

Cèl·lules inflammatòries en la Malaltia Pulmonar Obstructiva Crònica

Jordi Olloquequi González

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.tesisenxarxa.net) 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. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (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.tesisenred.net) 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. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (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.tesisenxarxa.net) service 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 neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This 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.



**UNIVERSITAT DE BARCELONA
FACULTAT DE BIOLOGIA**

Departament de Biologia Cel·lular

Cèl·lules inflammatòries en la Malaltia Pulmonar Obstructiva Crònica

**Memòria presentada per
Jordi Olloquequi González**

**Per optar al grau de
DOCTOR PER LA UNIVERSITAT DE BARCELONA**

Tesi doctoral realitzada sota la direcció del **Dr. José García Valero**, del **Dr. Juan Francisco Montes Castillo** i del **Dr. Jaume Ferrer Sancho**.

Programa de doctorat de Fisiologia. Bienni: 2006-2008.

Vistiplau dels directors,

El doctorand,

*Aquest treball és pels familiars, amics i
companys que m'han fet costat
durant aquest llarg camí.*

*En especial, vull dedicar la tesi a mon pare,
a ma mare, a ma germana, a ma àvia
i a la Meri; mai no podré agrair-los prou
el que fan i han fet per mi.*

Índex

Llistat d'abreviatures	iii
Introducció	1
1. La Malaltia Pulmonar Obstructiva Crònica (MPOC)	1
2. Epidemiologia de l'MPOC	1
3. Diagnòstic clínic de l'MPOC	2
4. Factors de risc	5
5. Anatomopatologia de l'MPOC	6
6. Etiologia de l'MPOC	8
7. La resposta inflamatòria vers els agents etiològics de l'MPOC	9
7.1 La inflamació aguda	10
7.2 La inflamació crònica	12
8. L'MPOC com a malaltia inflamatòria	12
9. Efectors cel·lulars inflamatoris en l'MPOC	14
9.1 Els neutròfils	15
9.2 Els macròfags	17
9.3 Els mastòcits	19
9.4 Les cèl·lules CD57 ⁺	21
9.5 Els limfòcits	22
9.5.1 Els limfòcits T	22
9.5.1.1 Els limfòcits T citotòxics (limfòcits T CD8 ⁺)	23
9.5.1.2 Els limfòcits T col·laboradors (limfòcits T CD4 ⁺)	24
9.5.2 Els limfòcits B	25
10. La inflamació crònica en l'MPOC: els òrgans limfoïdes terciaris	26
10.1 Els òrgans limfoïdes terciaris en l'MPOC	27
Objectius	31
Resultats	33
Capítol I. Differential lymphocyte infiltration in small airways and lung parenchyma in COPD patients	33

Capítol II. Significant increase of CD57 ⁺ cells in pulmonary lymphoid follicles of COPD patients	35
Discussió	37
Conclusions	47
Bibliografia	49
Annex I: Informe dels directors	77
Annex II: Material i mètodes	79

Llistat d'abreviatures

ABC	Complex avidina-biotina
ANOVA	Anàlisi de la variància
BAL	Rentada bronquialveolar
BALT	Teixit limfoide associat als bronquis
BMI	<i>Body mass index</i> (veure IMC)
BODE	Índex de massa corporal, obstrucció, dispnea i capacitat per l'exercici físic
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
COPD	<i>Chronic obstructive pulmonary disease</i> (veure MPOC)
CXCR3	<i>CXC-chemokine receptor 3</i>
DAB	Diaminobenzidina
EPI-SCAN	Estudi epidemiològic de l'MPOC a Espanya
FDC	Cèl·lules dendrítiques fol·liculars
FEV₁	Volum espirat forçat en el primer segon
FVC	Capacitat vital forçada
GEM	Grau d'emfisema macroscòpic
GM-CSF	Factor estimulant de colònies de granulòcits i de macròfags
GOLD	<i>Global initiative for chronic obstructive lung disease</i>
HEV	Vènules d'endoteli alt
HNE	Elastasa humana de neutròfils
HRCT	Tomografia computada d'alta resolució
Ig	Immunoglobulina
IL	Interleucina
IMC	Índex de massa corporal
INF	Interferó
IPF	Fibrosi pulmonar idiopàtica
LF	Fol·licles limfoides (veure OL3)
LT	Leucotriè
MAdCAM	Adrecina d'adhesió cel·lular de mucoses
MALT	Teixit limfoide associat a mucoses
MC	Mastòcits
MCP	Proteïna quimiotàctica de monòcits
MED	<i>Macroscopic emphysema degree</i> (veure GEM)
MIP	Proteïna inflamatòria de macròfags

MMP	Metal·loproteasa de matriu
MPOC	Malaltia pulmonar obstructiva crònica
MRC	<i>Medical research council</i>
NALT	Teixit limfoide associat a la mucosa nasal
NK	<i>Natural killer cells</i>
NLR	Receptor de tipus <i>Nod</i>
OL3	Òrgan limfoide terciari
OMS	Organització mundial de la salut
PAF	Factor activador de plaquetes
PaO₂	Pressió parcial d'oxigen arterial
PBS	Tampó fosfat salí
PECAM	Molècula d'adhesió de plaquetes i de cèl·lules endotelials
PG	Prostaglandina
PNAd	Adrecina de nòduls perifèrics
RNS	Espècie reactiva de nitrogen
ROS	Espècie reactiva d'oxigen
RV	Volum residual
SURS	<i>Systematic uniform random sampling</i>
TC	Tomografia computada
TGF	Factor de creixement transformant
TLC	Capacitat pulmonar total
TLR	Receptor de tipus <i>Toll</i>
TNF	Factor de necrosi tumoral
VEGF	Factor de creixement endotelial vascular
VEGFR	Receptor del factor de creixement endotelial vascular

Introducció

1. LA MALALTIA PULMONAR OBSTRUCTIVA CRÒNICA (MPOC)

La malaltia pulmonar obstructiva crònica (MPOC) és un procés patològic lent i progressiu caracteritzat per l'obstrucció permanent, i no totalment reversible, del flux d'aire als bronquïols i de l'increment de la compliància del pulmó com a resultat de la presència d'emfisema (Hogg, 2004).

L'origen de l'MPOC s'associa a una exposició crònica a gasos nocius i partícules, sobretot, al fum del tabac. Malgrat això, les causes de la patologia són multifactorials, i poden incloure tant trastorns genètics com factors ambientals (contaminació de l'aire, infeccions, nutrició, etc) (Mannino i Buist, 2007).

2. EPIDEMIOLOGIA DE L'MPOC

Segons l'Organització Mundial de la Salut (OMS), 210 milions de persones a tot el món pateixen l'MPOC (Mathers, 2008). Al 2005, més de 3 milions de persones van morir a causa d'aquesta malaltia, xifra que va suposar el 5% del total de defuncions aquell any. Tot i que un percentatge considerable de l'MPOC pot prevenir-se mitjançant l'abstenció del consum de tabac, la seva prevalença va en augment. Així, l'OMS ha pronosticat que a l'any 2030 l'MPOC causarà el 7,8% de totes les morts i el 27% de les morts relacionades amb el tabac, taxa només superada pel càncer (33%) i les malalties cardiovasculars (29%) (Mathers i Roncar, 2006). A més, les estimacions globals de mortalitat situen l'MPOC com la quarta causa de mort en l'actualitat, i s'estima que esdevindrà la tercera a l'any 2020 (Soriano i Miravittles, 2007).

El darrer estudi epidemiològic de l'MPOC a Espanya (EPI-SCAN, 2007) va mostrar que la prevalença de la malaltia a la població és del 10,2% (15,1% en homes i 5,7% en dones), en edats compreses entre els 40 i els 80 anys (Miravittles i cols, 2008; Ancochea i cols, 2009). A més a més, l'impacte que genera l'MPOC sobre el *Sistema Nacional de Salut* és molt elevat. Així, estimacions recents sobre les despeses generades per l'MPOC a Espanya van des de 473 milions d'euros anuals (Miravittles i cols, 2009) fins a una xifra equivalent al 0,2% del Producte Interior Brut (Peces-Barba i cols, 2008).

3. DIAGNÒSTIC CLÍNIC DE L'MPOC

L'MPOC comprèn tant els símptomes clínics de la bronquitis/bronquiolitis crònica com els de la patologia derivada de l'emfisema. Els criteris clínics de la bronquitis crònica es defineixen per presència de tos i expectoració amb una durada superior als tres mesos a l'any durant més de dos anys consecutius. Per la seva banda, l'emfisema pulmonar s'avalua per criteris anatomopatològics, a partir de l'engrandiment permanent dels espais aeris distals i la destrucció de les parets alveolars sense observar-se fibrosi aparent (Barberà i cols, 2001).

En el decurs de la malaltia apareixen tres símptomes principals que progressen al llarg de la seva evolució: tos crònica, expectoració i dispnea. La confirmació diagnòstica s'obté en realitzar proves espiromètriques, les quals permeten determinar l'obstrucció del flux aeri i el grau d'alteració de la funció pulmonar a partir del volum espirat forçat en el primer segon (FEV_1), la capacitat vital forçada (FVC) i la relació d'aquests dos paràmetres clínics (FEV_1/FVC) (GOLD, 2007).

Les espirometries dels malalts afectats per l'MPOC mostren una acceleració en la pèrdua del FEV_1 relacionada amb la gravetat de la malaltia (Figura 1). Aquesta disminució progressiva origina dificultats respiratòries durant l'esforç físic, les quals poden derivar en una fallida respiratòria (Barnes, 2003).

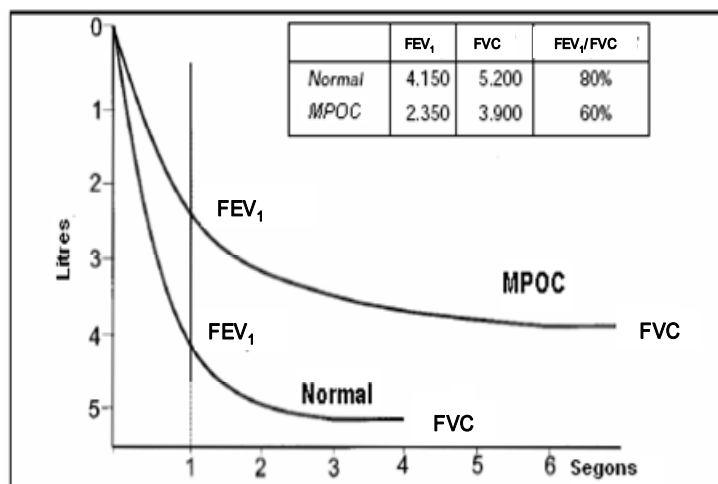


Figura 1. Comparació del FEV_1 i de la FVC en individus normals i en pacients afectats per l'MPOC (adaptat de GOLD, 2007)

A causa de l'ampli espectre de formes clíniques que presenta l'MPOC, la *Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease* (GOLD, 2007) ha establert una classificació pels diferents estadis de gravetat de la malaltia basant-se fonamentalment en el valor del FEV₁ i la seva relació amb la FVC (Taula 1).

Taula 1. Estadis de gravetat de l'MPOC definits per la GOLD (2007)

ESTADI I (MPOC lleu)	<ul style="list-style-type: none"> - FEV₁/FVC < 0.70 - FEV₁ ≥ 80% del valor teòric pel grup d'edat - Amb o sense símptomes crònics (tos i expectoració)
ESTADI II (MPOC moderada)	<ul style="list-style-type: none"> - FEV₁/FVC < 0.70 - 50% ≤ FEV₁ < 80% del valor teòric pel grup d'edat - Amb dispnea i possibles símptomes crònics (tos i expectoració)
ESTADI III (MPOC greu)	<ul style="list-style-type: none"> - FEV₁/FVC < 0.70 - 30% ≤ FEV₁ < 80% del valor de referència pel grup d'edat - Accentuació de la dispnea, capacitat d'exercici reduïda, fatiga, exacerbacions comuns
ESTADI IV (MPOC molt greu)	<ul style="list-style-type: none"> - FEV₁/FVC < 0.70 - FEV₁ < 30% del valor teòric pel grup d'edat o FEV₁ < 50% del valor teòric pel grup d'edat amb elements d'insuficiència respiratòria crònica

Donat que en l'MPOC la reducció del flux aeri és crònica i el tractament no permet una reversió significativa, la seva caracterització per criteris espiromètrics és limitada. Per aquest motiu, també és convenient avaluar la severitat de l'MPOC considerant el grau de dispnea, la capacitat per a l'exercici físic, l'Índex de Massa Corporal (IMC), la PaO₂ i la presència de signes clínics de *cor pulmonale* (insuficiència cardíaca dreta). En aquest sentit, per tal de poder caracteritzar millor l'MPOC, és necessari valorar tant les manifestacions respiratòries com sistèmiques de la malaltia, i per això s'ha introduït l'índex BODE (Celli i cols, 2004). Aquest índex es calcula tenint en compte l'IMC (en anglès BMI, d'on prové la B de l'índex BODE), el grau de

l'Obstrucció del flux (estimat amb el FEV₁), la Dispnea i la capacitat per a l'Exercici físic (que corresponen a la resta de lletres de l'acrònim BODE). A la Taula 2 s'observen les variables i els valors de referència per a calcular l'índex BODE.

Taula 2. Variables i valors assignats per al càlcul de l'índex BODE

VARIABLE	PUNTS			
	0	1	2	3
FEV ₁ , % del predit	≥ 65	50-64	36-49	≤ 35
Distància caminada en 6 min, m	≥ 350	250-349	150-249	≤ 149
Dispnea, escala del MRC	0-1	2	3	4
Índex de massa corporal, kg/m ²	≥ 21	≤ 21		

FEV₁: volum espirat forçat en el primer segon. MRC: escala del *Medical Research Council* (UK).

L'índex BODE, a més, ha demostrat ser una bona eina per predir la mortalitat dels malalts d'MPOC (Celli i cols 2004; Martínez i cols, 2008), i així, els valors més baixos de l'índex indiquen una menor probabilitat de supervivència (Figura 2).

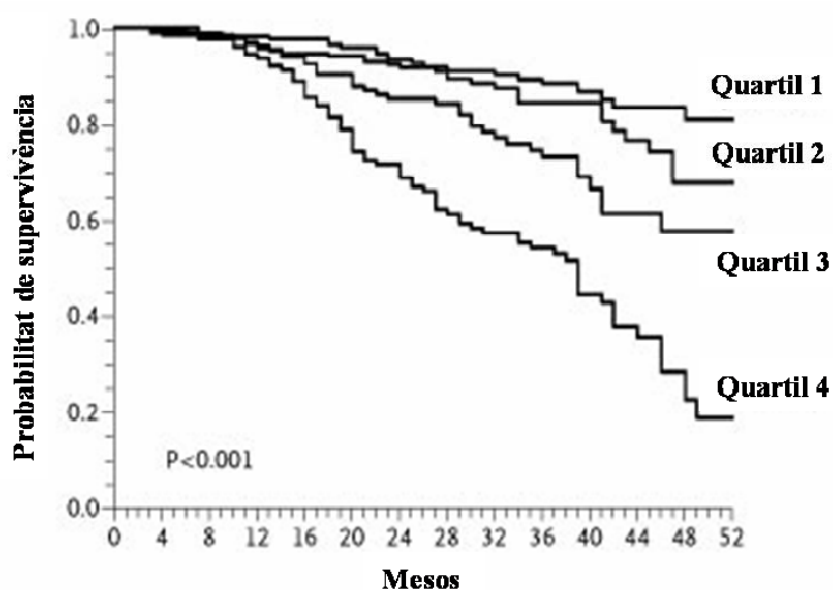


Figura 2. Corbes de supervivència de Kaplan-Meier pels quatre quartils de l'índex BODE (adaptat de Celli i cols. 2004)

4. FACTORS DE RISC

El fum del tabac és considerat el principal agent etiològic de l'MPOC i s'estima que més del 50% dels fumadors acaben desenvolupant la malaltia (Lundbäck i cols, 2003; Mannino i cols, 2006; Rennard i Vestbo, 2006). L'exposició crònica al fum del tabac inicia una sèrie de processos que causen danys a les vies aèries així com als espais alveolars terminals, donant lloc a anomalies fisiològiques i clíniques (Sutherland i Martin, 2003). El risc que tenen els fumadors de desenvolupar l'MPOC és dependent del fum total inspirat, habitualment mesurat com a paquets-any (1 paquet-any equival a 1 paquet de 20 cigarretes fumades cada dia durant 1 any). S'estima que a partir dels 30 paquets-any el risc de desenvolupar la malaltia augmenta de forma significativa (Sobradillo i cols, 1999), malgrat l'edat en què es comença a fumar també esdevé un factor de risc important (GOLD, 2007). S'ha demostrat que deixar de fumar té un efecte beneficiós a qualsevol edat, ja que es redueix la taxa de disminució del FEV₁ (Hogg, 2004) tot i que no es recupera la capacitat pulmonar normal i persisteixen els canvis estructurals iniciats pel tabac.

Malgrat que no es pot comparar la importància que té el fum del tabac en relació a altres factors de risc, s'ha demostrat que tant l'exposició ocupacional o ambiental a determinats gasos, pols, vapors o fums (Trupin i cols, 2003; Ramirez-Venegas i cols, 2006; Mannino i Buist, 2007), així com la susceptibilitat i la hiperreactivitat bronquial individual (Sparrow i cols, 1988; O'Byrne i Postma, 1999), les infeccions respiratòries a la infantesa (Shaheen i cols, 1995), l'asma (Sparrow i cols, 1988; Ulrik i Baker, 1999; Meyer i cols, 2002), la malnutrició (Romieu i Trenga, 2001), l'àmbit socioeconòmic (Fishman, 2005), factors genètics (Silverman i Speizer, 1996; Lomas i Silverman, 2001; Mayer i Neuman, 2001) i el consum d'alcohol (Fishman, 2005), entre altres, incrementen el risc de desenvolupar l'MPOC. A banda d'això, alguns estudis recents han investigat el paper de l'envelliment tant en la prevalença (Johannessen i cols, 2005; Gan i cols, 2006) com en la progressió i pronòstic (Ramírez i cols, 2006) de la malaltia, però no s'han obtingut resultats conclouents.

5. ANATOMOPATOLOGIA DE L'MPOC

Els bronquíols i el parènquima pulmonar constitueixen els compartiments pulmonars més afectats per la malaltia. Malgrat això, altres estructures com els bronquis i els vasos sanguinis pulmonars també poden veure's afectades. Les principals alteracions anatomopatològiques són:

1) **Bronquíols.** L'epiteli presenta una hiperplàsia de cèl·lules caliciformes, una metaplàsia de cèl·lules escamoses i una substitució de cèl·lules de Clara per cèl·lules mucoses (Shapiro i Ingenito, 2005). En el conjunt de la paret hi ha una infiltració inflamatòria, constituïda principalment per neutròfils, limfòcits i macròfags. En estadis més avançats es poden observar fenòmens de fibrosi i hipertròfia del múscul llis, així com l'aparició de fol·licles limfoides a les parets bronquiolars (Barnes, 2004a; Hogg, 2008). Aquestes alteracions provoquen l'engruiximent de la paret i la distorsió i estrenyiment de la llum bronquiolar, factors de gran rellevància en la limitació al flux aeri. La infiltració inflamatòria es pot estendre a les parets alveolars peribronquiolars i contribuir a la seva destrucció, amb la pèrdua consegüent de suport que contribueix a l'augment de la resistència al flux aeri (Barberà i Cosío, 1997) (Figura 3).

