammatòries cròniques com les bronquièctasis, la dosi de 250 mg 3 vegades per setmana durant 1 any s'ha utilitzat amb èxit minimitzant els efectes secundaris del tractament amb macròlids. A més, en les vies respiratòries d'aquests pacients, aquesta dosi ha demostrat una reducció significativa en la resposta inflammatòria neutrofílica de l'hoste (163). L'alta efectivitat en el control de les aguditzacions aconseguida en aquest estudi i els pocs efectes secundaris, també donen suport a l'ús d'aquesta dosi en la pràctica clínica en pacients amb MPOC greu i aguditzadors freqüents. Els estudis anteriors han demostrat que els pacients amb MPOC més greu i un nombre més alt d'aguditzacions durant l'any anterior tenien reduccions més altes en AMPOC amb el tractament amb azitromicina (80,82,83). Aquests resultats són coherents amb l'alta efectivitat observada en aquest estudi i donen suport a la necessitat d'identificar amb precisió els candidats més adients per a aquesta teràpia preventiva i així, evitar l'ús d'azitromicina en pacients amb malalties menys greus que no se'n beneficiarien. No obstant això, cal destacar que, ni la funció pulmonar basal ni el nombre d'aguditzacions anteriors van predir la resposta al tractament en aquesta cohort.

A banda de la reducció en el número d'AMPOC, per primera vegada s'ha evidenciat la millora de l'oxigenació arterial en pacients després de 12 mesos de tractament amb azitromicina, tan en repòs com després de l'exercici, la qual cosa s'associa amb un control efectiu de les AMPOC. Fins ara, l'anàlisi de l'intercanvi de gasos no s'ha avaluat en estudis d'azitromicina en pacients amb MPOC. Donat que la tolerància a l'exercici i els paràmetres funcionals pulmonars no van millorar amb el tractament amb azitromicina, existiria una dissociació entre les dades funcionals sistèmiques i l'intercanvi de gasos. Hi ha alguns mecanismes que explicarien com l'azitromicina podria millorar l'intercanvi de gasos en pacients amb MPOC. El més important es deuria a les propietats antiinflamatòries del fàrmac, que redueixen la resposta inflammatòria crònica que es produeix als pulmons dels pacients amb MPOC. La disminució dels marcadors inflamatoris en sang i esput després d'iniciar el tractament prolongat amb azitromicina

produiria menys inflamació de les vies respiratòries i, com a resultat, una millora en les ràtios de ventilació-perfusió pulmonar dels pacients tractats, la qual cosa presumiblement contribueix a la millora de l'intercanvi de gasos. A més, l'azitromicina pot modular la resposta immunitària als pulmons, la qual cosa pot ajudar a reduir la inflamació; i finalment, reduint la freqüència i la gravetat de les aguditzacions, es pot prevenir un dany pulmonar addicional, la qual cosa condueix a una funció pulmonar més efectiva.

És àmpliament conegut el paper de l'azitromicina com a antimicrobià i com és evident, ha tingut efectes en el patró microbiològic de les aguditzacions en els pacients sota tractament continu amb azitromicina en el nostre estudi. La present tesi doctoral s'ha focalitzat en la resposta inflamatòria i l'efecte immunomodulador de l'azitromicina. Els nostres resultats mostren un canvi en el patró microbiològic dels pacients amb tractament continu amb azitromicina i, per tant, és necessari tenir en compte aquestes modificacions i possibles mecanismes de resistència a l'hora de seleccionar un tractament antibiòtic en les aguditzacions d'aquests pacients sota tractament continu amb azitromicina. És cert que, la infecció o colonització d'alguns microorganismes en la via aèria, provoquen canvis en el microbioma i promouen la resposta inflamatòria amplificant encara més la inflamació pròpia de la malaltia i contribuint en la seva progressió. Aquests resultats augmenten el coneixement sobre com el tractament amb azitromicina afecta la resposta inflamatòria i la selecció de bacteris al microbioma respiratori. Es requereixen més investigacions sobre els mecanismes inflamatoris dels microorganismes de l'MPOC sobre el microbioma respiratori.

Fortaleses, limitacions i futur

La present tesi té com a principal fortaleza el vessant translacional dels diferents estudis que la componen. Gràcies a l'estudi de diferents poblacions clíniques amb patologia pulmonar crònica, l'MPOC, s'ha pogut aprofundir en la interacció entre la inflamació i la via purinèrgica en les diferents etapes de la malaltia, fet que ressalta la

complexitat de l'MPOC. A més, ha evidenciat un efecte tant del tractament amb sGC com de l'azitromicina sobre la via purinèrgica, obrint la porta a possibles vies d'investigació en el desenvolupament de nous fàrmacs en aquesta malaltia. És important recalcar que, la combinació d'experts clínics i bàsics en l'equip investigador, ha estat essencial per dur a terme amb èxit una investigació bàsica amb un clar objectiu translacional.

Per altra banda, la principal limitació és el nombre reduït de mostres/pacients i grups en els diferents estudis, fet que dificulta extreure'n conclusions. En segon lloc, només s'han analitzat els principals enzims i gens de la via purinèrgica i no en tots els estudis ha estat possible tècnicament determinar-los tots. D'altres limitacions es troben especificades en cadascun dels articles que conformen la tesi doctoral, alguns d'ells també esmentats a la discussió.

No obstant això, la present tesi doctoral serveix per generar noves hipòtesis sobre el paper de la via purinèrgica i els diferents marcadors inflamatoris en l'MPOC i encoratja a continuar investigant en aquest camí. En futurs treballs seria interessant, per exemple, analitzar el paper d'altres molècules de la via purinèrgica com ho són l'ATP i l'adenosina i els diferents receptors purinèrgics. Mitjançant l'ús de noves tècniques moleculars es podria aprofundir en l'estudi de la via purinèrgica en la patogènesi de l'MPOC més allà de la present tesi.

També genera noves hipòtesis sobre el paper dels eosinòfils en l'MPOC i la seva implicació en la via purinèrgica, inclús, el paper d'aquests en altres malalties respiratòries com en l'asma. Una altra línia d'investigació que podria sortir arran de la present tesi, seria la interacció entre les vies de senyalització purinèrgica i de l'òxid nítric que permetria continuar ampliant el coneixement sobre els mecanismes fisiopatològics de l'MPOC, una malaltia complexa i heterogènia actualment sense tractament que freni la seva progressió.

Conclusions

1. Els patrons d'expressió dels diferents enzims que hidrolitzen i degraden de l'adenosina 5-trifosfat extracel·lular es troben alterats en les fases inicials de la Malaltia Pulmonar Obstructiva Crònica, potenciant una situació pro-inflamatòria tant a nivell pulmonar com sistèmic.
2. La sobreexpressió del gen *NT5E* i l'enzim CD73 podria ser un mecanisme compensatori davant la inflamació produïda per l'augment de l'adenosina 5-trifosfat extracel·lular, sent més evident en fumadors que no han desenvolupat Malaltia Pulmonar Obstructiva Crònica.
3. En un model animal d'emfisema, el tractament amb un estimulador del guanilat ciclasa soluble restabliria l'expressió gènica i proteica de *ENTDPD1/CD39* i *NT5E/CD73* produïda pel fum del tabac, suggerint un nou mecanisme d'acció en la prevenció de l'emfisema.
4. El perfil inflamatori en sang i esput dels pacients amb MPOC en situació estable no mostra diferències en funció del fenotip clínic definit pel nombre d'aguditzacions. Tanmateix, una correlació positiva entre l'enzim CD73 en l'esput i el nombre d'eosinòfils suggereix una possible implicació de la via purinèrgica en la inflamació eosinofílica en pacients amb Malaltia Pulmonar Obstructiva Crònica.
5. El tractament continu amb azitromicina en pacients amb Malaltia Pulmonar obstructiva Crònica greu amb comorbiditats i aguditzacions freqüents, no només redueix significativament les taxes d'agudització i gravetat després d'un any de tractament, sinó que també millora l'intercanvi de gasos i la majoria de paràmetres inflamatoris a nivell pulmonar i sistèmic.

6. En aquests pacients, tenir nivells elevats d'interleucina 8 en sèrum i esput, sembla predir una bona resposta clínica al tractament amb azitromicina, indicant que aquesta interleucina pot tenir una potencial utilitat com a biomarcador.

7. El tractament amb azitromicina en malalts amb Malaltia Pulmonar Obstructiva Crònica, augmenta els nivells de l'enzim CD73 en sang, el qual tindria un paper protector, disminuint la inflamació que caracteritza la malaltia.

Bibliografia

1. Suissa S, Dell’Aniello S, Ernst P. Long-term natural history of chronic obstructive pulmonary disease: Severe exacerbations and mortality. *Thorax* [Internet]. 2012 [cited 2020 Dec 22];67(11):957–63. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22684094/>
2. GLOBAL INITIATIVE FOR CHRONIC OBSTRUCTIVE LUNG DISEASE GLOBAL STRATEGY FOR THE DIAGNOSIS, MANAGEMENT, AND PREVENTION OF CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE (2023 REPORT) [Internet]. 2022. Available from: www.goldcopd.org
3. Miravittles M, Calle M, Molina J, Almagro P, Gómez JT, Trigueros JA, et al. Actualización 2021 de la Guía Española de la EPOC (GesEPOC). Tratamiento farmacológico de la EPOC estable. *Arch Bronconeumol* [Internet]. 2022 Jan 1 [cited 2024 Apr 25];58(1):69–81. Available from: <https://www.archbronconeumol.org/en-actualizacion-2021-guia-espanola-epoc-articulo-S0300289621001034>
4. Brightling C, Greening N. Airway inflammation in COPD: Progress to precision medicine. *European Respiratory Journal*. 2019 Aug 1;54(2).
5. Barnes PJ. Inflammatory mechanisms in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. 2016 Jul 1 [cited 2024 Apr 22];138(1):16–27. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27373322/>
6. Thomsen M, Dahl M, Lange P, Vestbo J, Nordestgaard BG. Inflammatory biomarkers and comorbidities in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* [Internet]. 2012 Nov 15 [cited 2024 Apr 25];186(10):982–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22983959/>
7. Hurst JR, Donaldson GC, Perera WR, Wilkinson TMA, Bilello JA, Hagan GW, et al. Use of plasma biomarkers at exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* [Internet]. 2006 Oct 15 [cited 2024 Apr 25];174(8):867–74. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16799074/>
8. Barnes PJ. Cellular and molecular mechanisms of asthma and COPD. *Clin Sci (Lond)* [Internet]. 2017 [cited 2024 Apr 22];131(13):1541–58. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28659395/>
9. Fahy J V., Dickey BF. Airway mucus function and dysfunction. *N Engl J Med* [Internet]. 2010 Dec 2 [cited 2024 Aug 9];363(23):2233–47. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21121836/>
10. Gamble E, Grootendorst DC, Hattotuwa K, O’Shaughnessy T, Ram FSF, Qiu Y, et al. Airway mucosal inflammation in COPD is similar in smokers and ex-smokers: a pooled analysis. *Eur Respir J* [Internet]. 2007 Sep [cited 2024 Apr 25];30(3):467–71. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17504799/>
11. Mathioudakis AG, Janssens W, Sivapalan P, Singanayagam A, Dransfield MT, Jensen JUS, et al. Acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease: in search of diagnostic biomarkers and treatable traits. *Thorax* [Internet]. 2020 Jun 1 [cited 2024 Apr 22];75(6):520–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32217784/>

12. Eltboli O, Bafadhel M, Hollins F, Wright A, Hargadon B, Kulkarni N, et al. COPD exacerbation severity and frequency is associated with impaired macrophage efferocytosis of eosinophils. *BMC Pulm Med* [Internet]. 2014 Jul 9 [cited 2024 Apr 23];14(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25007795/>
13. Pizzichini E, Pizzichini MMM, Gibson P, Parameswaran K, Gleich GJ, Berman L, et al. Sputum eosinophilia predicts benefit from prednisone in smokers with chronic obstructive bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med* [Internet]. 1998 [cited 2024 Apr 23];158(5 Pt 1):1511–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9817701/>
14. Mori Y, Iwasaki H, Kohno K, Yoshimoto G, Kikushige Y, Okeda A, et al. Identification of the human eosinophil lineage-committed progenitor: revision of phenotypic definition of the human common myeloid progenitor. *J Exp Med* [Internet]. 2009 Jan 16 [cited 2024 Apr 23];206(1):183–93. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19114669/>
15. Ramirez GA, Yacoub MR, Ripa M, Mannina D, Cariddi A, Saporiti N, et al. Eosinophils from Physiology to Disease: A Comprehensive Review. *Biomed Res Int* [Internet]. 2018 [cited 2024 Apr 23];2018. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29619379/>
16. Shi HZ, Humbles A, Gerard C, Jin Z, Weller PF. Lymph node trafficking and antigen presentation by endobronchial eosinophils. *Journal of Clinical Investigation*. 2000;105(7):945–53.
17. Lee JJ, Jacobsen EA, McGarry MP, Schleimer RP, Lee NA. Eosinophils in health and disease: the LIAR hypothesis. *Clin Exp Allergy* [Internet]. 2010 Apr [cited 2024 Apr 23];40(4):563–75. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20447076/>
18. Mesnil C, Raulier S, Paulissen G, Xiao X, Birrell MA, Pirottin D, et al. Lung-resident eosinophils represent a distinct regulatory eosinophil subset. *J Clin Invest* [Internet]. 2016 Sep 1 [cited 2024 Apr 23];126(9):3279–95. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27548519/>
19. Marichal T, Mesnil C, Bureau F. Homeostatic Eosinophils: Characteristics and Functions. *Front Med (Lausanne)* [Internet]. 2017 [cited 2024 Apr 23];4(JUL). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28744457/>
20. Gigon L, Fettelet T, Yousefi S, Simon D, Simon HU. Eosinophils from A to Z. *Allergy* [Internet]. 2023 Jul 1 [cited 2024 Apr 23];78(7):1810–46. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37102676/>
21. Barnes PJ. Inflammatory endotypes in COPD. *Allergy* [Internet]. 2019 Jul 1 [cited 2024 Apr 15];74(7):1249–56. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/all.13760>
22. Vedel-Krogh S, Nielsen SF, Lange P, Vestbo J, Nordestgaard BG. Blood Eosinophils and Exacerbations in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. The Copenhagen General Population Study. *Am J Respir Crit Care Med* [Internet]. 2016 May 1 [cited 2024 Apr 23];193(9):965–74. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26641631/>
23. Singh D, Kolsum U, Brightling CE, Locantore N, Agusti A. Eosinophilic inflammation in COPD: prevalence and clinical characteristics. *Eur Respir J* [Internet]. 2014 Dec 1 [cited