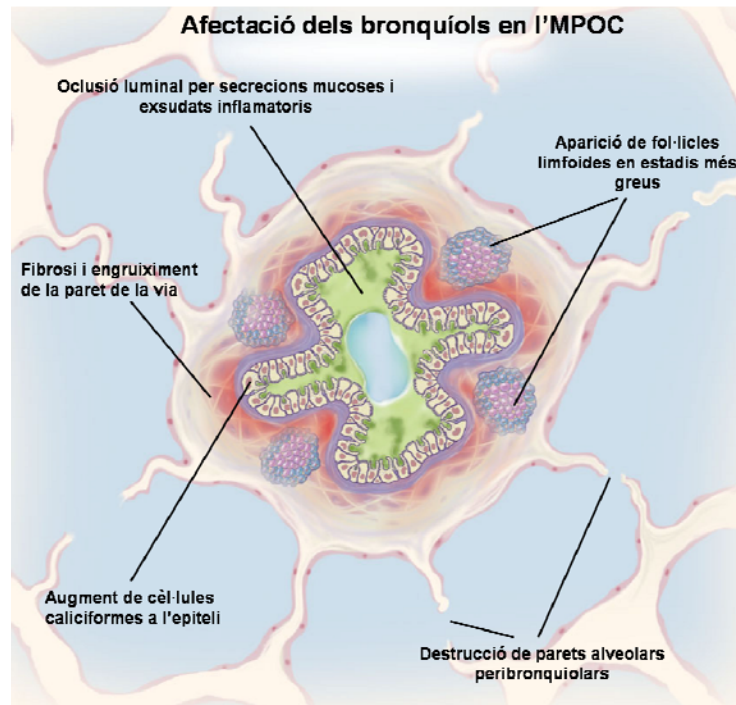


Figura 3. Esquema dels trets patològics característics d'un bronquíol en l'MPOC (Barnes, 2004a)

2) **Parènquima pulmonar.** L'alteració anatomopatològica més característica és l'emfisema, que consisteix en l'engrandiment anòmal dels espais aeris distals als bronquíols terminals i que s'acompanya de destrucció de la paret alveolar, sense que hi hagi fibrosi manifesta de les parets alveolars (Barberà i Cosío, 1997) (Figura 4).

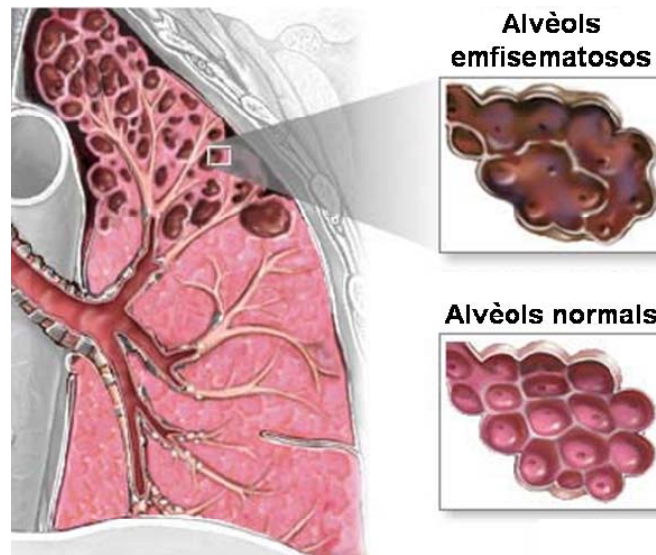


Figura 4. Esquema d'una regió de parènquima pulmonar afectada per emfisema, comparada amb una regió normal.

Procedent de <http://www.unc.edu/>

3) **Bronquis.** Les vies aèries principals també presenten trets patològics característics de la malaltia. En els bronquis s'observa un increment de glàndules mucoses, engruiximent de la capa muscular, infiltració inflamatòria i atròfia cartilaginosa. Aquestes alteracions produeixen l'engruiximent de la paret i major tendència al seu col·lapse. La lesió bronquial més característica és l'augment del gruix de la capa glandular, que es correlaciona amb la hipersecreció mucosa (Shapiro i Ingenito, 2005), però no influeix significativament en el grau d'obstrucció al flux aeri.

4) **Vasos sanguinis pulmonars.** Les alteracions vasculars principals consisteixen en una hipertròfia muscular i un engruiximent de la capa íntima de les artèries musculars, així com la muscularització de les arterioles de poc diàmetre. Aquestes lesions poden observar-se en fases inicials de la malaltia i s'associen a una disfunció endotelial (Barberà i cols, 2001), però són més aparents en els estadis avançats de la malaltia, quan hi ha hipoxèmia i hipertensió pulmonar (Barberà i Cosío, 1997).

6. ETIOLOGIA DE L'MPOC

S'han proposat diverses hipòtesis sobre els mecanismes patogènics de l'MPOC, malgrat que cap d'elles pot explicar totalment el desenvolupament de la malaltia. Actualment, les cinc hipòtesis més acceptades són les següents:

1) **Alteració en l'equilibri elastasa/antielastasa.** El desequilibri entre elastases i els seus inhibidors afavoriria la degradació de la matriu extracel·lular i l'aparició d'emfisema (Gross i cols, 1965). La deficiència d' α_1 -antitripsina, inhibidor principal de l'elastasa dels neutròfils, seria determinant en la destrucció de les fibres elàstiques i promouria la inflamació (Lomas i cols, 1993).

2) **Inflamació/recanvi de la matriu extracel·lular.** El fum del tabac induiria la producció de metal·loproteases per part dels macròfags, les quals degradarien l'elastina en fragments que resulten quimiotàctics pels monòcits. Aquesta retroalimentació positiva promouria el procés inflamatori, l'acumulació de macròfags i la destrucció del pulmó (Shapiro i Ingenito, 2005).

3) **Destret oxidatiu.** El fum del tabac i les cèl·lules inflamatòries tenen la capacitat de produir espècies reactives d'oxigen (ROS). Aquests agents oxidants promouen i mantenen un estat inflamatori que afavoriria la degradació de la matriu extracel·lular mitjançant la inhibició d'antiproteases, com l' α_1 -antitripsina (Ito i cols, 2005).

4) **Apoptosi.** Les cèl·lules endotelials necessiten el factor de creixement endotelial vascular (VEGF)-C per no entrar en apoptosi. El consum de tabac disminueix l'expressió del receptor 2 del VEGF-C (VEGFR-2) induint l'apoptosi de l'endoteli, fet que es traduiria en una manca d'irrigació del teixit, la destrucció d'aquest i l'aparició d'emfisema (Aoshiba i cols, 2003). També s'ha suggerit que el tabac induiria l'apoptosi de fibroblasts intersticials, directament o a través de limfòcits T CD8⁺ derivats de la inflamació, cosa que reduiria la síntesi de fibres d'elastina que mantenen la integritat estructural, tot afavorint l'aparició d'emfisema (Shapiro i Ingenito, 2005).

5) **Reparació ineficient.** La capacitat del pulmó adult per reparar el teixit danyat és limitada. El consum de tabac dona lloc a una inflamació crònica que provoca danys pulmonars, els quals

diffícilment podran ser reparats. A més, a l'emfisema, la reparació de la matriu és aberrant, presentant fibres elàstiques i de col·lagen alterades i desorganitzades (Shapiro i Ingenito, 2005).

7. LA RESPOSTA INFLAMATÒRIA VERS ELS AGENTS ETIOLÒGICS DE L'MPOC

Actualment s'admet que la inflamació contribueix a la gènesi de l'MPOC, tot i que no existeix una hipòtesi patogènica clara que expliqui la manera en què aquesta inflamació influeix en els canvis de l'estructura pulmonar. Malgrat que les bases moleculars d'aquest procés inflamatori s'han de dilucidar, és ben conegut que el fum del tabac i altres irritants del tracte respiratori poden activar l'alliberament de factors quimiotàctics als pulmons per part dels macròfags alveolars i de les cèl·lules epitelials (Barnes i Cosío, 2006). Aquests factors induïrien una infiltració de leucòcits en el teixit pulmonar, que progressaria amb el desenvolupament de la malaltia, tot endegant un patró inflamatori més complex i en el qual es veurien involucrats els limfòcits T i els limfòcits B (Barnes i Cosío, 2006).

La inflamació és una resposta defensiva essencial que s'activa en front dels diversos factors de lesió i que té com a objectiu mantenir l'homeòstasi tissular davant les condicions nocives generades. El procés inflamatori es produeix a expenses d'una disminució transitòria de la funció tissular, la qual pot contribuir a la patogènesi de malalties que cursen amb una alteració homeostàtica (Medzhitov, 2010).

Una resposta inflamatòria típica comprèn quatre elements fonamentals: els inductors de la inflamació, els detectors d'aquests, els efectors inflamatoris (cel·lulars i moleculars) induïts pels detectors i els teixits diana que esdevenen afectats per aquests efectors inflamatoris (Figura 5).

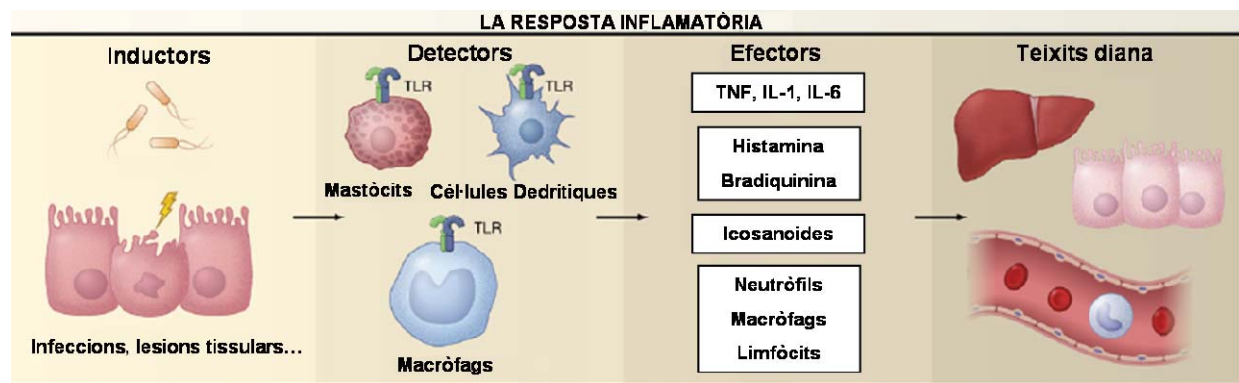


Figura 5. Components de la resposta inflamatòria (adaptat de Medzhitov, 2010)

La naturalesa dels inductors de la inflamació és molt diversa, però poden ser classificats en inductors exògens i inductors endògens, segons el seu origen. Dins dels exògens trobem els agents microbians (patògens o no), els al·lèrgens, els cossos estranys o irritants, i els components tòxics. Els inductors endògens són senyals produïts per teixits amb algun tipus de lesió o sota condicions de destret, cosa que els provoca una disfunció (Medzhitov i Janeway, 1997; Majno i Joris, 2004; Rakoff-Nahoum i cols, 2004; Sokol i cols, 2008).

Els detectors són expressats per cèl·lules especialitzades que fan una funció de sentinelles, com els macròfags residents, les cèl·lules dendrítiques i els mastòcits. Aquestes cèl·lules indueixen l'activació dels efectors cel·lulars de la inflamació, com els neutròfils i els macròfags, i la producció de diverses molècules inflamàtores, incloent-hi citocines, quimiocines, amines, icosanoides i productes de cascades proteolítiques, com la bradiquinina. Aquests efectors poden actuar sobre diferents teixits diana per tal de provocar canvis en el seu patró funcional. D'aquesta manera, s'optimitza l'adaptació vers el factor de lesió associat als elements inductors de la resposta inflamatòria (Medzhitov, 2010).

En funció de les característiques de la resposta inflamatòria, se'n poden distingir dos patrons: la inflamació aguda i la inflamació crònica.

7.1 La inflamació aguda

De manera general, la inflamació aguda és una resposta intensa i de curta durada que porta associada una extravasació coordinada de components sanguinis (plasma i leucòcits) al lloc on és detectat el factor de lesió (Kumar i cols, 2003; Majno i Joris, 2004). El model de resposta inflamatòria depèn del tipus del factor inductor que l'origina.

Si prenem com a model la resposta inflamatòria envers la infecció, els detectors més característics són receptors de la immunitat innata com els receptors de tipus *Toll* (TLRs) o els receptors de tipus *Nod* (NLRs) (Barton, 2008). Així doncs, aquest reconeixement inicial de l'estímul és mediat pels receptors dels macròfags i mastòcits que resideixen als teixits. Aquestes cèl·lules produeixen una gran varietat de mediadors inflamatoris, com quimiocines, citocines, amines vasoactives, icosanoides i productes de cascades proteolítiques (Medzhitov, 2008). L'efecte principal i més immediat d'aquests mediadors és activar l'endoteli dels vasos i produir un exsudat inflamatori local, compost de proteïnes plasmàtiques i leucòcits (sobretot neutròfils,

però també monòcits), que passen de la sang al teixit conjuntiu adjacent on hi ha el factor de lesió, a través de les venes post-capil·lars (Kumar i cols, 2003; Majno i Joris, 2004). Aquesta activació de l'endoteli permet l'extravasació selectiva de leucòcits i evita el pas als eritròcits i a les plaquetes, mercès al reconeixement i al lligament de les selectines de les cèl·lules endotelials amb els receptors de quimiocines i amb les integrines leucocitàries (Pober i Sessa, 2007).

Quan els neutròfils arriben al teixit afectat s'activen, ja sigui per contacte directe amb els patògens o bé per l'acció de citocines secretades per cèl·lules residents del teixit (Majno i Joris, 2004). Un cop activats, els neutròfils inicien l'eliminació dels agents invasius mitjançant l'alliberament de productes tòxics que contenen els seus grànuls, entre els quals s'hi troben ROS i espècies reactives de nitrogen (RNS), proteïnasa 3, catepsina G i elastasa (Nathan, 2006). Aquests efectors no discriminen entre els patògens i les cèl·lules del propi teixit i, per tant, no es pot evitar un dany tissular col·lateral (Nathan, 2002). En el procés d'eliminació del factor de lesió també hi intervenen els macròfags, així com components del plasma, com els anticossos i les proteïnes del complement. Paral·lelament, alguns mediadors proinflamatoris poden tenir un efecte sistèmic i induir la producció de proteïnes de fase aguda per part dels hepatòcits, així com l'aparició de febre, anorèxia, fatiga o insomni (Pecchi i cols, 2009).

La finalització de la resposta inflamatòria i la transició cap a la recuperació de l'estat homeostàtic inicial és un procés actiu i altament regulat anomenat resolució. Es considera que la resposta inflamatòria aguda es resol amb èxit quan hi ha una eliminació del factor lesiu i dels neutròfils extravasats, seguida d'una fase de reparació tissular, la qual és duta a terme fonamentalment pels macròfags residents al teixit afectat i aquells que s'han reclutat en el procés inflamatori (Serhan i Savill, 2005). En aquest punt, la transició dels mediadors lipídics des de prostaglandines proinflamatòries cap a lipoxines, que tenen una activitat antiinflamatòria, és un pas crucial per tal que la resolució del procés inflamatori sigui definitiva. Les lipoxines inhibeixen el reclutament de neutròfils i, paral·lelament, promouen el reclutament de monòcits, que eliminaran les cèl·lules mortes i iniciaran la reparació del teixit (Serhan i Savill, 2005). Uns altres tipus de mediadors lipídics, com són les resolvines i les protectines, a més dels factors de creixement produïts pels macròfags, també tindran un paper fonamental en la resolució de la inflamació i en la reparació del teixit afectat (Serhan i Savill, 2005; Serhan, 2007).

7.2 La inflamació crònica

Si la resposta inflamatòria aguda no és capaç d'eliminar l'estímul inflamatori o bé aquest persisteix al llarg del temps, la fase de resolució no s'assoleix d'una manera adequada i això genera un procés d'inflamació crònica. La inflamació crònica és, per tant, un procés patològic en què l'estat inflamatori persisteix i adquireix característiques pròpies.

A la inflamació crònica, apareixen infiltracions mononuclears que donaran com a resultat una població cel·lular bàsicament composta de macròfags i limfòcits. Les característiques d'aquest procés inflamatori poden variar depenent de la població de limfòcits que s'acumulen als llocs on es troba l'estímul inflamatori (Medzhitov, 2010), però sovint donen com a resultat diferents tipus de remodelatge tissular local, com l'aparició de teixit limfoide terciari o la formació de granulomes, entre d'altres (Kumar i cols, 2003; Majno i Joris, 2004; Drayton i cols, 2006).

Aquest estat inflamatori patològic pot ésser causat per infeccions cròniques, lesions tissulars no reparades, malalties autoimmunitàries, al·lèrgens persistents, partícules estranyes o cristalls d'acumulació endògena (Kumar i cols, 2003; Majno i Joris, 2004; Medzhitov, 2008). A més, s'han descrit episodis d'inflamació crònica en diversos trastorns en què l'estímul inflamatori no és del tot definit, encara que no sembla anar lligat a un procés infecciós o de dany tissular. Aquests estats inflamatoris crònics són d'especial interès perquè acompanyen malalties molt prevalents en països desenvolupats, com l'obesitat, la diabetis de tipus II, l'aterosclerosi, algunes malalties neurodegeneratives o el càncer (Hotamisligil, 2006).

8. L'MPOC COM A MALALTIA INFLAMATÒRIA

La iniciativa GOLD (2007) defineix l'MPOC com a una malaltia que comprèn dos components principals. D'una banda, el pulmonar, caracteritzat per una limitació progressiva del flux aeri no del tot reversible i que està associada a una resposta inflamatòria anormal dels pulmons envers partícules nocives o gasos, i de l'altra, un component inflamatori extrapulmonar, el qual pot contribuir augmentant la gravetat de la malaltia en determinats pacients, donat el seu caràcter sistèmic (Agustí i Soriano, 2008).

Així, s'ha demostrat un augment del TNF- α i del seu receptor en múscul i sang perifèrica, els nivells del qual es relacionen amb la pèrdua de pes que experimenten alguns pacients en les fases més avançades de la malaltia (Oudijk i cols, 2003). De Torres i cols (2006) van trobar uns nivells més alts de proteïna C reactiva en malats d'MPOC, així com una correlació negativa entre la concentració d'aquesta proteïna de fase aguda i diversos indicadors de la funció pulmonar (FEV₁, FVC). També s'ha demostrat que els neutròfils circulants de pacients amb MPOC produeixen més ROS i expressen més molècules d'adhesió (Barnes, 2003). A més, el quocient de limfòcits T tipus CD4/limfòcits T tipus CD8 en sang perifèrica d'aquests pacients està invertit (De Jong i cols, 1997).

D'altra banda, el component local inclou el desenvolupament d'una reacció inflamatòria a les vies aèries i als alvèols dels pacients amb MPOC i es basa en múltiples evidències. Així, per exemple, tant l'esput com la rentada bronquialveolar d'aquests pacients contenen una xifra augmentada de macròfags, neutròfils, quimiocines, com la interleucina (IL)-8, el leucotriè (LT) B₄, la proteïna quimiotàctica de monòcits (MCP)-1 i la proteïna inflamatòria de macròfags (MIP)-1 β , i d'altres agents inflamatoris com el TNF- α , el factor estimulador de colònies de granulòcits i de macròfags (GM-CSF), l'endotelina-1 i diversos neuropèptids (Barnes, 2003). A més, tant el nombre de macròfags i neutròfils, com la concentració d'IL-8 i dels receptors solubles per a TNF- α en esput i mucosa bronquial tenen una relació directa amb el grau d'obstrucció bronquial determinat pel FEV₁ (Di Stefano i cols, 1998; Pesci i cols, 1998). D'altra banda, estudis recents han demostrat que hi ha un increment progressiu en el nombre de cèl·lules inflamatòries en els bronquíols i en el parènquima a mesura que la malaltia esdevé més greu, cosa que succeeix malgrat que els pacients amb un major grau d'obstrucció faci molts anys que hagin deixat de fumar (Hogg, 2004).

En l'MPOC, a banda del procés inflamatori crònic característic, també es donen processos d'inflamació aguda coneguts com a exacerbacions. Les exacerbacions representen una amplificació de la resposta inflamatòria a les vies aèries dels pacients amb MPOC i es caracteritzen per un increment de la dispnea, de la tos i de la producció d'esput (Anthonisen i cols, 1987; Rodríguez-Roisin, 2000; Burge i Wedzicha, 2003; GOLD, 2007). Les causes principals conegudes de les exacerbacions són infeccions víriques i bacterianes, així com la pol·lució ambiental (Sunyer i cols, 1993; Fabbri i Hurd, 2003). En un terç de totes les exacerbacions, però, les causes no poden ésser identificades (White i cols, 2003b). Durant les exacerbacions s'ha observat un increment significatiu de neutròfils i eosinòfils, així com un

augment de la producció de quimiocines proinflamatòries, en esput i en vies aèries (Wedzicha, 2002; Drost i cols, 2005).

Tot i això, malgrat que l'associació de l'MPOC amb un procés inflamatori es basa en evidències nombroses, la manera en què la inflamació contribueix als efectes clínics de la malaltia resta qüestionable. Això és així, principalment, perquè la naturalesa del procés inflamatori en l'MPOC pot diferir significativament entre una persona i una altra (Beeh i Glaab, 2009). A més, actualment no existeix un tractament antiinflamatori efectiu per tractar la malaltia. Mentre que existeixen alguns efectes modestos dels corticosteroides inhalats (Calverley i cols, 2003a, 2003b, 2007; Jones i cols, 2003) i dels inhibidors de la fosfodiesterasa-4 (Gamble i cols, 2003; Giembycz, 2005; Rennard i cols, 2006; Grootendorst i cols, 2007) en el tractament de les exacerbacions, no s'ha demostrat que els efectes observats siguin atribuïbles a millores en el procés inflamatori. En aquest sentit, és important el fet que les exacerbacions també poden ser significativament reduïdes amb tractaments no antiinflamatoris, com els broncodilatadors de llarga durada (Powrie i cols, 2007) o la reducció quirúrgica del volum pulmonar (Washko i cols, 2008).

9. EFECTORS CEL·LULARS INFLAMATORIS EN L'MPOC

L'MPOC es caracteritza per presentar un patró inflamatori específic, que inclou tant respostes de la inflamació aguda com de la crònica, i que es tradueix en una gran diversitat dels efectors cel·lulars (Figura 6) i dels mediadors proinflamatoris que regulen aquest procés.

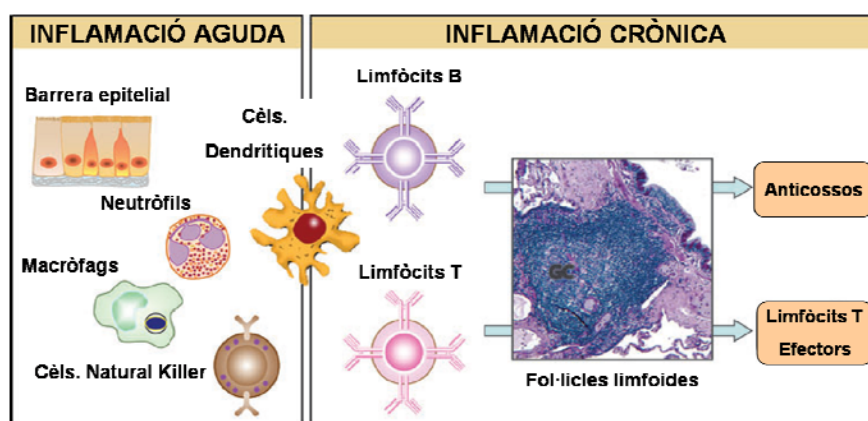


Figura 6. Esquema dels principals efectors cel·lulars implicats en la resposta inflamatòria de l'MPOC (adaptat de Hogg i Timens, 2009)

Alguns autors consideren que aquest patró és una amplificació del què és característic en aquells fumadors que no desenvolupen la malaltia (Barnes i Cosío, 2006). Durant molts anys s'ha pensat que la reacció inflamatòria que es dona en els pulmons dels individus fumadors estava orquestrada per neutròfils i macròfags, i que les elastases dels neutròfils i dels macròfags eren les responsables de la destrucció pulmonar en l'MPOC. Aquest concepte s'ha anat revisant per englobar un procés inflamatori més ampli i que atorga un paper important tant als limfòcits com a d'altres cèl·lules amb activitat citolítica (Di Stefano i cols, 1998; Barnes i Cosío, 2006). Així, diversos autors que han analitzat els perfils cel·lulars en alvèols i bronquíols han demostrat un increment de diversos tipus d'efectors cel·lulars inflamatoris, incloent-hi no solament els macròfags i els neutròfils, sinó també els mastòcits, els limfòcits T i els limfòcits B (Retamales i cols, 2001; Di Stefano i cols, 2004; Hogg, 2004; Andersson i cols, 2010). D'altra banda, l'aparició de fol·licles limfoides (LF) pulmonars en malalts d'MPOC, així com la seva associació amb la gravetat de la malaltia (Hogg i cols, 2004), són una prova del caràcter inflamatori crònic de la malaltia.

9.1 Els neutròfils

Els neutròfils són cèl·lules de la primera línia defensiva del sistema immunitari i les seves funcions més importants inclouen la fagocitosi de microorganismes patògens i la regulació del procés inflamatori agut. També constitueixen una font de ROS (com la mieloperoxidasa), de citocines proinflamatòries (com l'IL-8), de mediadors lipídics (com l'LTB₄), de pèptids antibacterians (com les defensines) i d'enzims que poden danyar els teixits [com l'elastasa humana de neutròfils (HNE) o la catèpsina-G] (Dubravec i cols, 1990; Tetley, 1993; Hiemstra i cols, 1998; Barnes, 2004b). Els neutròfils han estat associats amb l'aparició de metaplasia de cèl·lules mucoses a la bronquitis crònica, així com amb l'augment de la contractibilitat de la musculatura llisa a les vies i també amb la destrucció de teixit pulmonar en l'emfisema (O'Donnell i cols, 2006) (Figura 7).

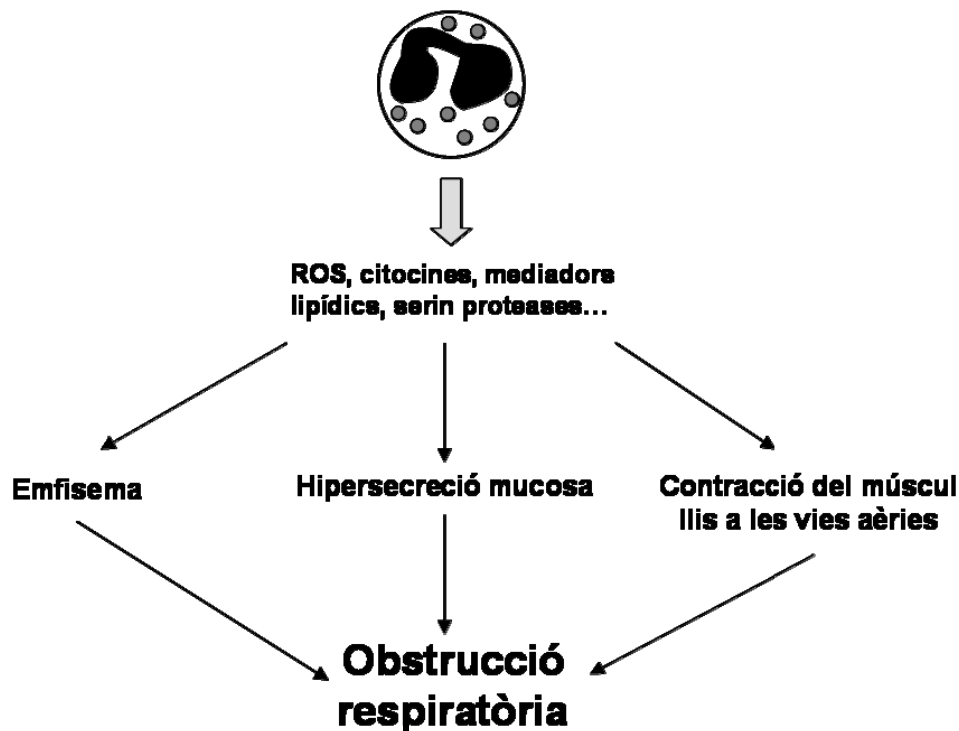


Figura 7. Paper dels neutròfils en la patogènesi de l'MPOC

Com a principals efectors de la inflamació aguda, l'acció dels neutròfils en l'MPOC ha estat molt ben caracteritzada en les exacerbacions de la malaltia. Així, s'ha descrit un increment del nombre de neutròfils a la submucosa i al subepiteli de les vies aèries en les exacerbacions de l'MPOC, comparades amb períodes estables de la malaltia (Qiu i cols, 2003; Fujimoto i cols, 2005; Mercer i cols, 2005; Tsomakidou i cols, 2005; Papi i cols, 2006; Bathoorn i cols, 2008a). Aquest increment dels neutròfils també s'ha detectat en esput i ha estat correlacionat amb una caiguda accentuada del FEV₁ durant les exacerbacions (Papi i cols, 2006; Wilkinson i cols, 2006). Malgrat que l'augment de la densitat dels neutròfils mostra una relació amb la presència de bacteris, tant en les exacerbacions com en les fases estables de l'MPOC (Gompertz i cols, 2001; White i cols, 2003a), l'elevada neutrofilia és també un tret característic en les exacerbacions associades amb infeccions víriques i en aquelles on no s'ha demostrat la presència de microorganismes patògens (Papi i cols, 2006; Bathoorn i cols, 2008b).

Pel que fa al grau d'infiltració pulmonar dels neutròfils durant les fases estables de la malaltia, s'ha demostrat que tant l'esput induït com la rentada bronquialveolar dels malalts d'MPOC presenten un increment del nombre d'aquestes cèl·lules i de la concentració dels seus enzims derivats (Thompson i cols, 1989; Lacoste i cols, 1993; Linden i cols, 1993; Keatings i cols,

1997; Peleman i cols, 1999; Rutgers i cols, 2000; Barnes i Cosío, 2006). A més, alguns estudis han analitzat la densitat dels neutròfils tant en vies aèries com en parènquima pulmonar de malalts d'MPOC, tot i que els resultats no han estat concloents. Així, alguns autors han descrit un increment de la densitat neutrofilica en les vies aèries (Saetta i cols, 1997, 2000; Di Stefano i cols 1998, 2009; Pilette i cols, 2001; Panzner i cols, 2003; Baralado i cols, 2004) i en el parènquima pulmonar (Retamales i cols, 2001) de malalts d'MPOC comparats amb individus sense la malaltia. A més, alguns d'aquests autors també han descrit una correlació entre la densitat bronquial de neutròfils i una davallada del FEV₁ (O'Shaughnessy i cols, 1997; Di Stefano i cols, 1998; Baraldo i cols, 2004). D'altra banda, aquests resultats es contraposen als d'altres estudis que no han trobat diferències significatives en la quantitat de neutròfils infiltrats en els compartiments esmentats entre malalts i no malalts d'MPOC (Bosken i cols, 1992; Saetta i cols, 1993, 1998, 1999; Grasshoff i cols, 1997; O'Shaughnessy i cols, 1997; Lams i cols, 1998, 2000; Rutgers i cols, 2000; Majó i cols, 2001; Turato i cols, 2002; Willemse i cols, 2005). Aquestes discordances podrien ser un reflex de la curta durada de la vida dels neutròfils infiltrats en un teixit i del seu ràpid trànsit a través de les vies aèries i el parènquima pulmonar (Barnes i Cosío, 2006; O'Donnell i cols, 2006), fet que provoca una gran variabilitat en les estimacions de les densitats d'aquestes cèl·lules.

9.2 Els macròfags

Els macròfags són cèl·lules amb un paper clau tant en la inflamació aguda com en la crònica i representen la majoria de cèl·lules inflamatòries presents al tracte respiratori, tant en individus fumadors, com en no fumadors (Linden i cols, 1993; Kushner i cols, 1996). Els macròfags poden ésser considerats com a cèl·lules efectores de llarga vida, amb capacitat reactiva, ja que responen a estímuls endògens i exògens, però també activa, donat que produeixen mediadors que modulen l'acció de les cèl·lules que els envolten (Tetley, 2002). D'aquesta manera, els macròfags esdevenen un element essencial en totes les respostes inflamatòries, ja sigui fagocitant organismes patògens, com eliminant partícules inhalades i neutròfils apoptòtics. Probablement, el seu paper en l'MPOC sigui un reflex de les seves nombroses propietats funcionals (Figura 8).

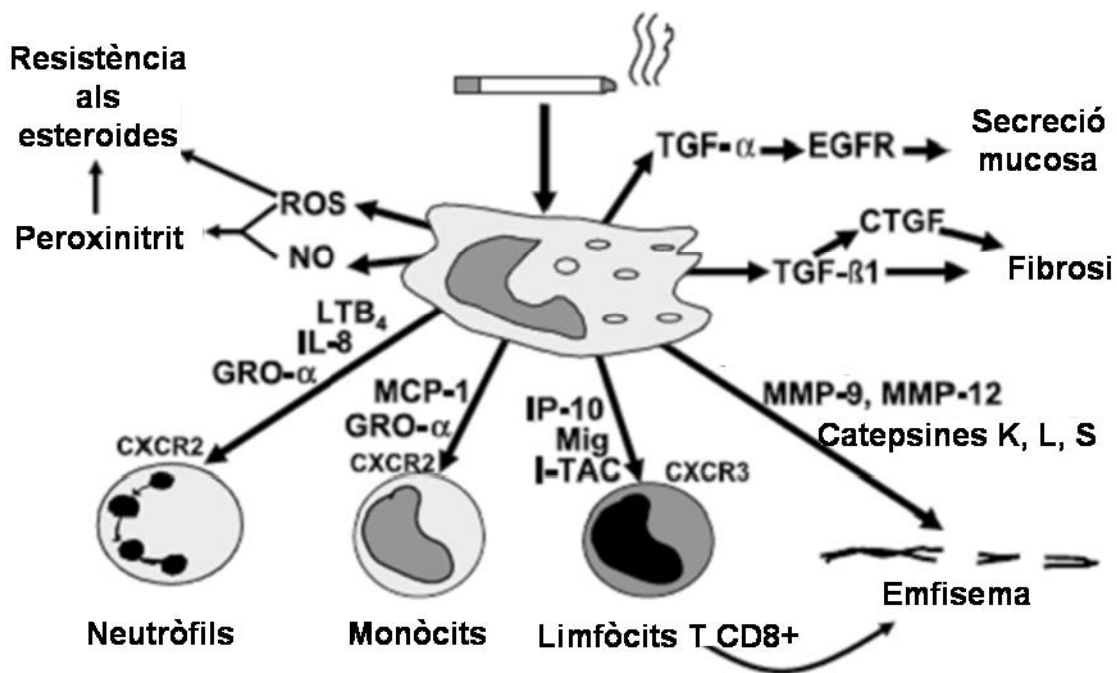


Figura 8. Paper dels macròfags en la patogènesi de l'MPOC (Barnes, 2004c)

Els macròfags poden secretar diverses molècules entre les que s'inclouen factors quimiotàctics (com l'MCP-1), citocines pro-inflamatòries (com l'IL-8 o el TNF- α), constrictors de la musculatura llisa [com el factor activador de plaquetes (PAF)], activadors de la secreció de les glàndules mucoses [com el factor transformador de creixement (TGF)- β] i proteïnes de la matriu extracel·lular (com la fibronectina o la decorina) (Nathan, 1987; Barnes 2004c; Murugan i Peck, 2009). A més, són també una font de metal·loproteases de matriu (MMPs) que, en combinar-se entre sí, poden degradar un espectre de molècules similar al de les proteases dels neutròfils (Tetley, 1993) i també facilitar la migració i la infiltració dels leucòcits cap a teixits danyats (Kumagai i cols, 1999). D'entre totes les MMPs, l'MMP-9 i l'MMP-12 (també coneguda com a elastasa dels macròfags) són les que més s'han relacionat amb la patogènesi de l'MPOC (Finlay i cols, 1997; Ohnishi i cols, 1998; Russell i cols, 2002; Churg i cols, 2003; Garbacki i cols, 2009). Paral·lelament, els macròfags també tenen la capacitat d'internalitzar i secretar l'HNE, fet que pot afegir encara un major potencial proteolític a aquestes cèl·lules (Finlay i cols, 1997; O'Donnell i cols, 2006).

En relació a la quantitat de macròfags presents als pulmons dels malalts d'MPOC, s'ha demostrat un increment en el nombre d'aquestes cèl·lules tant en l'esput induït (Keatings i cols, 1997) com en la rentada bronquialveolar (Linden i cols, 1993; Kuschner i cols, 1996; Capelli i

cols, 1999) dels individus que pateixen la malaltia. Paral·lelament, nombrosos estudis han descrit una major densitat de macròfags en les vies aèries i en el parènquima dels malalts d'MPOC, comparats amb individus sense la malaltia (Saetta i cols, 1993, 1997, 2000; Finkelstein i cols, 1995; Di Stefano i cols, 1996, 1998; Grashoff i cols, 1997; O'Shaughnessy i cols, 1997; Rutgers i cols, 2000; Retamales i cols, 2001; Turato i cols, 2002; Panzner i cols, 2003). A més, s'ha descrit una correlació entre la quantitat de macròfags infiltrats al subepiteli bronquial i la davallada del FEV₁ (Di Stefano i cols, 1998), mentre que la densitat dels macròfags infiltrats en les parets alveolars ha mostrat una correlació positiva amb la gravetat de l'emfisema (Finkelstein i cols, 1995).

9.3 Els mastòcits

Els mastòcits actuen com a cèl·lules sentinelles del sistema immunitari i ho fan amb una gran eficiència, donat que tenen receptors capaços de detectar gairebé qualsevol factor de lesió (Dawicki i Marshall, 2007; Metz i cols, 2007). Són cèl·lules que es troben àmpliament distribuïdes per tots els teixits vascularitzats, on normalment resideixen a prop de vasos sanguinis, de nervis, de cèl·lules de la musculatura llisa, de glàndules mucoses i de fol·licles pilosos, i també són especialment abundats en aquells llocs que estan en contacte directe amb el medi extern, com la pell, les vies aèries i el tracte gastrointestinal (Kitamura, 1989; Metcalfe i cols, 1997; Galli i cols, 2005a; Galli i cols, 2005b; Marone i cols, 2005).

Tot i que els mastòcits són ben coneguts per la seva funció efectora en processos al·lèrgics, durant els últims anys s'ha caracteritzat un ampli ventall de funcions immunitàries que aquestes cèl·lules poden desenvolupar i que van des de la iniciació i el manteniment dels processos desencadenants de la inflamació aguda, fins a l'activació de les respostes de la immunitat innata (Metz i Maurer, 2007). Això és així mercès a la seva capacitat per produir i secretar un ampli ventall de mediadors actius (com la histamina, els proteoglicans i les proteases neutres), de citocines i quimiocines (com el TNF- α o la limfotactina), i de mediadors lipídics [com la prostaglandina (PG) -D₂], entre altres (Boesiger i cols, 1998; Grützkau i cols, 1998; Maurer i cols, 2003; Galli i cols, 2005b; Grimbaldston i cols, 2006; Theoharides i Kalogeromitros, 2006), i que jugaran un paper immunoregulador molt important sobre diferents tipus cel·lulars (Figura 9).