- 2024 Apr 23];44(6):1697–700. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25323230/>
24. Zysman M, Deslee G, Caillaud D, Chanez P, Escamilla R, Court-Fortune I, et al. Relationship between blood eosinophils, clinical characteristics, and mortality in patients with COPD. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* [Internet]. 2017 Jun 20 [cited 2024 Apr 23];12:1819–24. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28694695/>
 25. Casanova C, Celli BR, de-Torres JP, Martínez-Gonzalez C, Cosio BG, Pinto-Plata V, et al. Prevalence of persistent blood eosinophilia: relation to outcomes in patients with COPD. *Eur Respir J* [Internet]. 2017 Nov 1 [cited 2024 Apr 23];50(5). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29167301/>
 26. Barnes NC, Sharma R, Lettis S, Calverley PMA. Blood eosinophils as a marker of response to inhaled corticosteroids in COPD. *Eur Respir J* [Internet]. 2016 May 1 [cited 2024 Apr 23];47(5):1374–82. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26917606/>
 27. Brusselle G, Pavord ID, Landis S, Pascoe S, Lettis S, Morjaria N, et al. Blood eosinophil levels as a biomarker in COPD. *Respir Med*. 2018 May 1;138:21–31.
 28. David B, Bafadhel M, Koenderman L, De Soyza A. Eosinophilic inflammation in COPD: from an inflammatory marker to a treatable trait. *Thorax* [Internet]. 2021 Feb 1 [cited 2024 Apr 15];76(2):188. Available from: <https://pmc/articles/PMC7815887/>
 29. Hurst JR, Vestbo J, Anzueto A, Locantore N, Müllerova H, Tal-Singer R, et al. Susceptibility to Exacerbation in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *New England Journal of Medicine* [Internet]. 2010 Sep 16 [cited 2021 Mar 1];363(12):1128–38. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20843247/>
 30. Celli BR, Fabbri LM, Aaron SD, Agusti A, Brook R, Criner GJ, et al. An Updated Definition and Severity Classification of Chronic Obstructive Pulmonary Disease Exacerbations: The Rome Proposal. *Am J Respir Crit Care Med* [Internet]. 2021 Dec 1 [cited 2024 Apr 11];204(11):1251–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34570991/>
 31. Rosell A, Monsó E, Soler N, Torres F, Angrill J, Riise G, et al. Microbiologic determinants of exacerbation in chronic obstructive pulmonary disease. *Arch Intern Med* [Internet]. 2005 Apr 25 [cited 2024 Jul 3];165(8):891–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15851640/>
 32. Sethi S, Sethi R, Eschberger K, Lobbins P, Cai X, Grant BJB, et al. Airway bacterial concentrations and exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* [Internet]. 2007 Aug 15 [cited 2024 Jul 3];176(4):356–61. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17478618/>
 33. Sethi S, Evans N, Grant BJB, Murphy TF. New strains of bacteria and exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* [Internet]. 2002 Aug 15 [cited 2024 Jul 3];347(7):465–71. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12181400/>
 34. Mallia P, Footitt J, Sotero R, Jepson A, Contoli M, Trujillo-Torralbo MB, et al. Rhinovirus infection induces degradation of antimicrobial peptides and secondary bacterial infection in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*

- [Internet]. 2012 Dec 1 [cited 2024 Jul 3];186(11):1117–24. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23024024/>
35. Molyneaux PL, Mallia P, Cox MJ, Footitt J, Willis-Owen SAG, Homola D, et al. Outgrowth of the bacterial airway microbiome after rhinovirus exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* [Internet]. 2013 Nov 15 [cited 2024 Jul 3];188(10):1224–31. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23992479/>
 36. George SN, Garcha DS, Mackay AJ, Patel ARC, Singh R, Sapsford RJ, et al. Human rhinovirus infection during naturally occurring COPD exacerbations. *Eur Respir J* [Internet]. 2014 Jul 1 [cited 2024 Jul 3];44(1):87–96. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24627537/>
 37. Calderazzo MA, Trujillo-Torralbo MB, Finney LJ, Singanayagam A, Bakhsoliani E, Padmanaban V, et al. Inflammation and infections in unreported chronic obstructive pulmonary disease exacerbations. *International Journal of COPD*. 2019;14:823–32.
 38. Wilkinson TMA, Aris E, Bourne S, Clarke SC, Peeters M, Pascal TG, et al. A prospective, observational cohort study of the seasonal dynamics of airway pathogens in the aetiology of exacerbations in COPD. *Thorax* [Internet]. 2017 Oct 1 [cited 2024 Jul 3];72(10):919–27. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28432209/>
 39. Abroug F, Ouane-Besbes L, Nciri N, Sellami N, Addad F, Hamda K Ben, et al. Association of left-heart dysfunction with severe exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease: Diagnostic performance of cardiac biomarkers. *Am J Respir Crit Care Med* [Internet]. 2006 Nov 1 [cited 2021 Mar 4];174(9):990–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16840745/>
 40. Muñoz-Esquerre M, López-Sánchez M, Escobar I, Huertas D, Penín R, Molina-Molina M, et al. Systemic and pulmonary vascular remodelling in chronic obstructive pulmonary disease. *PLoS One* [Internet]. 2016 Apr 1 [cited 2021 Mar 1];11(4). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27046203/>
 41. Santos S, Peinado VI, Ramírez J, Melgosa T, Roca J, Rodriguez-Roisin R, et al. Characterization of pulmonary vascular remodelling in smokers and patients with mild COPD. *European Respiratory Journal* [Internet]. 2002 [cited 2021 Mar 1];19(4):632–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11998991/>
 42. de Miguel-Díez J, Núñez Villota J, Santos Pérez S, Manito Lorite N, Alcázar Navarrete B, Delgado Jiménez JF, et al. Multidisciplinary Management of Patients With Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Cardiovascular Disease. *Arch Bronconeumol* [Internet]. 2024 Apr 1 [cited 2024 Jul 3];60(4):226–37. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38383272/>
 43. Morgan AD, Zakeri R, Quint JK. Defining the relationship between COPD and CVD: what are the implications for clinical practice? *Ther Adv Respir Dis* [Internet]. 2018 Jan 19 [cited 2024 Jul 3];12. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29355081/>
 44. Effects of smoking intervention and the use of an inhaled anticholinergic bronchodilator on the rate of decline of FEV1. *The Lung Health Study - PubMed* [Internet]. [cited 2024 Jul 3]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7966841/>

45. Marchetti N, Criner GJ, Albert RK. Preventing acute exacerbations and hospital admissions in COPD. *Chest* [Internet]. 2013 [cited 2024 Apr 11];143(5):1444–54. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23648908/>
46. Ni W, Shao X, Cai X, Wei C, Cui J, Wang R, et al. Prophylactic Use of Macrolide Antibiotics for the Prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease Exacerbation: A Meta-Analysis. *PLoS One* [Internet]. 2015 Mar 26 [cited 2024 Apr 15];10(3). Available from: [/pmc/articles/PMC4374882/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/264374882/)
47. MacLeod M, Papi A, Contoli M, Beghé B, Celli BR, Wedzicha JA, et al. Chronic obstructive pulmonary disease exacerbation fundamentals: Diagnosis, treatment, prevention and disease impact. *Respirology* [Internet]. 2021 Jun 1 [cited 2024 Oct 11];26(6):532–51. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33893708/>
48. Beeh KM, Burgel PR, Franssen FME, Lopez-Campos JL, Loukides S, Hurst JR, et al. How Do Dual Long-Acting Bronchodilators Prevent Exacerbations of Chronic Obstructive Pulmonary Disease? *Am J Respir Crit Care Med* [Internet]. 2017 Jul 15 [cited 2024 Oct 11];196(2):139–49. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27922741/>
49. Vogelmeier C, Hederer B, Glaab T, Schmidt H, Rutten-van Mölken MPMH, Beeh KM, et al. Tiotropium versus salmeterol for the prevention of exacerbations of COPD. *N Engl J Med* [Internet]. 2011 Mar 24 [cited 2024 Oct 11];364(12):1093–103. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21428765/>
50. Decramer ML, Chapman KR, Dahl R, Frith P, Devouassoux G, Fritscher C, et al. Once-daily indacaterol versus tiotropium for patients with severe chronic obstructive pulmonary disease (INVIGORATE): a randomised, blinded, parallel-group study. *Lancet Respir Med* [Internet]. 2013 Sep [cited 2024 Oct 11];1(7):524–33. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24461613/>
51. Wedzicha JA, Decramer M, Ficker JH, Niewoehner DE, Sandström T, Taylor AF, et al. Analysis of chronic obstructive pulmonary disease exacerbations with the dual bronchodilator QVA149 compared with glycopyrronium and tiotropium (SPARK): a randomised, double-blind, parallel-group study. *Lancet Respir Med* [Internet]. 2013 May [cited 2024 Oct 11];1(3):199–209. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24429126/>
52. Halpin DMG, Miravittles M, Metzendorf N, Celli B. Impact and prevention of severe exacerbations of COPD: a review of the evidence. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* [Internet]. 2017 Oct 5 [cited 2024 Oct 11];12:2891–908. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29062228/>
53. Pavord ID, Lettis S, Locantore N, Pascoe S, Jones PW, Wedzicha JA, et al. Blood eosinophils and inhaled corticosteroid/long-acting β -2 agonist efficacy in COPD. *Thorax* [Internet]. 2016 Feb 1 [cited 2024 Apr 23];71(2):118–25. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26585525/>
54. Watz H, Tetzlaff K, Wouters EFM, Kirsten A, Magnussen H, Rodriguez-Roisin R, et al. Blood eosinophil count and exacerbations in severe chronic obstructive pulmonary disease after withdrawal of inhaled corticosteroids: a post-hoc analysis of the WISDOM trial. *Lancet Respir Med* [Internet]. 2016 May 1 [cited 2024 Apr 23];4(5):390–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27066739/>

55. Wedzicha JA. Eosinophils as Biomarkers of Chronic Obstructive Pulmonary Disease Exacerbation Risk. Maybe Just for Some? *Am J Respir Crit Care Med* [Internet]. 2016 May 1 [cited 2024 Apr 23];193(9):937–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27128699/>
56. Siddiqui SH, Guasconi A, Vestbo J, Jones P, Agusti A, Paggiaro P, et al. Blood Eosinophils: A Biomarker of Response to Extrafine Beclomethasone/Formoterol in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med* [Internet]. 2015 Aug 15 [cited 2024 Apr 23];192(4):523–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26051430/>
57. Tashkin DP, Wechsler ME. Role of eosinophils in airway inflammation of chronic obstructive pulmonary disease. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* [Internet]. 2018 Jan 17 [cited 2024 Apr 23];13:335–49. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29403271/>
58. Singh D, Corradi M, Spinola M, Papi A, Usmani OS, Scuri M, et al. Triple therapy in COPD: new evidence with the extrafine fixed combination of beclomethasone dipropionate, formoterol fumarate, and glycopyrronium bromide. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* [Internet]. 2017 Oct 6 [cited 2024 Nov 13];12:2917–28. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29062229/>
59. Südi A, Santa B, Horváth A, Tomisa G, Abonyi-Tóth Z, Rokszi G, et al. The Real-World Efficacy of Fixed Triple Inhalation Therapy in the Treatment of Moderate COPD Patients (RATIONALE Study). *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* [Internet]. 2024 [cited 2024 Nov 13];19:1943–55. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39219564/>
60. Ismaila AS, Haeussler K, Czira A, Youn JH, Malmenäs M, Risebrough NA, et al. Fluticasone Furoate/Umeclidinium/Vilanterol (FF/UMEC/VI) Triple Therapy Compared with Other Therapies for the Treatment of COPD: A Network Meta-Analysis. *Adv Ther* [Internet]. 2022 Sep 1 [cited 2024 Nov 21];39(9):3957–78. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35849317/>
61. Bafadhel M, McKenna S, Terry S, Mistry V, Pancholi M, Venge P, et al. Blood eosinophils to direct corticosteroid treatment of exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease: a randomized placebo-controlled trial. *Am J Respir Crit Care Med* [Internet]. 2012 Jul 1 [cited 2024 Apr 23];186(1):48–55. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22447964/>
62. Bafadhel M, McKenna S, Terry S, Mistry V, Reid C, Haldar P, et al. Acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease: identification of biologic clusters and their biomarkers. *Am J Respir Crit Care Med* [Internet]. 2011 Sep 15 [cited 2024 Apr 23];184(6):662–71. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21680942/>
63. Bhatt SP, Rabe KF, Hanania NA, Vogelmeier CF, Cole J, Bafadhel M, et al. Dupilumab for COPD with Type 2 Inflammation Indicated by Eosinophil Counts. *N Engl J Med* [Internet]. 2023 Jul 20 [cited 2024 Nov 13];389(3):205–14. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37272521/>
64. Labro MT. Cellular and Molecular Effects of Macrolides on Leukocyte Function. *Curr Pharm Des* [Internet]. 2005 Mar 18 [cited 2020 Dec 22];10(25):3067–80. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15544498/>