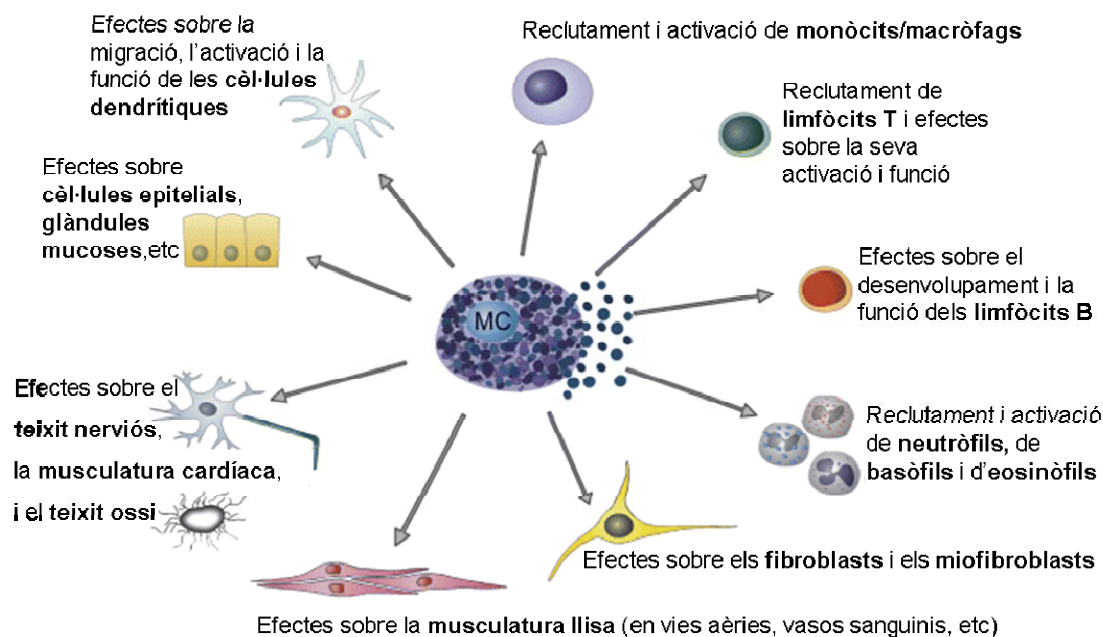


Figura 9. Paper dels mastòcits (MC) en la resposta inflamatòria (adaptat de Metz i cols, 2007)

En els pulmons d'individus sans, els mastòcits hi són presents en tots els compartiments histològics (Caroll i cols, 2002; Andersson i cols, 2009). Malgrat que la gran capacitat inflamatòria d'aquestes cèl·lules les converteix en elements potencialment rellevants en la patogènesi de l'MPOC, molt pocs estudis han trobat una major densitat dels mastòcits en els pulmons d'individus que pateixen la malaltia. Així, només hi ha un treball que demostrï una densitat significativament superior de mastòcits en bronquíols de malalts d'MPOC (Grashoff i cols, 1997), mentre que diversos autors han mostrat que no existeixen diferències significatives en el nombre de mastòcits infiltrant bronquis (Saetta i cols, 1993, 1997; Di Stefano i cols, 1996; O'Shaughnessy i cols, 1997; Rutgers i cols, 2000; Panzner i cols, 2003; Baraldo i cols, 2004; Willemse i cols, 2005) i parènquima (Saetta i cols, 1999; Andersson i cols, 2010) de malalts i no malalts d'MPOC. D'altra banda, estudis recents mostren una reducció significativa de la densitat total de mastòcits tant en bronquis (Gosman i cols, 2008) com en bronquíols i vasos pulmonars (Andersson i cols, 2010) de malalts d'MPOC comparats amb individus no malalts, i fins i tot s'ha trobat una correlació positiva entre el nombre de mastòcits infiltrant bronquíols i el FEV₁ (Gosman i cols, 2008).

9.4 Les cèl·lules CD57⁺

Les cèl·lules amb activitat citolítica tenen un paper fonamental en l'eliminació de cèl·lules infectades per virus o canceroses (Loetscher i cols, 1996; Taub i cols, 1996). A més, s'ha demostrat que les cèl·lules immunitàries que expressen marcadors de citotoxicitat també poden jugar un paper important en la regulació de respostes de la immunitat adquirida (Smyth i cols, 2005; Andoniou i cols, 2008; Fairclough i cols, 2008). Un dels tipus cel·lulars amb aquestes característiques, com les cèl·lules CD57⁺, constitueix un dels efectors inflamatoris menys estudiats en l'àmbit de l'MPOC.

D'ençà que l'antigen CD57 fou descrit per primer cop com a un marcador específic de cèl·lules *Natural Killer* (NK) i de cèl·lules T NK humanes (Abo i Balch, 1981), diversos estudis han relacionat les cèl·lules CD57⁺ amb algunes malalties de caire infeccioses o que impliquen una deficiència immunitària (Focosi i Petrini, 2007). En l'actualitat, es considera que el CD57 és un bon marcador de cèl·lules amb potencial citotòxic, ja que s'ha demostrat que en cèl·lules mononuclears de sang perifèrica, l'expressió de CD57 es correlaciona amb la d'altres molècules indicadores d'una activitat citolítica, com són els granzims A i B i la perforina (Chattopadhyay i cols, 2009).

Tot i que la capacitat que tenen les cèl·lules amb activitat citolítica de danyar l'epiteli pulmonar o de reclutar altres cèl·lules immunitàries als pulmons les converteixen en uns possibles efectors a tenir en compte en la patogènesi de l'MPOC (Fairclough i cols, 2008), només s'han realitzat dos estudis analitzant les cèl·lules CD57⁺ en pulmons d'individus amb la malaltia. Un d'ells va demostrar que les cèl·lules CD57⁺ presents als pulmons de malalts i no malats d'MPOC també coexpressaven els granzims A i B (Vernooy i cols, 2003). En l'altre estudi es va trobar una densitat de cèl·lules CD57⁺ significativament més elevada al subepiteli bronquial de malalts d'MPOC, respecte dels fumadors sense la malaltia (Di Stefano i cols, 1998). A més, també es va trobar una correlació inversa entre la quantitat d'aquestes cèl·lules en bronquis de fumadors amb i sense l'MPOC i el FEV₁ (Di Stefano i cols, 1998).

9.5 Els limfòcits

Els resultats obtinguts en els últims anys han posat de manifest que a l'MPOC es desenvolupa un procés inflamatori complex que no pot estar focalitzat en un sol tipus cel·lular. Segons aquesta idea, la cooperació entre diferents tipus de cèl·lules inflamatòries, des de les cèl·lules epitelials fins a les dendrítiques, passant pels neutròfils, macròfags i mastòcits, seria necessària per al desenvolupament de la resposta inflamatòria característica de la malaltia. És en aquest punt on s'ha proposat que els limfòcits podrien actuar com a “directors” del procés inflamatori, activant les altres cèl·lules que, a la vegada, mantindrien l'estatus proinflamatori necessari per tal que els limfòcits restessin activats (Barnes i Cosío, 2006).

9.5.1 Els limfòcits T

Els limfòcits T són cèl·lules que desenvolupen un paper essencial en tots els mecanismes de defensa immunitària. Poden participar tant en la destrucció directa d'antígens (gràcies a la seva capacitat citotòxica) com en l'activació/regulació d'altres cèl·lules inflamatòries (Janeway i Travers, 2001).

Respecte l'MPOC, s'han realitzat diversos estudis amb l'objectiu de quantificar el nombre total de limfòcits T ($CD3^+$) en via aèria d'individus afectats per la malaltia. Els resultats majoritaris són aquells en què no s'observen diferències significatives en el nombre de limfòcits T $CD3^+$ en parets bronquials (Di Stefano i cols, 1998; Lams i cols, 2000; Rutgers i cols, 2000; Willemse i cols, 2005; Snoeck-Stroband i cols, 2008) i bronquiolars (Grashoff i cols, 1997; Lams i cols, 1998) de malalts d'MPOC respecte d'individus que no presenten la malaltia. Aquests resultats es contradiuen amb altres que detecten un increment (Di Stefano i cols, 1996; O'Shaughnessy i cols, 1997; Panzner i cols 2003; Willemse i cols, 2005) o decrement (Di Stefano i cols, 2001) dels limfòcits T $CD3^+$ en vies aèries d'individus amb MPOC.

Molt menys estudiada ha estat la distribució d'aquestes cèl·lules en el parènquima pulmonar, i de fet, només existeixen dos treballs previs que hagin estimat la densitat de limfòcits T $CD3^+$ en les parets alveolars en MPOC (Finkelstein i cols, 1995; Majó i cols, 2001). Tots dos coincideixen a trobar un major nombre de cèl·lules $CD3^+$ en individus malalts (Finkelstein i cols, 1995; Majó i cols, 2001). Majó i cols (2001), a més, van trobar una correlació entre la

quantitat de paquets-any que s'ha fumats i la quantitat de limfòcits T CD3⁺ presents en les parets alveolars.

Si bé la quantitat total de limfòcits T és una dada important per concebre un esquema general de l'activitat inflamatòria en un teixit, s'han fet diversos treballs que analitzen la possible relació entre les principals subpoblacions de limfòcits T i l'MPOC.

9.5.1.1 Els limfòcits T citotòxics (limfòcits T CD8⁺)

Els limfòcits T CD8⁺ són una de les principals defenses de l'organisme davant virus, bacteris intracel·lulars i processos cancerosos, mercès a la seva acció citolítica sobre les cèl·lules infectades o malignes. Malgrat que aquestes cèl·lules es troben àmpliament distribuïdes en pulmons d'individus sans (Semenzato i cols, 1996), diversos autors han trobat una correlació significativa entre el nombre de limfòcits T CD8⁺ en parènquima pulmonar i bronquis i la quantitat de paquets-any consumits (Lams i cols, 2000; Majó i cols, 2001), la qual cosa indica que el fum del tabac és un estímul per a la infiltració d'aquestes cèl·lules al teixit pulmonar.

El paper que juguen els limfòcits T citotòxics en l'MPOC es desconeix, malgrat la seva capacitat de danyar el teixit pulmonar. Així, les cèl·lules CD8⁺ tenen la capacitat de causar citòlisi i apoptosi de les cèl·lules epitelials alveolars per mitjà de l'alliberament de perforines, de granzim-B i de TNF- α (Hashimoto i cols, 2000; Chrysofakis i cols, 2004). A més, s'ha descrit una associació entre els limfòcits T CD8⁺ i l'apoptosi de cèl·lules alveolars en l'emfisema (Majó i cols, 2001). Paral·lelament, les cèl·lules apoptòtiques constitueixen una font d'antígens susceptibles de ser captats per les cèl·lules dendrítiques, les quals perpetuarien la resposta limfocitària. Finalment, els limfòcits T citotòxics també poden produir una varietat de citocines del tipus 1, entre les que s'inclouen el TNF- α , la limfotoxina (o TNF- β) i l'interferó (INF)- γ (Barnes i Cosío, 2006). Totes aquestes citocines podrien afavorir la resposta inflamatòria en el pulmó.

Tanmateix, s'ha especulat força sobre la contribució dels limfòcits T CD8⁺ en la limitació del flux aeri, característica bàsica de la malaltia, i que es dona majorment en els bronquióls. La idea general apunta que els limfòcits T CD8⁺ i els seus mediadors proinflamatoris poden afavorir el procés de fibrosi i engruiximent de la capa de musculatura llisa que s'observa en vies aèries

d'individus afectats d'MPOC (O'Shaughnessy i cols, 1997; Saetta i cols, 1997; Baraldo i cols, 2004; Hogg i cols, 2004), tot provocant-hi un augment de la resistència al flux d'aire.

Quant a la densitat d'aquestes cèl·lules en teixit pulmonar de malalts d'MPOC, en alguns estudis s'ha observat un increment en el nombre de limfòcits T CD8⁺ tant en bronquis (O'Shaughnessy i cols, 1997; Lams i cols, 2000; Turato i cols, 2002) com en bronquíols (Lams i cols, 1998; Saetta i cols, 1998; Baraldo i cols, 2004; Hogg i cols, 2004) i paret alveolar (Saetta i cols, 1998; Majó i cols, 2001; Retamales i cols, 2001) d'individus malalts comparats amb individus sense l'MPOC. Alguns autors, a més, han observat una correlació significativa entre l'augment de limfòcits CD8⁺ i la disminució del FEV₁ (O'Shaughnessy i cols, 1997; Saetta i cols, 1998; Lams i cols, 2000; Di Stefano i cols, 2001; Hogg i cols, 2004). Aquestes troballes fan que, actualment, els limfòcits T citotòxics siguin considerats com un dels tipus cel·lulars més rellevants en la patogènesi de l'MPOC.

9.5.1.2 Els limfòcits T col·laboradors (limfòcits T CD4⁺)

Els limfòcits T CD4⁺ són cèl·lules essencials en la regulació de l'activitat d'altres cèl·lules immunitàries. Gràcies a la seva capacitat de secretar un ampli ventall de citocines (com l'IFN- γ o l'IL-9, entre moltes altres) els limfòcits T CD4⁺ modulen el reclutament, l'activació o la proliferació de cèl·lules immunocompetents com són els limfòcits B, els limfòcits T CD8⁺ o els macròfags (Janeway i Travers, 2001; Baraldo i cols, 2007).

Es desconeix el paper que podrien jugar els limfòcits T CD4⁺ en l'MPOC, malgrat que està clar que la funció d'aquestes cèl·lules és necessària per a l'activació de la resposta citotòxica dels limfòcits T CD8⁺, així com per mantenir-ne la memòria i supervivència. Així, s'especula que un cop els limfòcits T (CD4⁺ i CD8⁺) són activats i atrets cap als pulmons, estimularien una migració leucocitària molt més important (que esdevindria una reacció inflamatòria) mitjançant la producció de TNF- α , quimiocines, lligands per molècules d'adhesió leucocitàries, vasodilatadors (VEGF, prostaciclina) i factors de coagulació que facilitarien l'arribada dels leucòcits al lloc de lesió (Barnes i Cosío, 2006).

A diferència del que s'observa en els limfòcits T citotòxics, no s'ha detectat un increment significatiu en el nombre de limfòcits T CD4⁺ en les vies aèries de malalts d'MPOC quan se'ls compara amb individus sans (Saetta i cols, 1997, 1998, 1999; Di Stefano i cols, 1998, 2001;

Lams i cols, 1998, 2000; Rutgers i cols, 2000; Baraldo i cols, 2004; Hogg i cols, 2004; Willemse i cols, 2005; Gamble i cols, 2007; Snoeck-Strombland i cols, 2008) i de fet, el quocient limfòcits T CD4⁺/limfòcits T CD8⁺ es troba disminuït en l'MPOC (Barnes i Cosío, 2006).

Pel que fa a la densitat de limfòcits T CD4⁺ en paret alveolar, les dades disponibles són escasses. Retamales i cols (2001) van detectar un augment d'aquestes cèl·lules en parets alveolars de fumadors amb emfisema greu, en comparar-los amb individus fumadors que presentaven emfisema lleu o manca d'emfisema. Aoshiba i cols (2004) van observar que el nombre de limfòcits T CD4⁺ era més elevat en les zones amb lesions emfisematoses més greus, mentre que els CD8⁺ predominaven en zones amb un grau d'emfisema moderat. A més, Majó i cols (2001) van trobar una correlació significativa entre la quantitat de limfòcits T CD4⁺ i els paquets-any consumits.

9.5.2 Els limfòcits B

Els limfòcits B són cèl·lules que es caracteritzen per la seva capacitat de produir immunoglobulines (Ig's), molècules capaces d'unir-se a antígens específics. Aquestes Ig's poden trobar-se circulant a la sang, en teixits extravasculars o bé actuant com a receptors d'antígens a la mateixa membrana dels limfòcits B. D'aquesta manera, quan un antigen és reconegut per una Ig que es troba a la membrana del limfòcit, la cèl·lula s'activarà i generarà un clon de limfòcits B capaços de sintetitzar anticossos amb la mateixa especificitat antigènica. Addicionalment, per tal d'assolir aquesta activació, és també necessària l'acció mediadora d'un limfòcit T CD4 específic del mateix antigen (Janeway i Travers, 2001).

Els limfòcits B constitueixen la subpoblació limfocitària menys estudiada en l'MPOC, i els resultats que hi ha al respecte són contradictoris. Alguns autors afirmen que no hi ha diferències significatives en la quantitat de limfòcits B que s'infiltra en les vies aèries de malalts d'MPOC respecte de fumadors control (O'Shaughnessy i cols, 1997; Willemse i cols, 2005). Altres estudis sostenen, d'una banda, que la infiltració de limfòcits B és més important en vies d'individus afectats per la malaltia, i de l'altra, que aquesta infiltració es fa més important a mesura que l'MPOC progressa (Bosken i cols, 1992; Hogg i cols, 2004; Gosman i cols, 2006). Alguns d'aquests autors, a més, han observat que l'increment d'aquestes cèl·lules es correlaciona significativament amb una davallada del FEV₁. Pel que fa al compartiment del

parènquima pulmonar, els pocs estudis que s'hi han realitzat coincideixen en afirmar que no existeixen diferències significatives en la càrrega de limfòcits B infiltrats en parets alveolars d'individus amb i sense MPOC (Finkelstein i cols, 1995; Retamales i cols, 2001).

Tot i que no es coneix el paper que podrien jugar els limfòcits B en la patogènesi de l'MPOC, s'ha especulat que una acumulació d'aquestes cèl·lules podria ser el resultat d'una reacció contra algun antígen específic, el qual podria provenir de patògens de l'aparell respiratori (Hogg i cols, 2004) o fins i tot d'algun component del fum del tabac (Gosman i cols, 2006). En aquest últim cas, la importància de la resposta inflamatòria estaria sotmesa a la predisposició genètica que tindrien alguns fumadors a reaccionar davant d'aquests components antigènics del tabac (Gosman i cols, 2006). En relació a aquesta hipòtesi, s'ha desenvolupat el que es coneix com "la hipòtesi autoimmunitària", la qual postula que un dels mecanismes implicats en la patogènesi de l'MPOC és una reacció immunitària contra algun o alguns constituents del teixit pulmonar (per exemple, molècules de la matriu extracel·lular) que s'han vist modificats a conseqüència de l'exposició prolongada al fum del tabac (Agustí i cols, 2003). Aquestes estructures alterades, podrien actuar com autoantígens i perpetuar un estat inflamatori crònic en què es veurien implicats els diferents tipus de limfòcits.

10. LA INFLAMACIÓ CRÒNICA EN L'MPOC: ELS ÒRGANS LIMFOIDES TERCIARIS

Els òrgans limfoides terciaris (OL3), també anomenats fol·licles limfoides o teixit limfoide terciari, són acumulacions ectòpiques de cèl·lules immunològiques que apareixen en condicions d'inflamació crònica, gràcies a un procés que es coneix com a neogènesi limfoide (Kratz i cols, 1996). Aquestes estructures han estat descrites en malalties autoimmunitàries (com l'artritis reumatoide, la malaltia de Crohn, la tiroïditis de Hashimoto, la síndrome de Sjögren i l'esclerosi múltiple), en infeccions microbianes múltiples (*Helicobacter pylori*, l'hepatitis C o la malaltia de Lyme) o en el rebuig post-trasplantament (Pabst, 2007; Brusselle i cols, 2009).

A diferència dels òrgans limfoides secundaris, que són programats genèticament i s'ubiquen en llocs específics, els OL3 no tenen càpsula fibrosa, apareixen en individus adults de manera atzarosa i no es localitzen en àrees subepitelials, com és el cas del teixit limfoide associat a mucoses (MALT) (Drayton i cols, 2006; Carragher i cols, 2008). Malgrat que la majoria de

senyals moleculars i cel·lulars que regeixen el desenvolupament dels òrgans limfoides secundaris han estat identificats en el desenvolupament dels OL3, encara no es coneix de quina manera es dirigeix el seu procés de formació (Nasr i cols, 2007).

10.1 Els òrgans limfoides terciaris en l'MPOC

Donada la seva exposició a l'ambient extern, els pulmons són una important porta d'entrada d'antígens i és per això que l'arquitectura pulmonar inclou una gran xarxa de vasos limfàtics associats a estructures limfoides, com els ganglis limfàtics o el teixit limfoide associat als bronquis (BALT) (Wardlaw i cols, 2005). A diferència d'aquests tipus de teixits limfoides que es poden trobar de manera habitual als pulmons, la formació d'OL3 s'ha relacionat amb processos infecciosos i inflamatoris de caràcter crònic, com la fibrosi pulmonar idiopàtica, la granulomatosi de Wegener i l'MPOC (Marchal-Sommé i cols, 2006; Carragher i cols, 2008).

Malgrat que només s'han realitzat cinc estudis que analitzin el desenvolupament d'aquest teixit ectòpic en l'MPOC, els resultats obtinguts apunten a una correlació entre la presència d'aquestes estructures i la gravetat de la malaltia (Bosken i cols, 1992; Hogg i cols, 2004; van der Strate i cols, 2006; Kelsen i cols, 2009; Plumb i cols, 2009).

Pel que fa a la composició cel·lular, s'ha descrit que els OL3 associats a l'MPOC estan compostos de limfòcits T $CD4^+$ i $CD8^+$, així com de limfòcits B, de cèl·lules dendrítiques fol·liculars (FDC) i de macròfags (Bosken i cols, 1992; Hogg i cols, 2004; van der Strate i cols, 2006; Kelsen i cols, 2009; Plumb i cols, 2009). Els OL3 madurs, a més, contenen vècules d'endoteli alt (HEV) que expressen quimiocines i molècules d'adhesió encarregades del reclutament de limfòcits i de cèl·lules dendrítiques (Brusselle i cols, 2009).

Els limfòcits B constitueixen el tipus cel·lular majoritari i s'ubiquen fonamentalment al centre de l'OL3. Les cèl·lules dendrítiques s'intercalen entre els limfòcits B per tal de facilitar la presentació d'antígens, mentre que els limfòcits T $CD4^+$ i $CD8^+$ es situen a la perifèria (van der Strate i cols, 2006) (Figura 9). Aquesta composició i estructura dels OL3 coincideix en humans i en models murins, en el quals, a més, s'ha determinat mitjançant anàlisis semiquantitatives que tant el nombre de cèl·lules com el diàmetre dels OL3 incrementen davant d'una exposició prolongada al fum del tabac (van der Strate i cols, 2006).

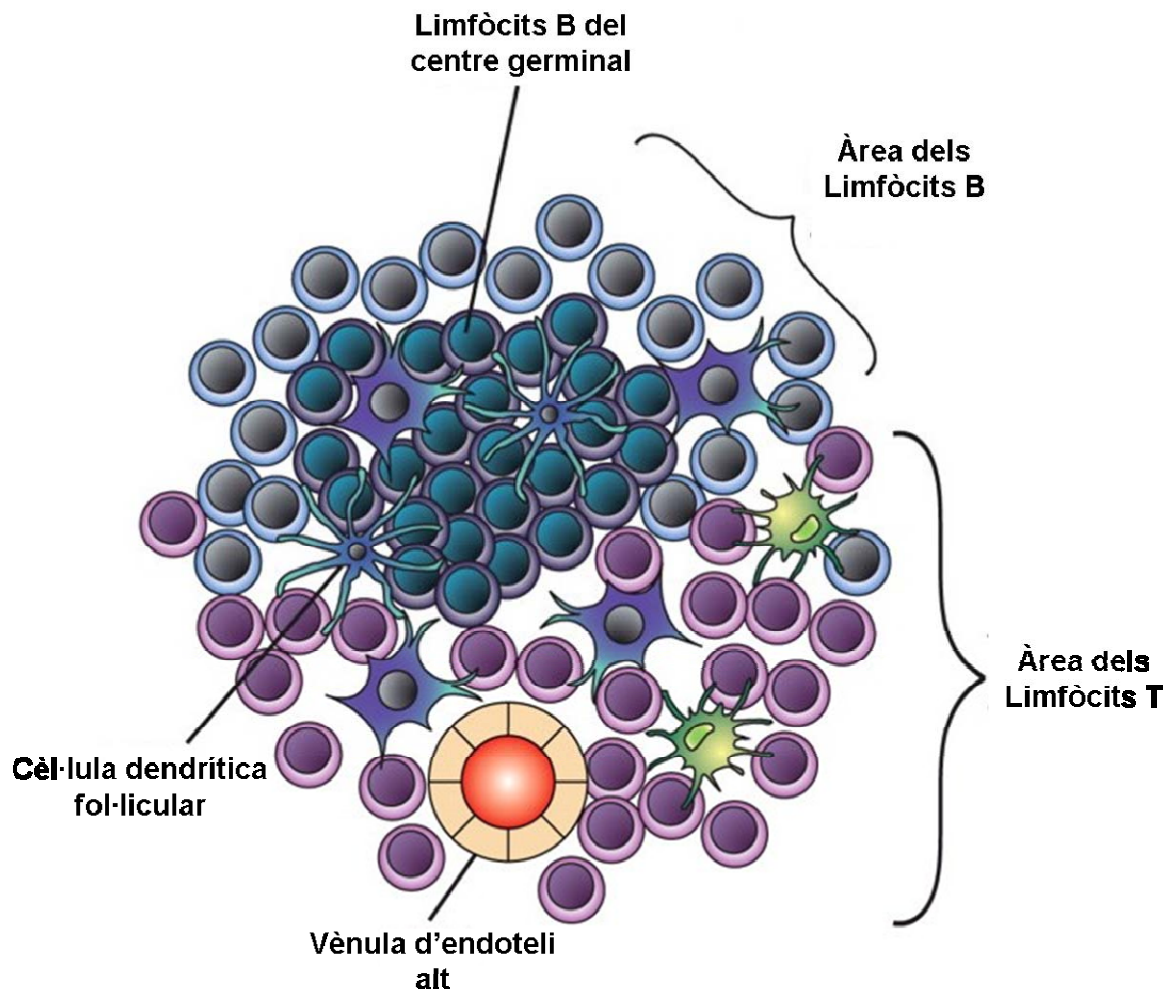


Figura 9. Estructura i composició cel·lular dels OL3
(adaptat de Brusselle i cols, 2010)

D'altra banda, estudis recents han demostrat que els pacients amb MPOC moderada presenten una major densitat de limfòcits T CD4 als OL3 (Plumb i cols, 2009), i que el nombre de limfòcits que expressen el receptor per a quimiocines CXCR3 està incrementat en els OL3 d'individus amb la malaltia (Kelsen i cols, 2009). Aquest fet suggereix un paper clau per a aquest receptor en el reclutament de limfòcits cap als OL3 de malalts d'MPOC (Kelsen i cols, 2009).

En referència a la distribució dels OL3 en el teixit pulmonar, se'ls ha descrit tant en vies aèries com en parènquima pulmonar (Bosken i cols, 1992; Hogg i cols, 2004; van der Strate i cols, 2006; Kelsen i cols, 2009; Plumb i cols, 2009). A més, s'ha determinat que el 80% dels OL3 es

localitzen al parènquima pulmonar, mentre que tan sols un 20% es troben a vies aèries (van der Strate i cols, 2006).

Els diferents estudis que s'han dut a terme amb l'objectiu de determinar la funció d'aquestes estructures suggereixen que els OL3 participen en la resposta immunitària adquirida (Brusselle i cols, 2009). Així, tant l'expressió del marcador de proliferació Ki-67, com de la molècula coestimuladora CD40L o de la IgM a la superfície dels limfòcits B, revelen la presència de centres germinatius funcionals associats a aquestes estructures (van der Strate i cols, 2006). Tanmateix, la immunolocalització de limfòcits B de memòria i la de cèl·lules plasmàtiques van confirmar l'activació i expansió clonal d'aquestes cèl·lules (van der Strate i cols, 2006). Tot i que no es coneix quin podria ser l'antigen o antígens que engegarien aquest tipus de resposta, s'han proposat tres possibles fonts antigèniques: microorganismes, components del fum del tabac o dels seus derivats i productes de la degradació de la matriu extracel·lular (Hogg i cols, 2004; van der Strate i cols, 2006; Brusselle i cols, 2009).

Objectius

Les hipòtesis actuals sobre els mecanismes patogènics de l'MPOC consideren l'existència d'un component inflamatori (Shapiro i Ingenito, 2005), tot i que es desconeix la manera en què els principals efectors cel·lulars implicats contribueixen als canvis en l'estructura pulmonar característics d'aquesta malaltia. A més, la majoria d'estudis s'han centrat en la resposta que es produeix en els bronquis, mentre que el que succeeix en els bronquíols i en el parènquima pulmonar, els dos compartiments afectats principalment per l'MPOC, ha estat molt menys estudiat (Di Stefano i cols, 2004).

D'altra banda, existeixen algunes evidències que no afavoreixen la resposta inflamatòria com a un mecanisme rellevant en el desenvolupament de l'MPOC. Així, per exemple, una hipòtesi basada en la inflamació no podria explicar completament per què els pacients d'MPOC presenten resistència als tractaments amb corticosteroides (Beeh i Glaab, 2009). Donades aquestes discrepàncies, i tot considerant l'escassetat de dades disponibles sobre l'associació de determinats tipus cel·lulars inflamatoris amb l'MPOC, l'**OBJECTIU GENERAL** d'aquest estudi ha estat **caracteritzar les diferents poblacions d'efectors cel·lulars de la inflamació aguda i de la crònica implicats en la histopatologia de l'MPOC**, mitjançant tècniques immunohistoquímiques en microscòpia òptica.

Alguns estudis previs (Cosío i Guerassimov, 1999; Baraldo i cols, 2007) suggerien que els limfòcits podrien jugar un paper important en la resposta inflamatòria que es desenvolupa tant en les vies aèries com en el parènquima pulmonar dels malalts d'MPOC. No obstant això, mentre que l'alteració tissular més rellevant en els bronquíols d'aquests malalts és la fibrosi, la lesió histopatològica predominant en el parènquima és la destrucció emfisematosa (Hogg, 2008). Davant d'aquest fet, el nostre **PRIMER OBJECTIU** va ser **determinar si existeixen diferències en les poblacions limfocitàries o en les seves densitats entre els bronquíols i l'interstici parenquimàtic dels malalts d'MPOC** que permetin explicar l'efecte d'aquestes cèl·lules en les alteracions tissulars característiques de la malaltia (*Capítol I: "Differential lymphocyte infiltration in small airways and lung parenchyma in COPD patients"*). A més, tenint en compte la possible implicació dels limfòcits T CD8⁺ en la formació de l'emfisema mercès a la seva capacitat citolítica (Majó i cols, 2001) i la correlació que s'ha descrit entre la densitat parenquimàtica de limfòcits B i el grau d'emfisema (Retamales i cols, 2001), el **SEGON OBJECTIU** va ser **analitzar l'associació topogràfica dels limfòcits T CD8⁺ i dels limfòcits B amb les lesions emfisematoses** (*Capítol I: "Differential lymphocyte infiltration in small airways and lung parenchyma in COPD patients"*).

Un cop caracteritzada la infiltració limfocitària en els compartiments pulmonars afectats en l'MPOC, el nostre estudi es va dirigir cap a d'altres tipus cel·lulars amb un paper clau en la resposta inflamatòria, ja fos pel seu paper com a detectors (mastòcits i macròfags) o com a efectors (macròfags i cèl·lules CD57⁺) de la inflamació als OL3, estructures característiques dels processos inflamatoris crònics (Drayton i cols, 2006). Tot i que s'ha descrit una correlació entre l'aparició d'OL3 pulmonars i la progressió de l'MPOC (Brusselle i cols, 2009), no hi ha dades sobre les densitats dels principals efectors cel·lulars inflamatoris en aquestes estructures, ni tampoc sobre la vascularització i l'expressió d'adrecines en OL3 pulmonars de malalts d'MPOC. Per aquesta raó, el nostre **TERCER OBJECTIU** va ser **caracteritzar els OL3 pulmonars en l'MPOC, mitjançant l'estudi de la seva organització cel·lular i vascular** (*Capítol II: "Significant increase of CD57⁺ cells in pulmonary lymphoid follicles of COPD patients"*).

Resultats

Capítol I

Differential lymphocyte infiltration in small airways and lung parenchyma in COPD patients

Jordi Olloquequi^a, Jaume Ferrer^b, Juan F. Montes^a, Esther Rodríguez^b, M. Angeles Montero^c, José García-Valero^a

^aDepartament de Biologia Cel·lular, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Avda. Diagonal, 645, 08028 Barcelona, Spain

^bServei de Pneumologia, Hospital General Universitari Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Passeig de la Vall d'Hebron, 119-129, 08035 Barcelona, Spain

^cCIBER de Enfermedades Respiratorias (CIBERES), Recinte Hospital Joan March, Carretera Sóller Km 12, 07110 Bunyola, Spain

^dDepartament d'Anatomia Patològica, Hospital General Universitari Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Passeig de la Vall d'Hebron, 119-129, 08035 Barcelona, Spain

Publicat a *Respiratory Medicine* 2010; 104:1310-1318

RESUM

Els principals trets anatomopatològics de l'MPOC són l'engruiximent de la paret i el remodelatge tissular dels bronquíols i la destrucció emfisematosa del parènquima pulmonar. Malgrat que aquestes lesions histològiques són diferents, les cèl·lules inflamatòries implicades en ambdós processos són les mateixes. Davant d'aquest fet, l'objectiu que planteja el nostre estudi és determinar si aquests dos fenotips histopatològics estan relacionats amb dos perfils limfocitaris diferents.

Per tal d'assolir aquest objectiu, es va estimar la distribució i la densitat cel·lular dels limfòcits T CD3⁺, dels CD4⁺ i dels CD8⁺, així com dels limfòcits B, als bronquíols i al parènquima pulmonar de 59 individus amb i sense l'MPOC, mitjançant tècniques immunohistoquímiques en microscòpia òptica. Concretament, la població mostral va constar de 9 individus no fumadors, de 18 fumadors sense l'MPOC, de 16 fumadors amb MPOC moderada i de 16 pacients sotmesos a doble trasplantament pulmonar per MPOC molt greu. Paral·lelament, també es va analitzar la distribució espacial dels limfòcits al parènquima periemfisematós.

Els resultats obtinguts demostren que els individus amb MPOC molt greu tenen una densitat de limfòcits T CD3⁺ i de limfòcits B significativament major als bronquíols en comparació amb el parènquima pulmonar. A més, els malalts d'MPOC presenten una densitat de limfòcits T CD8⁺ a l'epiteli bronquiolar significativament incrementada en comparació amb els individus no fumadors. Finalment, malgrat que la densitat parenquimàtica de limfòcits T CD8⁺ també es troba incrementada en els malalts d'MPOC, les densitats tant de limfòcits T CD8⁺ com de limfòcits B són similars en comparar el parènquima periemfisematós amb aquelles zones de parènquima no afectades per l'emfisema.

D'aquesta manera, els resultats d'aquest estudi corroboren l'existència d'un patró inflamatori bronquiolar en l'MPOC, que es caracteritza per la presència d'infiltracions mononuclears i de remodelatge tissular. No obstant això, el teixit parenquimàtic mostra una infiltració de limfòcits T CD8⁺ més lleu, la qual, a més, no es relaciona espacialment amb les zones de destrucció emfisematosa.

Capítol II

Significant increase of CD57⁺ cells in pulmonary lymphoid follicles of COPD patients

Jordi Olloquequi¹, Juan F. Montes¹, Ana Prats¹, Esther Rodríguez², M. Angeles Montero³, José García-Valero¹, Jaume Ferrer²

¹Departament de Biologia Cel·lular, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

²Servei de Pneumologia, Hospital General Universitari Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain; CIBER Enfermedades Respiratorias, Instituto de Salud Carlos III, Spain

³Departament d'Anatomia Patològica, Hospital General Universitari Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

Published online in *European Respiratory Journal* (June/4/2010)

doi:10.1183/09031936.00201509.

RESUM

Malgrat que la progressió de l'MPOC s'ha associat amb la presència de fol·licles limfoides pulmonars, no hi ha dades disponibles sobre la densitat de les cèl·lules inflamatòries que formen aquestes estructures en l'àmbit de la malaltia. A banda d'això, també es desconeixen tant el patró de vascularització com l'expressió d'adrecines dels fol·licles limfoides pulmonars en l'MPOC.

En el present estudi, es va analitzar la prevalença, l'estructura, la localització, la vascularització i la proliferació/apoptosi cel·lulars dels fol·licles limfoides pulmonars en l'MPOC. Paral·lelament, també es van estimar les densitats fol·liculars dels limfòcits B i T, així com dels macròfags, de les cèl·lules dendrítiques i de les cèl·lules CD57⁺ en teixit pulmonar de 9 pacients no fumadors, de 18 fumadors sense l'MPOC, de 16 fumadors amb MPOC moderada i de 16 pacients amb MPOC molt greu.

Els nostres resultats mostren una densitat fol·licular de cèl·lules CD57⁺ significativament major en els pacients d'MPOC quan se'ls compara amb els individus no fumadors i amb els fumadors sense l'MPOC ($p < 0,05$). A més, el percentatge de perfils fol·liculars que presenten apoptosi també és significativament major en els malalts d'MPOC ($p = 0,03$). D'altra banda, no s'observen diferències significatives entre grups quant a les densitats fol·liculars de la resta de cèl·lules inflamatòries, ni tampoc quant a la distribució de vasos sanguinis o limfàtics en aquestes estructures.

Donat que les cèl·lules CD57⁺ són uns efectors importants de la resposta citotòxica i de la regulació immunitària, l'increment de la densitat fol·licular d'aquestes cèl·lules dóna suport a la hipòtesi que postula l'existència d'una disfunció immunitària local en l'MPOC.

Discussió

1. ELS PARÀMETRES CLÍNICS PERMETEN DISCRIMINAR ELS GRUPS ESTUDIATS

L'anàlisi estadística de les dades clíniques i histopatològiques recolzen la distribució inicial dels pacients seguint els criteris de la GOLD (2007). Per un costat, tant el FEV₁ com el quocient FEV₁/FVC han diferenciat els pacients amb i sense l'MPOC, mentre que les diferències existents entre els malalts amb MPOC moderada i els malalts amb MPOC molt greu han estat corroborades per d'altres indicadors de gravetat, com el RV, la TLC i el GEM. El fet de no trobar diferències significatives en la quantitat de paquets-any consumits entre els fumadors amb i sense l'MPOC, és indicatiu que les diferències trobades en els patrons inflamatoris entre aquests grups no depenen tant de la quantitat de tabac que s'ha fumat sinó de la predisposició individual i del propi desenvolupament de la malaltia.

2. LA RESPOSTA INFLAMATÒRIA BRONQUIOLAR EN L'MPOC

La resposta inflamatòria que es dona a les vies aèries centrals en l'MPOC ha estat ben caracteritzada gràcies a estudis fets tant sobre mostres de teixit procedent de biòpsies bronquials com a partir de la rentada bronquialveolar o l'esput d'individus afectats per la malaltia (Tsoumakidou i cols, 2003; Di Stefano i cols, 2004). Ara bé, tenint en compte que són els bronquíols els que més contribueixen en l'obstrucció del flux aeri en l'MPOC (Hogg, 2004), les mostres procedents de biòpsies bronquials o de secrecions de l'arbre respiratori superior no són del tot apropiades per valorar el procés inflamatori que es dona als llocs principals d'obstrucció del flux. Així, per exemple, el paper que poden tenir les cèl·lules observades en mostres d'esput no es pot comparar amb el que tindrien aquestes cèl·lules quan es troben infiltrades en els compartiments tissulars implicats en la malaltia (Martin i cols, 1985). A més, les biòpsies bronquials no permeten analitzar les respostes que es donen en les parets alveolars. És per això, que els estudis duts a terme sobre teixit pulmonar procedent de reseccions quirúrgiques semblen més apropiats, malgrat que són més escassos a causa de la dificultat que comporta aconseguir aquest tipus de mostres. En aquest sentit, les nostres mostres ens ofereixen una bona oportunitat per estudiar el perfil inflamatori que es dona en els diferents compartiments afectats en l'MPOC.

Malgrat que alguns estudis han estimat les densitats de cèl·lules inflamatòries al compartiment epitelial o muscular de les vies aèries centrals (Fournier i cols, 1989; Saetta i cols, 1993, 1997, 2000; Pilette i cols, 2001; Turato i cols, 2002; Baraldo i cols, 2004; Ekberg-Jansson i cols, 2005) i perifèriques (Grasshoff i cols, 1997) en l'MPOC, la majoria de treballs publicats es refereixen al nombre de cèl·lules infiltrades en vies aèries a partir dels recomptes realitzats a la zona subepitelial o a la mucosa de bronquis i bronquíols. A diferència d'aquests treballs previs, el nostre estudi permet afegir dades sobre la quantitat de cèl·lules inflamatòries presents en cadascun dels diferents compartiments bronquiolars per separat, a banda de fer una estimació de les densitats cel·lulars per unitat de superfície de teixit bronquiolar total. Això ens ha permès no només estudiar les diferències en la densitat de cèl·lules inflamatòries entre els grups clínics, sinó també detectar si el focus inflamatori és més important en algun compartiment bronquiolar concret (Capítol I). Bosken i cols (1992) van fer una aproximació similar en el seu treball, però només van disposar de mostres procedents de pacients amb i sense obstrucció del flux aeri, tots ells fumadors. Per tant, no van poder valorar el grau d'infiltració de cèl·lules inflamatòries en la progressió de la malaltia, ni establir comparacions amb individus que no haguessin fumat mai.

Tanmateix, la majoria d'estudis realitzats sobre biòpsies bronquials s'han centrat en caracteritzar el procés inflamatori i les alteracions estructurals que es donen en estadis lleus i moderats de l'MPOC (Di Stefano, 2004), mentre que els estadis molt greus de la malaltia (estadi IV de la GOLD) han estat molt menys estudiats (Di Stefano i cols, 1998, 2001; Hogg i cols, 2004; Andersson i cols, 2010). Així, les nostres sèries aporten a la literatura dades sobre el grup format pels malalts molt greus d'MPOC (estadi IV de la GOLD) que han estat sotmesos a un doble trasplantament pulmonar. Això ens ha facilitat l'estudi del perfil inflamatori que es dona en les fases de màxima gravetat de la malaltia (Capítols I i II). Com a valor afegit, cal tenir en compte que cap dels nostres pacients havia estat tractat amb quimioteràpia ni amb corticosteroides orals, cosa que podria haver distorsionat la resposta inflamatòria característica de l'MPOC.