65. Friedlander AL, Albert RK. Chronic Macrolide Therapy in Inflammatory Airways Diseases. *Chest*. 2010 Nov 1;138(5):1202–12.
66. Martinez FJ, Curtis JL, Albert R. Role of macrolide therapy in chronic obstructive pulmonary disease. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* [Internet]. 2008 [cited 2024 Apr 19];3(3):331. Available from: [/pmc/articles/PMC2629987/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC2629987/)
67. Ikeda K, Wu D, Takasaka T. Inhibition of acetylcholine-evoked Cl⁻ currents by 14-membered macrolide antibiotics in isolated acinar cells of the guinea pig nasal gland. *Am J Respir Cell Mol Biol* [Internet]. 1995 [cited 2024 Apr 22];13(4):449–54. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7546775/>
68. Tamaoki J, Lsono K, Sakai N, Kanemura T, Konno K. Erythromycin inhibits Cl secretion across canine tracheal epithelial cells. *Eur Respir J*. 1992;5:234–8.
69. Shimizu T, Shimizu S, Hattori R, Gabazza EC, Majima Y. In vivo and in vitro effects of macrolide antibiotics on mucus secretion in airway epithelial cells. *Am J Respir Crit Care Med* [Internet]. 2003 Sep 1 [cited 2024 Apr 22];168(5):581–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12829454/>
70. Morinaga Y, Yanagihara K, Miyashita N, Seki M, Izumikawa K, Takeya H, et al. Azithromycin, clarithromycin and telithromycin inhibit MUC5AC induction by *Chlamydia pneumoniae* in airway epithelial cells. *Pulm Pharmacol Ther* [Internet]. 2009 Dec [cited 2024 Apr 22];22(6):580–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19716898/>
71. Yamada K, Morinaga Y, Yanagihara K, Kaku N, Harada Y, Uno N, et al. Azithromycin inhibits MUC5AC induction via multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in human airway epithelial cells. *Pulm Pharmacol Ther*. 2014 Aug 1;28(2):165–70.
72. Kaneko Y, Yanagihara K, Seki M, Kuroki M, Miyazaki Y, Hirakata Y, et al. Clarithromycin inhibits overproduction of muc5ac core protein in murine model of diffuse panbronchiolitis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* [Internet]. 2003 Oct 1 [cited 2024 Apr 22];285(4). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12818892/>
73. Uli O, Erakovi V, Parnham MJ. Anti-inflammatory effects of macrolide antibiotics. *Eur J Pharmacol* [Internet]. 2001 Oct 10 [cited 2024 Apr 22];429(1–3):209–29. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11698042/>
74. Yang J. Mechanism of azithromycin in airway diseases. *J Int Med Res* [Internet]. 2020 Jun 1 [cited 2024 Apr 22];48(6). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32589092/>
75. Takizawa H, Desaki M, Ohtoshi T, Kawasaki S, Kohyama T, Sato M, et al. Erythromycin modulates IL-8 expression in normal and inflamed human bronchial epithelial cells. *Am J Respir Crit Care Med* [Internet]. 1997 [cited 2024 Apr 22];156(1):266–71. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9230759/>
76. Tsai WC, Rodriguez ML, Young KS, Deng JC, Thannickal VJ, Tateda K, et al. Azithromycin blocks neutrophil recruitment in *Pseudomonas* endobronchial infection. *Am J Respir Crit Care Med* [Internet]. 2004 Dec 15 [cited 2024 Apr 22];170(12):1331–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15361366/>

77. Sato E, Nelson DK, Koyama S, Hoyt JC, Robbins RA. Erythromycin modulates eosinophil chemotactic cytokine production by human lung fibroblasts in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2001 [cited 2024 Apr 22];45(2):401–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11158732/>
78. Sugiyama K, Shirai R, Mukae H, Ishimoto H, Nagata T, Sakamoto N, et al. Differing effects of clarithromycin and azithromycin on cytokine production by murine dendritic cells. *Clin Exp Immunol* [Internet]. 2007 Mar [cited 2024 Apr 22];147(3):540–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17302905/>
79. Mertens TCJ, Hiemstra PS, Taube C. Azithromycin differentially affects the IL-13-induced expression profile in human bronchial epithelial cells. *Pulm Pharmacol Ther* [Internet]. 2016 Aug 1 [cited 2024 Apr 22];39:14–20. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27246785/>
80. Albert RK, Connett J, Bailey WC, Casaburi R, Cooper JAD, Criner GJ, et al. Azithromycin for Prevention of Exacerbations of COPD. *New England Journal of Medicine* [Internet]. 2011 Aug 25 [cited 2020 Dec 22];365(8):689–98. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21864166/>
81. Han MLK, Tayob N, Murray S, Dransfield MT, Washko G, Scanlon PD, et al. Predictors of chronic obstructive pulmonary disease exacerbation reduction in response to daily azithromycin therapy. *Am J Respir Crit Care Med* [Internet]. 2014 Jun 15 [cited 2021 Mar 1];189(12):1503–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24779680/>
82. Uzun S, Djamin RS, Kluytmans JAJW, Mulder PGH, van't Veer NE, Ermens AAM, et al. Azithromycin maintenance treatment in patients with frequent exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease (COLUMBUS): A randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Respir Med* [Internet]. 2014 [cited 2020 Dec 22];2(5):361–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24746000/>
83. Pomares X, Montón C, Huertas Alicia Marín D, Cuevas Antonio Casabella Sara Martí E, Carles Oliva Salud Santos J. Clinical Investigations Efficacy of Low-Dose versus High-Dose Continuous Cyclic Azithromycin Therapy for Preventing Acute Exacerbations of COPD Keywords Chronic obstructive pulmonary disease · Exacerbations · Azithromycin · Dose. *Respiration* [Internet]. 2021 [cited 2022 Sep 26];100:1070–7. Available from: www.karger.com/res
84. Wenzel RP, Fowler AA, Edmond MB. Antibiotic Prevention of Acute Exacerbations of COPD. *New England Journal of Medicine* [Internet]. 2012 Jul 26 [cited 2020 Dec 22];367(4):340–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22830464/>
85. Soler-Cataluña JJ, Piñera P, Trigueros JA, Calle M, Casanova C, Cosío BG, et al. Spanish COPD Guidelines (GesEPOC) 2021 Update Diagnosis and Treatment of COPD Exacerbation Syndrome. *Arch Bronconeumol* [Internet]. 2022 Feb 1 [cited 2024 Apr 25];58(2):159–70. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34172340/>
86. Drury AN, Szent-Györgyi A. The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. *J Physiol* [Internet]. 1929 Nov 25 [cited 2024 Aug 7];68(3):213–37. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16994064/>