2.1 Els limfòcits T citotòxics i els limfòcits B constitueixen les principals subpoblacions limfocitàries implicades en la resposta inflamatòria que es desenvolupa en els bronquíols dels malalts d'MPOC

Pel que fa a les estimacions de la densitat limfocitària en les vies aèries perifèriques (Capítol I), els resultats mostren un augment de limfòcits T CD8⁺ i de limfòcits B en els bronquíols dels

malalts d'MPOC respecte als de pacients no afectats per la malaltia. D'altra banda, no s'han detectat diferències significatives entre els grups clínics quant a la densitat bronquiolar de limfòcits T CD3⁺ ni de CD4⁺. D'aquesta manera, les dades obtingudes amplien les d'estudis anteriors que suggereixen l'existència d'un paper important per als limfòcits T CD8⁺ i per als limfòcits B en la resposta inflamatòria bronquiolar dels malalts d'MPOC (Bosken i cols, 1992; Saetta i cols, 1998; Baraldo i cols, 2004; Hogg i cols, 2004).

Com s'observa en el cas dels limfòcits B, són els pacients en un estat molt greu de l'MPOC els qui presenten una major densitat d'aquestes cèl·lules infiltrades a les parets bronquiolars, mentre que els limfòcits T citotòxics es troben en major nombre als bronquíols dels malalts amb MPOC moderada, especialment en el compartiment epitelial (Capítol I). El fet que els pacients molt greus tinguin una menor proporció de limfòcits T CD8⁺ bronquiolars que els pacients de menor gravetat, fa extensiu als bronquíols allò que Di Stefano i cols (2001) van descriure en bronquis. Els autors atribuïen aquest fet a què els limfòcits dels pacients en estadis més greus de l'MPOC tenen disminuïda l'expressió del receptor per a les quimiocines CCR5, el qual està involucrat en processos de migració i activació limfocitàries. Així mateix, el fet que no s'observi el nombre més elevat de limfòcits T CD8⁺ en els pacients molt greus també s'explicaria tenint en compte que aquests individus fa anys que s'han vist obligats a abandonar l'hàbit de fumar, fet que s'ha associat amb una disminució del número de limfòcits T CD8⁺ en vies aèries (Laperre i cols, 2006). D'altra banda, l'alta proporció de pacients amb MPOC molt greu que han estat tractats amb corticosteroides inhalats (14/16) podria haver influït tot reduint la densitat bronquiolar dels limfòcits T CD8⁺ en aquest grup, donat que els esteroides disminueixen la quantitat de limfòcits T CD8⁺ en les vies aèries (Reid i cols, 2008).

2.2 El fum del tabac modifica el perfil limfocitari a l'epiteli bronquiolar, tot incrementant la població de limfòcits T CD8⁺

L'anàlisi de les densitats limfocitàries en els diferents compartiments bronquiolars dels grups clínics estudiats (Capítol I), ha revelat per primer cop que els malalts amb MPOC moderada tenen una densitat significativament més alta de limfòcits T CD8⁺ a l'epiteli que els individus no fumadors, tal i com s'havia descrit en bronquis de fumadors amb bronquitis crònica i limitació del flux aeri (Fournier i cols, 1989). El fet que aquest increment significatiu no hagi estat observat també en els malalts amb MPOC molt greu s'ha discutit en l'apartat anterior (2.1).

D'altra banda, els resultats mostren una relació $CD4^+/CD8^+ < 1$ en l'epiteli dels individus fumadors (amb l'MPOC o sense), i que difereix significativament d'aquella que s'observa en individus no fumadors. Aquesta inversió del quocient $CD4^+/CD8^+$ indica que en l'epiteli bronquiolar dels individus fumadors és predominant un patró inflamatori del tipus cel·lular, en comptes d'un patró més humoral. A més, el fet que la infiltració de limfòcits T $CD8^+$ a l'epiteli dels individus fumadors hagi mostrat una correlació significativa amb la xifra de paquets-any consumits, evidencia que el fum del tabac indueix la infiltració de limfòcits T citotòxics en el compartiment epitelial dels bronquíols, tal i com havia estat descrit en els bronquis (Lams i cols, 2000).

2.3 La infiltració bronquiolar de limfòcits B es correlaciona amb la gravetat de l'MPOC

L'estudi de les densitats bronquiolars dels limfòcits B ha mostrat que en l'estadi més greu de l'MPOC es dona un increment significatiu d'aquestes cèl·lules. A més, la densitat bronquiolar dels limfòcits B ha mostrat una correlació significativa amb la davallada del FEV_1 (Capítols I i II), paràmetre indicador de la gravetat de l'MPOC. Correlacions similars només havien estat descrites en estudis fets sobre biòpsies bronquials (O'Shaughnessy i cols, 1997; Gosman i cols, 2006), excepte en el treball de Hogg i cols (2004), on es documenta una correlació entre el volum acumulat total de limfòcits B als bronquíols i el FEV_1 .

S'ha descrit que la infiltració de cèl·lules proinflamatòries a les vies aèries està lligada necessàriament a processos de dany, de reparació i de remodelatge tissular, que poden engruixir-ne les parets i provocar-ne l'estrenyiment de la llum (Cosío i Guerassimov, 1999; Hogg i Pierce, 2008). En aquest sentit, els resultats que hem obtingut suggereixen que tant l'increment del nombre de limfòcits B, com la seva correlació inversa amb el FEV_1 , poden ser essencials pel desenvolupament i la progressió de la malaltia. La major infiltració d'aquestes cèl·lules podria explicar-se com una resposta davant d'infeccions pulmonars víriques o bacterianes, tret que és característic dels malalts amb l'MPOC greu o molt greu (Sethi i Murphy, 2009).

3. LA RESPOSTA INFLAMATÒRIA PARENQUIMÀTICA EN L'MPOC

Els resultats del nostre estudi (Capítol I) revelen que no existeixen diferències significatives en la densitat parenquimàtica de limfòcits T CD3⁺, de limfòcits T CD4⁺, ni de limfòcits B entre els quatre grups clínics. Així, de tots els efectors cel·lulars estudiats, només els limfòcits T CD8⁺ han mostrat un increment significatiu en la seva densitat parenquimàtica en malats d'MPOC (Capítol I).

3.1 La densitat parenquimàtica de limfòcits T CD8⁺ augmenta en malalts d'MPOC, però aquestes cèl·lules no es troben associades a l'emfisema

Els nostres resultats corroboren aquells d'estudis previs on es descrivia un augment significatiu de la densitat parenquimàtica de limfòcits T CD8⁺ en malalts d'MPOC (Saetta i cols, 1999; Majó i cols, 2001; Retamales i cols, 2001). A més, de la mateixa manera que s'havia observat en els bronquïols, hem detectat una correlació significativa entre la quantitat dels limfòcits T CD8⁺ al parènquima i els paquets-any consumits, coincidint amb els resultats de Majó i cols (2001). Malgrat això, no s'ha trobat cap correlació significativa entre la densitat d'aquestes cèl·lules i el grau d'emfisema macroscòpic (GEM), ni tampoc amb el decrement del FEV₁. Aquests resultats indiquen, d'una banda, que el fum del tabac indueix a la infiltració de limfòcits T CD8⁺ en les parets alveolars dels malalts d'MPOC, i de l'altra, que aquest fet no permet explicar la formació de l'emfisema ni té per què estar relacionat amb l'obstrucció del flux aeri en l'àmbit parenquimàtic.

Tanmateix, la comparació del grau d'infiltració limfocitària entre zones del parènquima properes a l'emfisema amb zones del parènquima no afectades ha aportat noves evidències que desvinculen els limfòcits T CD8⁺ de la formació de l'emfisema. Així, quan s'ha comparat la proporció tant de limfòcits T CD8⁺ com de limfòcits B en zones de parènquima periemfisematós amb les regions de parènquima normal en individus amb MPOC moderada i molt greu, no s'han observat diferències significatives. Aquest resultat sembla estar en discordança amb les correlacions que Retamales i cols (2001) van detectar entre les zones parenquimàtiques més afectades per l'emfisema, valorades amb Tomografia Computada (TC), i les quantitats de limfòcits T citotòxics i limfòcits B infiltrats. Nogensmenys, les valoracions obtingudes amb TC són difícils de comparar amb les que s'han realitzat en el nostre estudi, que han constituït una estimació directa del grau d'emfisema sobre el propi teixit.

Diversos autors han especulat sobre el possible paper dels limfòcits T CD8⁺ en l'emfisema (O'Donnell i cols, 2006) i una de les hipòtesis més acceptades és que els limfòcits T citotòxics podrien induir la formació de lesions emfisematoses tot causant la mort de cèl·lules productores de matriu extracel·lular (Majó i cols, 2001). No obstant això, si els limfòcits T CD8⁺ fossin responsables de la destrucció parenquimàtica que s'observa en l'MPOC, seria lògic trobar un increment d'aquestes cèl·lules en les zones periemfisematoses, cosa que no succeeix, com demostren els nostres resultats (Capítol I). Tenint en compte aquest fet, es podria hipotetitzar que l'increment dels limfòcits T citotòxics en parets alveolars de malats d'MPOC és més aviat una conseqüència que no una causa de la malaltia, i podria ser un reflex de la resposta davant les infeccions que pateixen freqüentment els pacients amb l'MPOC, especialment en els estadis avançats de la malaltia (Sethi i Murphy, 2009). En aquest sentit, Retamales i cols (2001) van trobar una associació entre l'increment dels limfòcits T CD8⁺ en parets alveolars de malalts greus d'MPOC i un augment del nombre de cèl·lules epitelials alveolars que expressaven la proteïna adenoviral E1A.

4. LA INFILTRACIÓ LIMFOCITÀRIA EN ELS MALALTS D'MPOC ÉS SUPERIOR EN ELS BRONQUÍOLS QUE EN EL PARÈNQUIMA PULMONAR

El nostre primer treball (Capítol I) ha establert una comparació entre la infiltració limfocitària que es dona en via aèria de petit diàmetre i la que té lloc en parènquima pulmonar en l'MPOC. Els resultats han mostrat que en els no fumadors, la infiltració superior de la via aèria respecte del parènquima només es compleix per als limfòcits T col·laboradors, mentre que en els fumadors sense l'MPOC, hi ha un increment també en el nombre de limfòcits T CD8⁺, probablement causat per l'hàbit de fumar, fenomen que és ben conegut i que ja fou descrit per Miller i cols (1982). D'altra banda, els malalts amb MPOC moderada presenten una densitat superior de limfòcits T totals (CD3⁺) infiltrats en via aèria quan es compara amb el parènquima. Aquesta proporció es manté en els malalts molt greus que a més, tenen també una densitat significativament major de limfòcits B en bronquíols que en parets alveolars.

Tenint en compte aquests resultats, podríem hipotetitzar que les diferències en les densitats limfocitàries entre els dos compartiments principalment afectats en l'MPOC podrien reflectir dos processos inflamatoris diferents i que conduirien a dos patrons histopatològics diferenciats en els bronquíols i en el parènquima. Així, en els bronquíols dels malalts d'MPOC es detecta

una major densitat tant de limfòcits T com de limfòcits B que podrien actuar perpetuant un estat inflamatori crònic. La inflamació en aquest compartiment portaria associats fenòmens de remodelatge i engruiximent de les parets de les vies aèries, que contribuirien a la gènesi de l'obstrucció del flux aeri característica de la malaltia, tal i com s'ha discutit prèviament (apartat 2). D'altra banda, el grau d'infiltració limfocitària que s'observa en el parènquima pulmonar és molt menor que aquell que s'ha detectat en bronquíols i podria entendre's no tant com a una causa sinó com a una conseqüència d'un procés inflamatori més lleu que prové de la destrucció emfisematosa del teixit parenquimàtic.

5. CARACTERITZACIÓ DELS OL3 EN L'MPOC

Malgrat que la presència d'OL3 en pulmons de malalts d'MPOC va ser descrita fa gairebé dues dècades (Bosken i cols, 1992), no va ser fins que Hogg i cols (2004) van relacionar aquestes estructures amb la progressió de la malaltia que es van començar a estudiar els patrons cel·lulars i moleculars dels OL3 en malalts d'MPOC (van der Strate i cols, 2006; Kelsen i cols, 2009; Plumb i cols, 2009). Tot i això, els pocs treballs disponibles sobre aquestes estructures deixen força incògnites quant a la prevalença, la vascularització, la composició cel·lular i la proliferació/apoptosi dels OL3 en l'MPOC. Davant d'això, els resultats de l'estudi integral dels OL3 dut a terme en el nostre treball (Capítol III) descarten que aquestes estructures siguin específiques de l'MPOC i han permès caracteritzar-les tant en mostres de malalts d'MPOC com d'individus no afectats per la malaltia (fumadors i no fumadors).

5.1 La distribució i la prevalença dels OL3 pulmonars és independent de l'MPOC

Un dels objectius principals del nostre estudi va ser analitzar la localització i la prevalença dels OL3 per tal de dilucidar si hi ha o no diferències entre malalts d'MPOC i pacients no afectats (Capítol III). Així, vàrem observar que aquestes estructures es trobaven tant en l'adventícia de vies aèries com al parènquima pulmonar de tots els grups clínics estudiats, tal i com s'havia descrit anteriorment (Bosken i cols, 1992; Elliot i cols, 2004; Hogg i cols, 2004; van der Strate i cols, 2006; Kelsen i cols, 2009; Plumb i cols, 2009). A més, també vam observar la presència d'OL3 en el teixit conjuntiu dels septes lobulars, així com a l'adventícia arteriolar, essent aquest darrer compartiment el més freqüentment ocupat per OL3 en malalts d'MPOC. Malgrat això, no es van trobar diferències significatives en la distribució dels OL3 entre els quatre grups

clínic (Capítol III). Aquests resultats suggereixen que els OL3 pulmonars s'organitzen i es distribueixen en qualsevol dels compartiments conjuntius del pulmó perifèric, amb independència de l'MPOC.

D'altra banda, el nostre estudi ha revelat una alta prevalença dels OL3 (del 83,3% al 100%) en els quatre grups clínics estudiats, sense diferències significatives entre ells (Capítol III). Aquests resultats, doncs, contrasten amb els d'altres estudis que descriuen una associació entre l'aparició d'OL3 i l'MPOC (Hogg i cols, 2004; Kelsen i cols, 2009).

5.2 Els OL3 dels malalts d'MPOC presenten una major densitat de cèl·lules CD57⁺ i una major taxa d'apoptosi

Alguns estudis previs (Bosken i cols, 1992; Hogg i cols, 2004; van der Strate i cols, 2006; Kelsen i cols, 2009; Plumb i cols, 2009) han descrit la composició i l'organització cel·lular dels OL3 dels malalts d'MPOC com a agregacions estructurades de limfòcits B envoltats d'un menor número de limfòcits T, i amb alguns macròfags i cèl·lules dendrítiques distribuïts de manera difusa. El nostre treball ha aportat dades quantitatives sobre diverses cèl·lules inflamatòries dels OL3 (com els macròfags, les principals subpoblacions de limfòcits, les cèl·lules dendrítiques madures o les cèl·lules CD57⁺) i ens ha permès comparar-les entre individus amb i sense l'MPOC. Plumb i cols (2009) van dur a terme una anàlisi similar, però centrada en una subpoblació específica de limfòcits T CD4⁺ (els limfòcits T reguladors), la qual van trobar incrementada en OL3 de malalts d'MPOC comparats amb individus sense la malaltia.

Els resultats del nostre treball revelen que els OL3 dels malalts d'MPOC presenten una densitat de cèl·lules CD57⁺ significativament més alta que els dels no fumadors i els dels fumadors sense la malaltia (Capítol III). Paral·lelament, també hem observat un increment significatiu del percentatge de perfils d'OL3 amb cèl·lules apoptòtiques en els malalts d'MPOC, fet que es podria explicar tenint en compte l'alt potencial citolític de les cèl·lules CD57⁺ (Vernooy i cols, 2007; Chattopadhyay i cols, 2009). A banda de la seva citotoxicitat, però, les cèl·lules CD57⁺ també podrien desenvolupar una tasca immunoreguladora dins dels OL3. Així, per exemple, Kim i cols (2005) van demostrar que una subpoblació de cèl·lules CD57⁺ presents als centres germinals dels teixits limfoides humans induïen la diferenciació i la producció d'Ig per part dels limfòcits B.

Tenint en compte que l'antigen CD57 ha esdevingut un bon marcador d'inflamació pulmonar (Palmer i cols, 2007), aquest increment de cèl·lules CD57⁺ en OL3 de malalts d'MPOC avala el caràcter infamatori de la malaltia. D'altra banda, s'ha suggerit (Brusselle i cols, 2009) que els OL3 dels malalts d'MPOC podrien aparèixer com a resposta davant d'una infecció crònica o, fins i tot, davant d'antígens o d'autoantígens derivats del fum del tabac o de la destrucció del teixit pulmonar. En aquest sentit, l'increment de cèl·lules CD57⁺ en els OL3 de malalts d'MPOC és notable, ja que l'antigen CD57 és expressat per moltes cèl·lules en processos crònics d'activació immunitària (Tarazona i cols, 2000) o fins i tot en condicions clíniques específiques com són les infeccions o les disfuncions immunitàries (Focosi i Petrini, 2007; Focosi i cols, 2010).

5.3 Els OL3 pulmonars presenten una vascularització sanguínia pròpia, però els manca un drenatge limfàtic equivalent

La immunolocalització de la molècula d'adhesió de plaquetes i de cèl·lules endotelials (PECAM) ha revelat que els OL3 de malalts i no malalts d'MPOC tenen un patró definit de vascularització, fet que indica que la irrigació sanguínia és un factor essencial en el desenvolupament d'aquestes estructures (Capítol III). La distribució dels vasos sanguinis tant a l'interior dels OL3 com al teixit conjuntiu circumdant, ens permet inferir que aquestes estructures indueixen un procés de neogènesi que condueix a l'organització d'una xarxa vascular pròpia. Resultats similars havien estat descrits prèviament en OL3 de fumadors (Richmond i cols, 1993), de pacients amb asma (Elliot i cols, 2004) i de pacients amb fibrosi pulmonar idiopàtica (Marchal-Sommé i cols, 2006).

D'altra banda, la immunolocalització de la podoplanina ha mostrat que el patró de vascularització limfàtica dels OL3 és fonamentalment perifèric (Capítol III). En estudis anteriors fets sobre mostres de pacients amb malalties autoimmunitàries també es va descriure la presència de vasos limfàtics envoltant el teixit limfoide terciari, però no es va aclarir la seva funció ni es va determinar si aquests vasos eren aferents o eferents (Drayton i cols, 2006; Pabst, 2007; Carragher i cols, 2008). Els nostres resultats tampoc no permeten discernir si els vasos observats són aferents o eferents, i tan sols la seva localització permet hipotetitzar que formen part del propi drenatge limfàtic del teixit conjuntiu on es desenvolupen els OL3 (Capítol III). Aquesta aparent falta de vascularització limfàtica pròpia podria estar relacionada amb l'absència d'una càpsula fibrosa, tret que és característic del teixit limfoide terciari i que podria

facilitar el contacte dels antígens locals amb les cèl·lules que constitueixen aquestes estructures (Carragher i cols, 2008).

5.4 Els OL3 dels malalts d'MPOC expressen l'adrecina de nòduls perifèrics (PNAd) però no l'adrecina d'adhesió cel·lular de mucoses (MAdCAM)- 1

Les adrecines PNAd i MAdCAM s'expressen en les HEVs dels ganglis limfàtics i de les plaques de Peyer, respectivament, i tenen un paper fonamental en el reclutament dels limfòcits circulants cap a aquestes estructures (Richmond i cols, 1993).

Els resultats del nostre tercer treball (Capítol III) han revelat que el 35% dels perfils d'OL3 observats presentaven un marcatge positiu per a PNAd. La presència d'aquestes sialomucines es va observar tant en la perifèria dels OL3 com en el seu interior, essent els malalts amb MPOC molt greu el grup que va presentar un major nombre d'OL3 amb una marca central. Quant a la morfologia vascular, els OL3 pulmonars observats presentaven tant HEVs com vasos amb un endoteli de fenotip aplanat. L'expressió de PNAd es va localitzar en ambdós tipus de vasos, tal i com s'havia descrit en un model d'ovella asmàtica (Rosen i cols, 2005). No obstant això, en cap de les mostres estudiades es va trobar un marcatge positiu per a MAdCAM-1, tot coincidint amb les troballes d'altres estudis que, mitjançant la mateixa estratègia experimental, van demostrar l'absència de MAdCAM-1 en el BALT (Xu i cols, 2003) i en el teixit limfoide associat a la mucosa nasal (NALT) de ratolins (Csencsits i cols, 1999). Així, els nostres resultats mostren que els OL3 del teixit pulmonar, ja sigui afectat o no per l'MPOC, no expressen MAdCAM-1, i que l'expressió específica de PNAd en aquestes estructures coincideix amb aquella que és característica del teixit limfoide terciari d'algunes malalties inflamatòries cròniques (Uchimura i cols, 2006; Suzawa i cols, 2007) (Capítol III).

Conclusions

Primera

Els limfòcits T CD8⁺ i els limfòcits B són alguns dels principals efectors cel·lulars de la resposta inflamatòria bronquiolar en l'MPOC.

Segona

Malgrat que el parènquima pulmonar dels malalts d'MPOC es caracteritza per un increment en la densitat de limfòcits T CD8⁺, les lesions emfisematoses no es correlacionen topogràficament amb una major infiltració de cèl·lules amb activitat citolítica.

Tercera

La presència de fol·licles limfoides pulmonars no és un tret específic de l'MPOC, però l'increment de la densitat fol·licular de cèl·lules CD57⁺ sí que és característic de la malaltia.

Bibliografia

- Abo T, Balch CM. A differentiation antigen of human NK and K cells identified by a monoclonal antibody (HNK-1). *J Immunol* 1981; 127:1024-1029.
- Agustí A, MacNee W, Donaldson K, Cosío M. Hypothesis: does COPD have an autoimmune component? *Thorax* 2003; 58:832-834.
- Agustí A, Soriano JB. COPD as a systemic disease. *COPD* 2008; 5:133-138.
- Ancochea J, Badiola C, Duran E, García Río F, Miravittles M, Muñoz L, Sobradillo V, Soriano JB. Estudio EPISCAN: resumen del protocolo de un estudio para estimar la prevalencia de EPOC en personas de 40 a 80 años de edad en España. *Arch Bronconeumol* 2009; 45:41-47.
- Andersson CK, Mori M, Bjermer L, Lofdahl CG, Erjefält JS. Novel sitespecific mast cell subpopulations in the human lung. *Thorax* 2009; 64:297-305.
- Andersson CK, Mori M, Bjermer L, Löfdahl CG, Erjefält JS. Alterations in lung mast cell populations in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2010; 181:206-217.
- Andoniou CE, Coudert JD, Degli-Esposti MA. Killers and beyond: NK-cell-mediated control of immune responses. *Eur J Immunol* 2008; 38:2938-2942.
- Anthonisen NR, Manfreda J, Warren CP, Hershfield ES, Harding GK, Nelson NA. Antibiotic therapy in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Ann Intern Med* 1987; 106:196-204.
- Aoshiba K, Koinuma M, Yokohori N, Nagai A. Differences in the distribution of CD4⁺ and CD8⁺ T cells in emphysematous lungs. *Respiration* 2004; 71:184-190.
- Aoshiba K, Yokohori N, Nagai A. Alveolar wall apoptosis causes lung destruction and emphysematous changes. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003; 28:552-562.

- Baraldo S, Lokar Oliani K, Turato G, Zuin R, Saetta M. The Role of Lymphocytes in the Pathogenesis of Asthma and COPD. *Curr Med Chem* 2007; 14:2250-2256.
- Baraldo S, Turato G, Badin C, Bazzan E, Beghé B, Zuin R, Calabrese F, Casoni G, Maestrelli P, Papi A, Fabbri LM, Saetta M. Neutrophilic infiltration within the airway smooth muscle in patients with COPD. *Thorax*, 2004; 59:308-312.
- Barberà JA, Cosío MG. Malalties obstructives de les vies aèries. En: Farreras P, Rozman C, editors. *Medicina interna, 1a Edició en català*. Madrid: Harcourt Brace de España SA; 1997. p. 734-751.
- Barberà JA, Peces-Barba G, Agustí AG, Izquierdo JL, Monsó E, Montemayor T, Viejo JL. Clinical guidelines for the diagnosis and treatment of chronic obstructive pulmonary disease. *Arch Bronconeumol* 2001; 37:297-316.
- Barnes PJ, Cosío MG. Cells and mediators of chronic obstructive pulmonary disease. En: Siafakas NM, editor. *Management of chronic obstructive pulmonary disease*. European Respiratory Monograph 38, Wakefield, UK. 2006; Volume 11, p. 130-158.
- Barnes PJ. Small airways in COPD. *N Engl J Med* 2004a; 350:2635-2637.
- Barnes PJ. Mediators of chronic obstructive pulmonary disease. *Pharmacol Rev* 2004b; 56: 515-546.
- Barnes PJ. Alveolar macrophages as orchestrators of COPD. *COPD* 2004c; 1:59-70.
- Barnes PJ. New concepts in chronic obstructive pulmonary disease. *Annu Rev Med* 2003; 54:113-129.
- Barton, GM. A calculated response: control of inflammation by the innate immune system. *J Clin Invest* 2008; 118:413-420.

- Bathoorn E, Kerstjens H, Postma D, Timens W, MacNee W. Airways inflammation and treatment during acute exacerbations of COPD. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 2008a; 3:217-229.
- Bathoorn E, Liesker JJ, Postma DS, Boorsma M, Bondesson E, Koëter GH, Kauffman HF, van Oosterhout AJ, Kerstjens HA. Anti-inflammatory effects of combined budesonide/formoterol in COPD exacerbations. *COPD* 2008b; 5:282-290.
- Beeh KM, Glaab T. Is there a role for antiinflammatory treatment in COPD? *COPD* 2009; 6:395-403.
- Boesiger J, Tsai M, Maurer M, Yamaguchi M, Brown LF, Claffey KP, Dvorak HF, Galli SJ. Mast cells can secrete vascular permeability factor/vascular endothelial cell growth factor and exhibit enhanced release after immunoglobulin E-dependent upregulation of fc epsilon receptor I expression. *J Exp Med* 1998; 188:1135-1145.
- Bosken CH, Hards J, Gatter K, Hogg JC. Characterization of the inflammatory reaction in the peripheral airways of cigarette smokers using immunocytochemistry. *Am Rev Respir Dis* 1992; 145:911-917.
- Brenchley JM, Karandikar NJ, Betts MR, Ambrozak DR, Hill BJ, Crotty LE, Casazza JP, Kuruppu J, Migueles SA, Connors M, Roederer M, Douek DC, Koup RA. Expression of CD57 defines replicative senescence and antigen-induced apoptotic death of CD8⁺ T cells. *Blood* 2003; 101:2711-2720.
- Brusselle GG, Demoor T, Bracke KR, Brandsma CA, Timens W. Lymphoid follicles in (very) severe COPD: beneficial or harmful? *Eur Respir J* 2009; 34:219-230.
- Burge S, Wedzicha JA. COPD exacerbations: definitions and classifications. *Eur Respir J* 2003; 41:46s-53s.

- Calverley P, Pauwels R, Vestbo J, Jones P, Pride N, Gulsvik A, Anderson J, Maden C; TRial of Inhaled STeroids ANd long-acting beta2 agonists study group. Combined salmeterol and fluticasone in the treatment of chronic obstructive pulmonary disease: a randomised controlled trial. *Lancet* 2003a; 361:449-456.
- Calverley PM, Boonsawat W, Cseke Z, Zhong N, Peterson S, Olsson H. Maintenance therapy with budesonide and formoterol in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2003b; 22:912-919.
- Calverley PM, Anderson JA, Celli B, Ferguson GT, Jenkins C, Jones PW, Yates JC, Vestbo J; TORCH investigators. Salmeterol and fluticasone propionate and survival in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2007; 356:775-789.
- Capelli A, Di Stefano A, Gnemmi I, Balbo P, Cerutti CG, Balbi B, Lusuardi M, Donner CF. Increased MCP-1 and MIP-1beta in bronchoalveolar lavage fluid of chronic bronchitics. *Eur Respir J* 1999; 14:160-165.
- Carragher DM, Rangel-Moreno J, Randall TD. Ectopic lymphoid tissues and local immunity. *Semin Immunol* 2008; 20:26-42.
- Carroll NG, Mutavdzic S, James AL. Distribution and degranulation of airway mast cells in normal and asthmatic subjects. *Eur Respir J* 2002; 19:879-885.
- Celli BR, Cote CG, Marin JM, Casanova C, Montes de Oca M, Mendez RA, Pino Plata V, Cabral HJ. The body-mass index, airflow obstruction, dyspnea, and exercise capacity index in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2004; 350:1005-1012.
- Chattopadhyay PK, Betts MR, Price DA, Gostick E, Horton H, Roederer M, De Rosa SC. The cytolytic enzymes granzyme A, granzyme B, and perforin: expression patterns, cell distribution, and their relationship to cell maturity and bright CD57 expression. *J Leukoc Biol* 2009; 85:88-97.

- Chrysofakis G, Tzanakis N, Kyriakoy D, Tsoumakidou M, Tsiligianni I, Klimathianaki M, Siafakas NM. Perforin expression and cytotoxic activity of sputum CD8⁺ lymphocytes in patients with COPD. *Chest* 2004; 125:71-76.
- Churg A, Wang RD, Tai H, Wang X, Xie C, Dai J, Shapiro SD, Wright JL. Macrophage metalloelastase mediates acute cigarette smoke-induced inflammation via tumor necrosis factor- α release. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167:1083-1089.
- Cosío MG, Guerassimov A. Chronic obstructive pulmonary disease. Inflammation of small airways and lung parenchyma. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160:S21-25.
- Cosío MG, Saetta M, Agusti A. Immunologic aspects of chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2009; 360:2445-2454.
- Cox G, Austin RC. Dexamethasone-induced suppression of apoptosis in human neutrophils requires continuous stimulation of new protein synthesis. *J Leukoc Biol* 1997; 61:224-230.
- Crapo R, Hankinson J, Irvin C, MacIntre N, Voter K, Wise R. Committee on Proficiency Standards for Clinical Pulmonary Function Laboratories. Standardization of Spirometry, 1994 Update. American Thoracic Society. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152:1107-1136.
- Csencsits KL, Jutila MA, Pascual DW. Nasal-associated lymphoid tissue: phenotypic and functional evidence for the primary role of peripheral node addressin in naive lymphocyte adhesion to high endothelial venules in a mucosal site. *J Immunol* 1999; 163:1382-1389.
- Dawicki W, Marshall JS. New and emerging roles for mast cells in host defence. *Curr Opin Immunol* 2007; 19:31-38.

- De Jong JW, van der Belt-Gritter B, Koëter GH, Postma DS. Peripheral blood lymphocyte cell subsets in subjects with chronic obstructive pulmonary disease: association with smoking, IgE and lung function. *Eur Respir J* 1997; 91:67-76.
- De Magalhães Simões S, dos Santos MA, da Silva Oliveira M, Fontes ES, Fernezlian S, Garippo AL, et al. Inflammatory cell mapping of the respiratory tract in fatal asthma. *Clin Exp Allergy* 2005; 35:602-11.
- De Torres JP, Cordoba-Lanus E, López-Aguilar C, Muros de Fuentes M, Montejo de Garcini A, Aguirre-Jaime A, Celli BR, Casanova C. C-reactive protein levels and clinically important predictive outcomes in stable COPD patients. *Eur Respir J* 2006; 27:902-907.
- Detková D, De Gracia J, Lopes-da-Silva S, Vendrell M, Alvarez A, Guarner L, et al. Common Variable Immunodeficiency. *Chest* 2007; 131:1883-1889.
- Di Stefano A, Capelli A, Lusuardi M, Balbo P, Vecchio C, Maestrelli P, Mapp CE, Fabbri LM, Donner CF, Saetta M. Severity of airflow limitation is associated with severity of airway inflammation in smokers. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158:1277-1285.
- Di Stefano A, Capelli A, Lusuardi M, Caramori G, Balbo P, Ioli F, Sacco S, Gnemmi I, Brun P, Adcock IM, Balbi B, Barnes PJ, Cheng KF, Donner CF. Decreased T lymphocyte infiltration in bronchial biopsies of subjects with severe chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Exp Allergy* 2001; 31:893-902.
- Di Stefano A, Caramori G, Gnemmi I, Contoli M, Bristot L, Capelli A, Ricciardolo FL, Magno F, D'Anna SE, Zanini A, Carbone M, Sabatini F, Usai C, Brun P, Chung KF, Barnes PJ, Papi A, Adcock IM, Balbi B. Association of increased CCL5 and CXCL7 chemokine expression with neutrophil activation in severe stable COPD. *Thorax* 2009; 64:968-975.
- Di Stefano A, Caramori G, Ricciardolo FL, Capelli A, Adcock IM, Donner CF. Cellular and molecular mechanisms in chronic obstructive pulmonary disease: an overview. *Clin Exp Allergy* 2004; 34:1156-1167.

- Di Stefano A, Turato G, Maestrelli P, Mapp CE, Ruggieri MP, Roggeri A, Boschetto P, Fabbri LM, Saetta M. Airflow limitation in chronic bronchitis is associated with T-lymphocyte and macrophage infiltration of the bronchial mucosa. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153:629-632.
- Drayton DL, Liao S, Mounzer RH, Ruddle NH. Lymphoid organ development: from ontogeny to neogenesis. *Nat Immunol* 2006; 7: 344-353.
- Drost EM, Skwarski KM, Sauleda J, Soler N, Roca J, Agusti A, MacNee W. Oxidative stress and airway inflammation in severe exacerbations of COPD. *Thorax* 2005; 60:293-300.
- Dubravec DB, Spriggs DR, Mannick JA, Rodrick ML. Circulating human peripheral blood granulocytes synthesize and secrete tumor necrosis factor alpha. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87:6758-6761.
- Ebert LM, Schaerli P, Moser B. Chemokine-mediated control of T cell traffic in lymphoid and peripheral tissues. *Mol Immunol* 2005; 42:799-809.
- Ekberg-Jansson A, Amin K, Bake B, Rosengren A, Tylén U, Venge P, Löfdahl CG. Bronchial mucosal mast cells in asymptomatic smokers relation to structure, lung function and emphysema. *Respir Med* 2005; 99:75-83.
- Elliot JG, Jensen CM, Mutavdzic S, Lamb JP, Carroll NG, James AL. Aggregations of lymphoid cells in the airways of nonsmokers, smokers, and subjects with asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 169:712-718
- Fabbri LM, Hurd SS; GOLD Scientific Committee. Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of COPD: 2003 update. *Eur Respir J* 2003; 22:1-2.
- Fairclough L, Urbanowicz RA, Corne J, Lamb JR. Killer cells in chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Sci (Lond)* 2008; 114:533-541.

- Finkelstein R, Fraser RS, Ghezzi H, Cosío MG. Alveolar inflammation and its relation to emphysema in smokers. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152:1666-1672.
- Finlay GA, O'Driscoll LR, Russell KJ, D'Arcy EM, Masterson JB, FitzGerald MX, O'Connor CM. Matrix metalloproteinase expression and production by alveolar macrophages in emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156:240-247.
- Fishman AP. One hundred years of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 171: 941-948.
- Focosi D, Bestagno M, Burrone O, Petrini M. CD57+ T lymphocytes and functional immune deficiency. *J Leukoc Biol* 2010; 87:107-116.
- Focosi D, Petrini M. CD57 expression on lymphoma microenvironment as a new prognostic marker related to immune dysfunction. *J Clin Oncol* 2007; 25:1289-1291.
- Fournier M, Lebargy F, Le Roy Ladurie F, Lenormand E, Pariente R. Intraepithelial T-lymphocyte subsets in the airways of normal subjects and of patients with chronic bronchitis. *Am Rev Respir Dis* 1989; 140:737-742.
- Freeman CM, Han MK, Martinez FJ, Murray S, Liu LX, Chensue SW, Polak TJ, Sonstein J, Todt JC, Ames TM, Arenberg DA, Meldrum CA, Getty C, McCloskey L, Curtis JL. Cytotoxic potential of lung CD8(+) T cells increases with chronic obstructive pulmonary disease severity and with in vitro stimulation by IL-18 or IL-15. *J Immunol* 2010; 184:6504-6513.
- Fujimoto K, Yasuo M, Urushibata K, Hanaoka M, Koizumi T, Kubo K. Airway inflammation during stable and acutely exacerbated chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2005; 25:640-646.
- Galli SJ, Kalesnikoff J, Grimbaldston MA, Piliponsky AM, Williams CM, Tsai M. Mast cells as "tunable" effector and immunoregulatory cells: recent advances. *Annu Rev Immunol* 2005a; 23:749-786.

- Galli SJ, Nakae S, Tsai M. Mast cells in the development of adaptive immune responses. *Nat Immunol* 2005b; 6:135-142.
- Gallo P, Chiusole M, Sanzari M, Sivieri S, Piccinno MG, Argentiero V, Rizzotti P, Tavolato B. Effect of high-dose steroid therapy on T-cell subpopulations. A longitudinal study in MS patients. *Acta Neurol Scand* 1994; 89:95-101.
- Gamble E, Grootendorst DC, Brightling CE, Troy S, Qiu Y, Zhu J, Parker D, Matin D, Majumdar S, Vignola AM, Kroegel C, Morell F, Hansel TT, Rennard SI, Compton C, Amit O, Tat T, Edelson J, Pavord ID, Rabe KF, Barnes NC, Jeffery PK. Antiinflammatory effects of the phosphodiesterase-4 inhibitor cilomilast (Ariflo) in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 168:976-982.
- Gamble E, Grootendorst DC, Hattotuwa K, O'Shaughnessy T, Ram FS, Qiu Y, Zhu J, Vignola AM, Kroegel C, Morell F, Pavord ID, Rabe KF, Jeffery PK, Barnes NC. Airway mucosal inflammation in COPD is similar in smokers and ex-smokers: a pooled analysis. *Eur Respir J* 2007; 30:467-471.
- Gan WQ, Man SF, Postma DS, Camp P, Sin DD. Female smokers beyond the perimenopausal period are at increased risk of chronic obstructive pulmonary disease: a systematic review and meta-analysis. *Respir Res* 2006; 7:52.
- Garbacki N, Di Valentin E, Piette J, Cataldo D, Crahay C, Colige A. Matrix metalloproteinase 12 silencing: a therapeutic approach to treat pathological lung tissue remodeling? *Pulm Pharmacol Ther* 2009; 22:267-278.
- Gevenois PA, de Maertelaer V, De Vuyst P, Zanen J, Yernault JC. Comparison of computed density and macroscopic morphometry in pulmonary emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152:653-657.
- Giembycz MA. Phosphodiesterase-4: selective and dual-specificity inhibitors for the therapy of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* 2005; 2:326-333.

- Global Initiative for Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease (GOLD). 2007. Disponible a: <http://www.goldcopd.com>.
- Gompertz S, O'Brien C, Bayley DL, Hill SL, Stockley RA. Changes in bronchial inflammation during acute exacerbations of chronic bronchitis. *Eur Respir J* 2001; 17:1112-1119.
- Gosman MM, Postma DS, Vonk JM, Rutgers B, Lodewijk M, Smith M, Luinge MA, Ten Hacken NH, Timens W. Association of mast cells with lung function in chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Res* 2008; 9:64.
- Gosman MM, Willemsse BW, Jansen DF, Laperre TS, van Schadewijk A, Hiemstra PS, Postma DS, Timens W, Kerstjens HA. Increased number of B-cells in bronchial biopsies in COPD. *Eur Respir J* 2006; 27:60-64.
- Grashoff WF, Sont JK, Sterk PJ, Hiemstra PS, de Boer WI, Stolk J, Han J, van Krieken JM. Chronic obstructive pulmonary disease: role of bronchiolar mast cells and macrophages. *Am J Pathol*, 1997; 151:1785-1790.
- Grimbaldeston MA, Metz M, Yu M, Tsai M, Galli SJ. Effector and potential immunoregulatory roles of mast cells in IgE-associated acquired immune responses. *Curr Opin Immunol* 2006; 18:751-760.
- Grootendorst DC, Gauw SA, Verhoosel RM, Sterk PJ, Hospers JJ, Bredenbröker D, Bethke TD, Hiemstra PS, Rabe KF. Reduction in sputum neutrophil and eosinophil numbers by the PDE4 inhibitor roflumilast in patients with COPD. *Thorax* 2007; 62:1081-1087.
- Gross P, Pfitzer E, Tolker E, Babyak M, Kaschak M. Experimental emphysema: its production with papain in normal and silicotic rats. *Arch Environ Health* 1965; 11:50-58.