87. Antonioli L, Pacher P, Vizi ES, Haskó G. CD39 and CD73 in immunity and inflammation [Internet]. Vol. 19, Trends in Molecular Medicine. Trends Mol Med; 2013 [cited 2020 Dec 18]. p. 355–67. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23601906/>
88. Sperlagh B, Sylvester Vizi E. The role of extracellular adenosine in chemical neurotransmission in the hippocampus and Basal Ganglia: pharmacological and clinical aspects. Curr Top Med Chem [Internet]. 2011 Apr 12 [cited 2024 Aug 7];11(8):1034–46. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21401497/>
89. Sperlágh B, Haskó G, Németh Z, Vizi ES. ATP released by LPS increases nitric oxide production in raw 264.7 macrophage cell line via P2Z/P2X7 receptors. Neurochem Int [Internet]. 1998 Sep 1 [cited 2024 Aug 7];33(3):209–15. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9759915/>
90. Kukulski F, Lévesque SA, Sévigny J. Impact of ectoenzymes on p2 and p1 receptor signaling. Adv Pharmacol [Internet]. 2011 [cited 2024 Aug 7];61:263–99. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21586362/>
91. Zimmermann H, Zebisch M, Sträter N. Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. Purinergic Signal [Internet]. 2012 Sep [cited 2024 Aug 6];8(3):437–502. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22555564/>
92. Fausther M, Pelletier J, Ribeiro CM, Sévigny J, Picher M. Cystic fibrosis remodels the regulation of purinergic signaling by NTPDase1 (CD39) and NTPDase3. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol [Internet]. 2010 Jun [cited 2020 Dec 18];298(6). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20190036/>
93. Kanthi YM, Sutton NR, Pinsky DJ. CD39: Interface between vascular thrombosis and inflammation. Curr Atheroscler Rep [Internet]. 2014 [cited 2021 Mar 1];16(7). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24838375/>
94. Yegutkin GG. Enzymes involved in metabolism of extracellular nucleotides and nucleosides: Functional implications and measurement of activities [Internet]. Vol. 49, Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology. Informa Healthcare; 2014 [cited 2021 Mar 1]. p. 473–97. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25418535/>
95. Reichert KP, Castro MFV, Assmann CE, Bottari NB, Miron VV, Cardoso A, et al. Diabetes and hypertension: Pivotal involvement of purinergic signaling. Biomedicine & Pharmacotherapy [Internet]. 2021 May 1 [cited 2024 Jul 3];137:111273. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3446467/>
96. Karmouty-Quintana H, Xia Y, Blackburn MR. Adenosine Signaling During Acute and Chronic Disease States. J Mol Med (Berl) [Internet]. 2013 Feb [cited 2024 Apr 18];91(2):173. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23606047/>
97. Yegutkin GG. Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. Biochim Biophys Acta [Internet]. 2008 May [cited 2024 Aug 7];1783(5):673–94. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18302942/>
98. Idzko M, Ferrari D, Eltzschig HK. Nucleotide signalling during inflammation. Nature [Internet]. 2014 May 5 [cited 2024 Jul 3];509(7500):310. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2422675/>

99. Zhou Y, Schneider DJ, Blackburn MR. Adenosine signaling and the regulation of chronic lung disease. *Pharmacol Ther* [Internet]. 2009 Jul [cited 2024 Apr 18];123(1):105. Available from: [/pmc/articles/PMC2743314/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17396131/)
100. Fredholm BB. Adenosine, an endogenous distress signal, modulates tissue damage and repair. *Cell Death Differ* [Internet]. 2007 Jul [cited 2024 Aug 7];14(7):1315–23. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17396131/>
101. Le TTT, Berg NK, Harting MT, Li X, Eltzschig HK, Yuan X. Purinergic Signaling in Pulmonary Inflammation. *Front Immunol* [Internet]. 2019 [cited 2024 Aug 7];10(JULY). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31379836/>
102. Ehrentraut H, Clambey ET, McNamee EN, Brodsky KS, Ehrentraut SF, Poth JM, et al. CD73+ regulatory T cells contribute to adenosine-mediated resolution of acute lung injury. *FASEB J* [Internet]. 2013 Jun [cited 2024 Aug 7];27(6):2207–19. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23413361/>
103. Reutershan J, Vollmer I, Stark S, Wagner R, Ngamsri K, Eltzschig HK. Adenosine and inflammation: CD39 and CD73 are critical mediators in LPS-induced PMN trafficking into the lungs. *FASEB J* [Internet]. 2009 Feb [cited 2024 Aug 7];23(2):473–82. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18838482/>
104. Le TTT, Berg NK, Harting MT, Li X, Eltzschig HK, Yuan X. Purinergic signaling in pulmonary inflammation [Internet]. Vol. 10, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A.; 2019 [cited 2021 Mar 4]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31379836/>
105. Idzko M, Hammad H, Van Nimwegen M, Kool M, Willart MAM, Muskens F, et al. Extracellular ATP triggers and maintains asthmatic airway inflammation by activating dendritic cells. *Nat Med* [Internet]. 2007 Aug [cited 2024 Aug 7];13(8):913–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17632526/>
106. Riteau N, Gasse P, Fauconnier L, Gombault A, Couegnat M, Fick L, et al. Extracellular ATP is a danger signal activating P2X7 receptor in lung inflammation and fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* [Internet]. 2010 Sep 15 [cited 2024 Aug 7];182(6):774–83. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20522787/>
107. Müller T, Fay S, Vieira RP, Harry KQ, Cicko S, Ayata K, et al. The purinergic receptor subtype P2Y2 mediates chemotaxis of neutrophils and fibroblasts in fibrotic lung disease. *Oncotarget* [Internet]. 2017 May 1 [cited 2024 Aug 7];8(22):35962–72. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28415591/>
108. Schreiber R, Castrop H, Kunzelmann K. Allergen-induced airway hyperresponsiveness is absent in ecto-5'-nucleotidase (CD73)-deficient mice. *Pflugers Arch* [Internet]. 2008 Nov [cited 2024 Aug 7];457(2):431–40. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18607626/>
109. Mann JS, Holgate ST, Renwick AG, Cushley MJ. Airway effects of purine nucleosides and nucleotides and release with bronchial provocation in asthma. *J Appl Physiol*. 1986;61(5):1667–76.
110. Cushley M, Tattersfield A, Holgate S. Inhaled adenosine and guanosine on airway resistance in normal and asthmatic subjects. *Br J Clin Pharmacol*. 1983;15(2):161–5.

111. Huszár É, Vass G, Vizi É, Csoma Z, Barát E, Molnár-Világos G, et al. Adenosine in exhaled breath condensate in healthy volunteers and in patients with asthma. *Eur Respir J* [Internet]. 2002 Dec 1 [cited 2024 Aug 7];20(6):1393–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12503694/>
112. Driver AG, Kukoly CA, Ali S, Mustafa SJ. Adenosine in bronchoalveolar lavage fluid in asthma. *Am Rev Respir Dis* [Internet]. 1993 [cited 2024 Aug 7];148(1):91–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8317821/>
113. Oosterhoff Y, De Jong JW, Jansen MAM, Koeter GH, Postma DS. Airway responsiveness to adenosine 5'-monophosphate in chronic obstructive pulmonary disease is determined by smoking. *American Review of Respiratory Disease*. 1993;147(3):553–8.
114. Esther CR, Lazaar AL, Bordonali E, Qaqish B, Boucher RC. Elevated airway purines in COPD. *Chest* [Internet]. 2011 [cited 2024 Aug 7];140(4):954–60. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21454402/>
115. Luo F, Le NB, Mills T, Chen NY, Karmouty-Quintana H, Molina JG, et al. Extracellular adenosine levels are associated with the progression and exacerbation of pulmonary fibrosis. *FASEB Journal*. 2016 Feb 1;30(2):874–83.
116. Pelleg A, Schulman ES, Barnes PJ. Extracellular Adenosine 5'-Triphosphate in Obstructive Airway Diseases. *Chest* [Internet]. 2016 Oct 1 [cited 2020 Dec 18];150(4):908–15. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27568579/>
117. Mortaz E, Folkerts G, Nijkamp FP, Henricks PAJ. ATP and the pathogenesis of COPD. *Eur J Pharmacol* [Internet]. 2010 Jul [cited 2020 Dec 18];638(1–3):1–4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20423711/>
118. Ferrari D, Vuerich M, Casciano F, Longhi MS, Melloni E, Secchiero P, et al. Eosinophils and Purinergic Signaling in Health and Disease. *Front Immunol* [Internet]. 2020 [cited 2024 Apr 15];11. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32733449/>
119. Cicko S, Lucattelli M, Müller T, Lommatzsch M, De Cunto G, Cardini S, et al. Purinergic Receptor Inhibition Prevents the Development of Smoke-Induced Lung Injury and Emphysema. *The Journal of Immunology* [Internet]. 2010 Jul 1 [cited 2021 Mar 1];185(1):688–97. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20519655/>
120. Lommatzsch M, Cicko S, Müller T, Lucattelli M, Bratke K, Stoll P, et al. Extracellular adenosine triphosphate and chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* [Internet]. 2010 May 1 [cited 2020 Dec 18];181(9):928–34. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20093639/>
121. Lazar Z, Müllner N, Lucattelli M, Ayata CK, Cicko S, Yegutkin GG, et al. NTPDase1/CD39 and aberrant purinergic signalling in the pathogenesis of COPD. *European Respiratory Journal* [Internet]. 2016 Jan 1 [cited 2020 Dec 18];47(1):254–63. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26541524/>
122. Tan DBA, Ong NE, Zimmermann M, Price P, Moodley YP. An evaluation of CD39 as a novel immunoregulatory mechanism invoked by COPD. *Hum Immunol* [Internet]. 2016 Oct 1 [cited 2020 Dec 18];77(10):916–20. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27430193/>

123. Aliagas E, Muñoz-Esquerre M, Cuevas E, Careta O, Huertas D, López-Sánchez M, et al. Is the purinergic pathway involved in the pathology of COPD? Decreased lung CD39 expression at initial stages of COPD. *Respir Res* [Internet]. 2018 May 28 [cited 2020 Dec 18];19(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29807526/>
124. Burnstock G. Purinergic Signaling in the Cardiovascular System [Internet]. Vol. 120, *Circulation Research*. Lippincott Williams and Wilkins; 2017 [cited 2021 Mar 1]. p. 207–28. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28057794/>
125. Kitakaze M, Hori M. Adenosine therapy: A new approach to chronic heart failure [Internet]. Vol. 9, *Expert Opinion on Investigational Drugs*. Ashley Publications Ltd; 2000 [cited 2021 Mar 1]. p. 2519–35. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11060817/>
126. Yuan X, Ferrari D, Mills T, Wang Y, Czopik A, Doursout MF, et al. Editorial: Purinergic Signaling and Inflammation. *Front Immunol* [Internet]. 2021 May 19 [cited 2024 Aug 7];12. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34093597/>
127. Antonioli L, Colucci R, La Motta C, Tuccori M, Awwad O, Da Settimo F, et al. Adenosine deaminase in the modulation of immune system and its potential as a novel target for treatment of inflammatory disorders. *Curr Drug Targets* [Internet]. 2012 May 14 [cited 2024 Aug 2];13(6):842–62. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22250650/>
128. Barletta KE, Ley K, Mehrad B. Regulation of neutrophil function by adenosine. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* [Internet]. 2012 Apr [cited 2024 Aug 2];32(4):856–64. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22423037/>
129. Chen Y, Corriden R, Inoue Y, Yip L, Hashiguchi N, Zinkernagel A, et al. ATP release guides neutrophil chemotaxis via P2Y2 and A3 receptors. *Science* [Internet]. 2006 Dec 15 [cited 2024 Aug 2];314(5806):1792–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17170310/>
130. Eltzschig HK, MacManus CF, Colgan SP. Neutrophils as sources of extracellular nucleotides: functional consequences at the vascular interface. *Trends Cardiovasc Med* [Internet]. 2008 Apr [cited 2024 Aug 2];18(3):103–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18436149/>
131. Haskó G, Cronstein BN. Adenosine: An endogenous regulator of innate immunity. *Trends Immunol* [Internet]. 2004 [cited 2024 Aug 2];25(1):33–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14698282/>
132. Pulte ED, Broekman MJ, Olson KE, Drosopoulos JHF, Kizer JR, Islam N, et al. CD39/NTPDase-1 activity and expression in normal leukocytes. *Thromb Res* [Internet]. 2007 [cited 2024 Aug 2];121(3):309–17. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17555802/>
133. Flögel U, Burghoff S, Van Lent PLEM, Temme S, Galbarz L, Ding Z, et al. Selective activation of adenosine A2A receptors on immune cells by a CD73-dependent prodrug suppresses joint inflammation in experimental rheumatoid arthritis. *Sci Transl Med* [Internet]. 2012 Aug 8 [cited 2024 Aug 2];4(146). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22875828/>

134. Kobayashi T, Kouzaki H, Kita H. HUMAN EOSINOPHILS RECOGNIZE ENDOGENOUS DANGER SIGNAL CRYSTALLINE URIC ACID AND PRODUCE PROINFLAMMATORY CYTOKINES MEDIATED BY AUTOCRINE ATP. *J Immunol* [Internet]. 2010 Jun 6 [cited 2024 Jul 3];184(11):6350. Available from: [/pmc/articles/PMC2874987/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25043200/)
135. Dupont LL, Glynos C, Bracke KR, Brouckaert P, Brusselle GG. Role of the nitric oxide-soluble guanylyl cyclase pathway in obstructive airway diseases. *Pulm Pharmacol Ther* [Internet]. 2014 [cited 2024 Sep 20];29(1):1–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25043200/>
136. Bayarri MA, Milara J, Estornut C, Cortijo J. Nitric Oxide System and Bronchial Epithelium: More Than a Barrier. *Front Physiol* [Internet]. 2021 Jun 30 [cited 2024 Sep 17];12. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34276407/>
137. Csoma B, Bikov A, Nagy L, Tóth B, Tábi T, Szucs G, et al. Dysregulation of the endothelial nitric oxide pathway is associated with airway inflammation in COPD. *Respir Res* [Internet]. 2019 Jul 16 [cited 2024 Sep 17];20(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31311549/>
138. Ruzsics I, Nagy L, Keki S, Sarosi V, Illes B, Illes Z, et al. L-Arginine Pathway in COPD Patients with Acute Exacerbation: A New Potential Biomarker. *COPD* [Internet]. 2016 Mar 3 [cited 2024 Sep 20];13(2):139–45. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26514682/>
139. Ansarin K, Chatkin JM, Ferreira IM, Gutierrez CA, Zamel N, Chapman KR. Exhaled nitric oxide in chronic obstructive pulmonary disease: relationship to pulmonary function. *European Respiratory Journal* [Internet]. 2001 May 1 [cited 2024 Oct 9];17(5):934–8. Available from: <https://erj.ersjournals.com/content/17/5/934>
140. Glynos C, Dupont LL, Vassilakopoulos T, Papapetropoulos A, Brouckaert P, Giannis A, et al. The role of soluble Guanylyl Cyclase in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* [Internet]. 2013 Oct 1 [cited 2020 Dec 18];188(7):789–99. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23841447/>
141. Paul T, Salazar-Degracia A, Peinado VI, Tura-Ceide O, Blanco I, Barreiro E, et al. Soluble guanylate cyclase stimulation reduces oxidative stress in experimental Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *PLoS One* [Internet]. 2018 Jan 1 [cited 2020 Dec 18];13(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29304131/>
142. Paul T, Blanco I, Aguilar D, Tura-Ceide O, Bonjoch C, Smolders VF, et al. Therapeutic effects of soluble guanylate cyclase stimulation on pulmonary hemodynamics and emphysema development in guinea pigs chronically exposed to cigarette smoke. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* [Internet]. 2019 Aug 1 [cited 2020 Dec 18];317(2):L222–34. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31166128/>
143. Ruiz-Stewart I, Tiyyagura SR, Lin JE, Kazerounian S, Pitari GM, Schulz S, et al. Guanylyl cyclase is an ATP sensor coupling nitric oxide signaling to cell metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2004 Jan [cited 2020 Dec 18];101(1):37–42. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14684830/>
144. Gonçalves Da Silva C, Specht A, Wegiel B, Ferran C, Kaczmarek E. Mechanism of purinergic activation of endothelial nitric oxide synthase in endothelial cells. *Circulation*

- [Internet]. 2009 Feb 17 [cited 2020 Dec 18];119(6):871–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19188511/>
145. Faas MM, Sáez T, de Vos P. Extracellular ATP and adenosine: The Yin and Yang in immune responses? *Mol Aspects Med* [Internet]. 2017 Jun 1 [cited 2024 Jul 22];55:9–19. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28093236/>
 146. De Gassart A, Géminard C, Février B, Raposo G, Vidal M. Lipid raft-associated protein sorting in exosomes. *Blood* [Internet]. 2003 Dec 15 [cited 2024 Apr 18];102(13):4336–44. Available from: <https://dx.doi.org/10.1182/blood-2003-03-0871>
 147. Polosa R, Blackburn MR. Adenosine receptors as targets for therapeutic intervention in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Trends Pharmacol Sci* [Internet]. 2009 Oct [cited 2024 Jul 23];30(10):528–35. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19762093/>
 148. Haskó G, Pacher P. A2A receptors in inflammation and injury: lessons learned from transgenic animals. *J Leukoc Biol* [Internet]. 2008 Mar 1 [cited 2024 Jul 23];83(3):447–55. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18160539/>
 149. Cronstein BN. Adenosine, an endogenous anti-inflammatory agent. *J Appl Physiol* (1985) [Internet]. 1994 [cited 2024 Jul 23];76(1):5–13. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8175547/>
 150. Blackburn MR. Too much of a good thing: adenosine overload in adenosine-deaminase-deficient mice. *Trends Pharmacol Sci* [Internet]. 2003 Feb 1 [cited 2024 Jul 23];24(2):66–70. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12559769/>
 151. Zhou Y, Schneider DJ, Morschl E, Song L, Pedroza M, Karmouty-Quintana H, et al. Distinct roles for the A2B adenosine receptor in acute and chronic stages of bleomycin-induced lung injury. *J Immunol* [Internet]. 2011 Jan 15 [cited 2024 Jul 23];186(2):1097–106. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21149612/>
 152. Kratzer A, Salys J, Sévigny J, Zamora M, Taraseviciene-Stewart L. Second hand smoke exposure impairs CD39 expression and function in the lung. *European Respiratory Journal*. 2012;40(Suppl 56).
 153. Ghimire K, Altmann HM, Straub AC, Isenberg JS. Nitric oxide: What’s new to NO? *Am J Physiol Cell Physiol* [Internet]. 2017 Mar 1 [cited 2020 Dec 18];312(3):C254–62. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27974299/>
 154. Gerassimou C, Kotanidou A, Zhou Z, Simoes DDC, Roussos C, Papapetropoulos A. Regulation of the expression of soluble guanylyl cyclase by reactive oxygen species. *Br J Pharmacol*. 2007;150(8):1084–91.
 155. Weissmann N, Lobo B, Pichl A, Parajuli N, Seimetz M, Puig-Pey R, et al. Stimulation of soluble guanylate cyclase prevents cigarette smoke-induced pulmonary hypertension and emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* [Internet]. 2014 Jun 1 [cited 2020 Dec 18];189(11):1359–73. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24738736/>
 156. Paul T, Blanco I, Aguilar D, Tura-Ceide O, Bonjoch C, Smolders VF, et al. Therapeutic effects of soluble guanylate cyclase stimulation on pulmonary hemodynamics and

- emphysema development in guinea pigs chronically exposed to cigarette smoke. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2019 Aug 1;317(2):L222–34.
157. Lázár Z, Huszár É, Kullmann T, Barta I, Antus B, Bikov A, et al. Adenosine triphosphate in exhaled breath condensate of healthy subjects and patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Inflammation Research*. 2008;57(8).
 158. Muñoz-Esquerre M, Aliagas E, López-Sánchez M, Escobar I, Huertas D, Penín R, et al. Vascular disease in COPD: Systemic and pulmonary expression of PARC (Pulmonary and Activation-Regulated Chemokine). *PLoS One* [Internet]. 2017 May 1 [cited 2024 Jul 23];12(5). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28545096/>
 159. Llinàs L, Peinado VI, Ramon Goñi J, Rabinovich R, Pizarro S, Rodriguez-Roisin R, et al. Similar gene expression profiles in smokers and patients with moderate COPD. *Pulm Pharmacol Ther* [Internet]. 2011 Feb [cited 2024 Jul 23];24(1):32–41. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20970515/>
 160. López CC, Santos AS, Castellano AL, Rivero SC, Atienza JB, Dávila EG, et al. Eosinophil Subtypes in Adults with Asthma and Adults with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2023 Jul 15;208(2):155–62.
 161. Huang H, Huang X, Zeng K, Deng F, Lin C, Huang W. Interleukin-6 is a Strong Predictor of the Frequency of COPD Exacerbation Within 1 Year. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* [Internet]. 2021 [cited 2024 Apr 19];16:2945. Available from: [/pmc/articles/PMC8560075/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33609487/)
 162. B K Rubin JT. Macrolide antibiotics as biological response modifiers. *Curr Opin Investig Drugs* [Internet]. 2000;1(2):169–72. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11249569/>
 163. Keir HR, Shoemark A, Dicker AJ, Perea L, Pollock J, Giam YH, et al. Neutrophil extracellular traps, disease severity, and antibiotic response in bronchiectasis: an international, observational, multicohort study. *Lancet Respir Med* [Internet]. 2021 Aug 1 [cited 2024 Jul 25];9(8):873–84. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33609487/>