- Grützkau A, Krüger-Krasagakes S, Baumeister H, Schwarz C, Kögel H, Welker P, Lippert U, Henz BM, Möller A. Synthesis, storage, and release of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor (VEGF/VPF) by human mast cells: implications for the biological significance of VEGF206. *Mol Biol Cell* 1998; 9:875-884.
- Hashimoto S, Kobayashi A, Kooguchi K, Kitamura Y, Onodera H, Nakajima H. Upregulation of two death pathways of perforin/granzyme and FasL/Fas in septic acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161:237-243.
- Hiemstra PS, van Wetering S, Stolk J. Neutrophil serine proteinases and defensins in chronic obstructive pulmonary disease: effects on pulmonary epithelium. *Eur Respir J* 1998; 12:1200-1208.
- Hogan R, Usherwood E, Zhong W, Roberts A, Dutton R, Harmsen A, Woodland DL. Activated antigen-specific CD8⁺ T cells persist in the lungs following recovery from respiratory virus infections. *J Immunol* 2001; 166:1813-1822.
- Hogg JC, Chu F, Utokaparch S, Woods R, Elliott WM, Buzatu L, Cherniak RM, Rogers RM, Sciurba FC, Coxson HO, Paré PD. The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2004; 350:2645-2653.
- Hogg JC, Chu FS, Tan WC, Sin DD, Patel SA, Pare PD, Martinez FJ, Rogers RM, Make BJ, Criner GJ, Cherniack RM, Sharafkhaneh A, Luketich JD, Coxson HO, Elliott WM, Sciurba FC. Survival after lung volume reduction in chronic obstructive pulmonary disease: insights from small airway pathology. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 176:454-459.
- Hogg JC, Pierce RA. Remodelling of peripheral lung tissue in COPD. *Eur Respir J* 2008; 31:913-914.
- Hogg JC, Timens W. The pathology of chronic obstructive pulmonary disease. *Annu Rev Pathol Mech Dis* 2009; 4:435-459.

- Hogg JC. Lung structure and function in COPD. *Int J Tuberc Lung Dis* 2008; 12:467-479.
- Hogg JC. Pathophysiology of airflow limitation in chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet* 2004; 364:709-721.
- Hoshino M, Nakamura Y. Anti-inflammatory effects of inhaled beclomethasone dipropionate in nonatopic asthmatics. *Eur Respir J* 1996; 9:696-702.
- Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature* 2006; 444:860-867.
- Irmeler M, Hertig S, MacDonald HR, Sadoul R, Becherer JD, Proudfoot A, Solari R, Tschopp J. Granzyme A is an interleukin 1 beta-converting enzyme. *J Exp Med* 1995; 181:1917-1922.
- Ito K, Ito M, Elliott M, Cosío MG, Caramori G, Kon O, Barczyk A, Hayashi S, Adcock I, Hogg J, Barnes PJ. Decreased histone deacetylase activity in chronic obstructive pulmonary disease: Relationship to severity. *N Engl J Med* 2005; 352:1967-1976.
- Janeway CA Jr, Travers P. Immunobiology: Principles of innate and adaptive immunity in the immune system in health and disease. Current Biology Ltd, London/Garland Publishing, 3a edició. Nova York, EUA; 2001.
- Johannessen A, Omenaas E, Bakke P, Gulsvik A. Incidence of GOLDdefined chronic obstructive pulmonary disease in a general adult population. *Int J Tuberc Lung Dis* 2005; 9:926-932.
- Jones PW, Willits LR, Burge PS, Calverley PM; Inhaled Steroids in Obstructive Lung Disease in Europe study investigators. Disease severity and the effect of fluticasone propionate on chronic obstructive pulmonary disease exacerbations. *Eur Respir J* 2003; 21:68-73.
- Keatings VM, Jatakanon A, Worsdell YM, Barnes PJ. Effects of inhaled and oral glucocorticoids on inflammatory indices in asthma and COPD. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155:542-548.

- Kelsen SG, Aksoy MO, Georgy M, Hershman R, Ji R, Li X, Hurford M, Solomides C, Chatila W, Kim V. Lymphoid follicle cells in chronic obstructive pulmonary disease overexpress the chemokine receptor CXCR3. *Am J Respir Crit Care Med* 2009; 179:799-805.
- Kim JR, Lim HW, Kang SG, Hillsamer P, Kim CH. Human CD57+ germinal center-T cells are the major helpers for GC-B cells and induce class switch recombination. *BMC Immunol* 2005; 6:3.
- Kitamura Y. Heterogeneity of mast cells and phenotypic change between subpopulations. *Annu Rev Immunol* 1989; 7:59-76.
- Koneru M, Monu N, Schaer D, Barletta J, Frey AB. Defective adhesion in tumor infiltrating CD8+ T cells. *J Immunol* 2006; 176:6103-6111.
- Kratz A, Campos-Neto A, Hanson MS, Ruddle NH. Chronic inflammation caused by lymphotoxin is lymphoid neogenesis. *J Exp Med* 1996; 183:1461-1472.
- Kumagai K, Ohno I, Okada S, Ohkawara Y, Suzuki K, Shinya T, Nagase H, Iwata K, Shirato K. Inhibition of matrix metalloproteinases prevents allergen-induced airway inflammation in a murine model of asthma. *J Immunol* 1999; 162:4212-4219.
- Kumar V, Cotran RS, Robbins SL. Robbins Basic Pathology. Saunders, 7a edició. Nova York, EUA; 2003.
- Kuschner WG, D'Alessandro A, Wong H, Blanc PD. Dose-dependent cigarette smoking-related inflammatory responses in healthy adults. *Eur Respir J* 1996; 9:1989-1994.
- Lacoste JY, Bousquet J, Chanez P, Van Vyve T, Simony-Lafontaine J, Lequeu N, Vic P, Enander I, Godard P, Michel FB. Eosinophilic and neutrophilic inflammation in asthma, chronic bronchitis, and chronic obstructive pulmonary disease. *J Allergy Clin Immunol* 1993; 92:537-548.

- Laffont S, Seillet C, Ortaldo J, Coudert JD, Guéry JC. Natural killer cells recruited into lymph nodes inhibit alloreactive T-cell activation through perforin-mediated killing of donor allogeneic dendritic cells. *Blood* 2008; 112:661-671.
- Lams BE, Sousa AR, Rees PJ, Lee TH. Immunopathology of the small-airway submucosa in smokers with and without chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158:1518-1523.
- Lams BE, Sousa AR, Rees PJ, Lee TH. Subepithelial immunopathology of the large airways in smokers with and without chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2000; 15:512-516.
- Lapperre T, Postma D, Gosman M, Snoeck-Stroband J, ten Hacken N, Hiemstra P, Timens W, Sterk P, Mauad T. Relation between duration of smoking cessation and bronchial inflammation in COPD. *Thorax* 2006; 61:115-121.
- Liles WC, Kiener PA, Ledbetter JA, Aruffo A, Klebanoff SJ. Differential expression of Fas (CD95) and Fas ligand on normal human phagocytesimplications for the regulation of apoptosis in neutrophils. *J Exp Med* 1996; 184:429-440.
- Linden M, Rasmussen JB, Piitulainen E, Tunek A, Larson M, Tegner H, Venge P, Laitinen LA, Brattsand R. Airway inflammation in smokers with nonobstructive and obstructive chronic bronchitis. *Am Rev Respir Dis* 1993; 148:1226-1232.
- Loetscher P, Seitz M, Clark-Lewis I, Baggiolini M, Moser B. Activation of NK cells by CC chemokines. Chemotaxis, Ca²⁺ mobilization, and enzyme release. *J Immunol* 1996; 156:322-327.
- Lomas DA, Evans DL, Stone SR, Chang W-SW, Carre RW. Effect of the Z mutation on the physical and inhibitory properties of alpha-1-antitrypsin. *Biochemistry* 1993; 32:500-508.

- Lomas DA, Silverman EK. The genetics of chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Res* 2001; 2:20-26.
- López AD, Shibuya K, Rao C, Mathers CD, Hansell AL, Held LS, Schmid V, Buist S. Chronic obstructive pulmonary disease: current burden and future projections. *Eur Respir J* 2006; 27:397-412.
- Lundbäck B, Lindberg A, Lindström M, Rönmark E, Jonsson AC, Jönsson E, Larsson LG, Andersson S, Sandström T, Larsson K. Not 15 but 50% of smokers develop COPD?-- Report from the Obstructive Lung Disease in Northern Sweden Studies. *Respir Med* 2003; 97:115-122.
- Madani A, Van Muylem A, de Maertelaer V, Zanen J, Gevenois PA. Pulmonary emphysema: size distribution of emphysematous spaces on multidetector CT images--comparison with macroscopic and microscopic morphometry. *Radiology* 2008; 248:1036-1041.
- Majno G, Joris I. Cells, Tissues and Disease. Oxford University Press, 2a edició. Oxford, Regne Unit; 2004.
- Majó J, Ghezze H, Cosío MG. Lymphocyte population and apoptosis in the lungs of smokers and their relation to emphysema. *Eur Respir J* 2001; 17:946-953.
- Mannino DM, Buist AS. Global burden of COPD: risk factors, prevalence, and future trends. *Lancet* 2007; 370:765-773.
- Mannino DM, Watt G, Hole D, Gillis C, Hart C, McConnachie A, Davey Smith G, Upton M, Hawthorne V, Sin DD, Man SF, Van Eeden S, Mapel DW, Vestbo J. The natural history of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2006; 27:627-643.
- Marchal-Sommé J, Uzunhan Y, Marchand-Adam S, Valeyre D, Soumelis V, Crestani B, Soler P. Nonproliferating mature immune cells form a novel type of organized lymphoid structure in idiopathic pulmonary fibrosis. *J. Immunol* 2006; 176:5735-5739.

- Marone G, Triggiani M, Genovese A, De Paulis A. Role of human mast cells and basophils in bronchial asthma. *Adv Immunol* 2005; 88:97-160.
- Martin TR, Raghu G, Maunder RJ, Springmeyer SC. The effects of chronic bronchitis and chronic air-flow obstruction on lung cell populations recovered by bronchoalveolar lavage. *Am Rev Respir Dis* 1985; 132:254-260.
- Martínez FJ, Han MK, Andrei AC, Wise R, Murray S, Curtis JL, Sternberg A, Criner G, Gay SE, Reilly J, Make B, Ries AL, Sciruba F, Weinmann G, Mosenifar Z, Decamp M, Fishman AP, Celli BR. Longitudinal change in the BODE index predicts mortality in severe emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 178:491-499.
- Mathers CD, Roncar D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLOS Medicine* 2006; 3: 2011-2030.
- Mathers CD. The global burden of disease: 2004 update. Ginebra, *Organización Mundial de la Salud* 2008.
- Maurer M, Theoharides T, Granstein RD, Bischoff SC, Bienenstock J, Henz B, Kovanen P, Piliponsky AM, Kambe N, Vliagoftis H, Levi-Schaffer F, Metz M, Miyachi Y, Befus D, Forsythe P, Kitamura Y, Galli S. What is the physiological function of mast cells? *Exp Dermatol* 2003; 12:886-910.
- Mayer AS, Newman LS. Genetic and environmental modulation of chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Physiol* 2001; 128:3-11.
- Medzhitov R. Inflammation 2010: new adventures of an old flame. *Cell* 2010; 140:771-776.
- Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* 2008; 454:428-435.
- Medzhitov R, Janeway CA Jr. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* 1997; 91:295-298.

- Mercer PF, Shute JK, Bhowmik A, Donaldson GC, Wedzicha JA, Warner JA. MMP-9, TIMP-1 and inflammatory cells in sputum from COPD patients during exacerbation. *Respir Res* 2005; 6:151.
- Metcalf DD, Baram D, Mekori YA. Mast cells. *Physiol Rev* 1997; 77:1033-1079.
- Metz M, Grimaldeston MA, Nakae S, Piliponsky AM, Tsai M, Galli SJ. Mast cells in the promotion and limitation of chronic inflammation. *Immunol Rev* 2007; 217:304-328.
- Metz M, Maurer M. Mast cells--key effector cells in immune responses. *Trends Immunol* 2007; 28:234-241.
- Meyer PA, Mannino DM, Redd SC, Olson DR. Characteristics of adults dying with COPD. *Chest* 2002; 122:2003-2008.
- Miller LG, Goldstein G, Murphy M, Ginns LC. Reversible alterations in immunoregulatory T cells in smoking. Analysis by monoclonal antibodies and flow cytometry. *Chest* 1982; 82:526-529.
- Miravittles M, Soler JJ, Soriano JB. Situación de la EPOC en España. En: Ancochea J, editor. Estrategia en EPOC del Sistema Nacional de Salud. Ministerio de Sanidad y Consumo, centro de publicaciones, Madrid. 2009; p. 31-53.
- Miravittles M, Soriano JB, Muñoz L, Garcia Rio F, Sanchez G, Sarmiento M, Sobradillo V, Duran-Tauleria E, Ancochea J. COPD prevalence in Spain in 2007 (EPI-SCAN study results). *Eur Respir J* 2008; 32 (Suppl 52): 308s.
- Murugan V, Peck MJ. Signal transduction pathways linking the activation of alveolar macrophages with the recruitment of neutrophils to lungs in chronic obstructive pulmonary disease. *Exp Lung Res* 2009; 35:439-485.

- Nasr IW, Reel M, Oberbarnscheidt MH, Mounzer RH, Baddoura FK, Ruddle NH, Lakkis FG. Tertiary lymphoid tissues generate effector and memory T cells that lead to allograft rejection. *Am J Transpl* 2007; 7:1071-1079.
- Nathan, C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nature Rev Immunol* 2006; 6:173-182.
- Nathan, C. Points of control in inflammation. *Nature* 2002; 420:846-852.
- Nathan, C.F. Secretory products of macrophages. *J Clin Invest* 1987; 79:319-326.
- Nguyen LT, Lim S, Oates T, Chung KF. Increase in airway neutrophils after oral but not inhaled corticosteroid therapy in mild asthma. *Respir Med* 2005; 99:200-207.
- O'Byrne PM, Postma DS. The many faces of airway inflammation: asthma and chronic obstructive pulmonary disease. Asthma Research Group. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159:S41-S63.
- O'Donnell R, Breen D, Wilson S, Djukanovic R. Inflammatory cells in the airways in COPD. *Thorax* 2006; 61:448-454.
- O'Shaughnessy TC, Ansari TW, Barnes NC, Jeffery PK. Inflammation in bronchial biopsies of subjects with chronic bronchitis: inverse relationship of CD8⁺ T lymphocytes with FEV₁. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155:852-857.
- Ohnishi K, Takagi M, Kurokawa Y, Satomi S, Kontinen YT. Matrix metalloproteinase-mediated extracellular matrix protein degradation in human pulmonary emphysema. *Lab Invest* 1998; 78:1077-1087.
- Olloquequi J, Ferrer J, Montes JF, Rodríguez E, Montero MA, García-Valero J. Differential lymphocyte infiltration in small airways and lung parenchyma in COPD patients. *Respir Med* 2010a; 104:1310-1318.

- Olloquequi J, Montes JF, Prats A, Rodríguez E, Montero MA, García-Valero J, Ferrer J. Significant increase of CD57⁺ cells in pulmonary lymphoid follicles of COPD patients. *Eur Respir J* 2010b; doi:10.1183/09031936.00201509.
- Oudijk EJD, Lammers JWJ, Koenderman L. Systemic inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2003; 22:5s-13s.
- Pabst R. Plasticity and heterogeneity of lymphoid organs what are the criteria to call a lymphoid organ primary, secondary or tertiary? *Immunol Lett* 2007; 112:1-8.
- Palmer BE, Mack DG, Martin AK, Maier LA, Fontenot AP. CD57 expression correlates with alveolitis severity in subjects with beryllium-induced disease. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 120:184-191.
- Panzner P, Lafitte JJ, Tscopoulos A, Hamid Q, Tulio MK. Marked up-regulation of T lymphocytes and expresion of interleukin-9 in bronchial biopsias from patients with chronic bronchitis with obstruction. *Chest* 2003; 124:1909-1915.
- Papi A, Bellettato CM, Braccioni F, Romagnoli M, Casolari P, Caramori G, Fabbri LM, Johnston SL. Infections and airway inflammation in chronic obstructive pulmonary disease severe exacerbations. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 173:1114-1121.
- Parra ER, Kairalla RA, Ribeiro de Carvalho CR, Eher E, Capelozzi VL. Inflammatory cell phenotyping of the pulmonary interstitium in idiopathic interstitial pneumonia. *Respiration* 2007; 74:159-169.
- Pecchi E, Dallaporta M, Jean A, Thirion S, Troadec JD. *Physiol Behav* 2009; 97: 279-292.
- Peces-Barba G, Barbera JA, Agustí AGN, Casanova C, Casas A, Izquierdo JL, Jardim J, López-Varela V, Montemayor T, Monsó E, Viejo JL. Guía clínica SEPAR-ALAT de diagnóstico y tratamiento de la EPOC. *Arch Bronconeumol* 2008; 44: 271-281.

- Peleman RA, Ryttilä PH, Kips JC, Joos GF, Pauwels RA. The cellular composition of induced sputum in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 1999; 13:839-843.
- Pesci A, Balbi B, Majori M, Cacciani G, Bertacco S, Alciato P, Donner CF. Inflammatory cells and mediators in bronchial lavage of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 1998; 12:380-386.
- Pilette C, Godding V, Kiss R, Delos M, Verbeken E, Decaestecker C, De Paepe K, Vaerman JP, Decramer M, Sibille Y. Reduced epithelial expression of secretory component in small airways correlates with airflow obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163:185-194.
- Plumb J, Smyth LJ, Adams HR, Vestbo J, Bentley A, Singh SD. Increased T-regulatory cells within lymphocyte follicles in moderate COPD. *Eur Respir J* 2009; 34:89-94.
- Pober JS, Sessa WC. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nature Rev Immunol* 2007; 7:803-815.
- Powrie DJ, Wilkinson TM, Donaldson GC, Jones P, Scrine K, Viel K, Kesten S, Wedzicha JA. Effect of tiotropium on sputum and serum inflammatory markers and exacerbations in COPD. *Eur Respir J* 2007; 30:472-478.
- Qiu Y, Zhu J, Bandi V, Atmar RL, Hattotuwa K, Guntupalli KK, Jeffery PK. Biopsy neutrophilia, neutrophil chemokine and receptor gene expression in severe exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 168:968-795.
- Rakoff-Nahoum, S., Paglino, J., Eslami-Varzaneh, F., Edberg, S. & Medzhitov, R. Recognition of commensal microflora by Toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell* 2004; 118:229-241.

- Ramirez-Venegas A, Sansores RH, Perez-Padilla R, Regalado J, Velazquez A, Sanchez C, Mayar ME. Survival of patients with chronic obstructive pulmonary disease due to biomass smoke and tobacco. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 173:393-397.
- Reid DW, Wen Y, Johns DP, Williams TJ, Ward C, Walters EH. Bronchodilator reversibility, airway eosinophilia and anti-inflammatory effects of inhaled fluticasone in COPD are not related. *Respirology* 2008; 13:799-809.
- Rennard SI, Schachter N, Streck M, Rickard K, Amit O. Cilomilast for COPD: results of a 6-month, placebo-controlled study of a potent, selective inhibitor of phosphodiesterase 4. *Chest* 2006; 129:56-66.
- Rennard SI, Vestbo J. COPD: the dangerous underestimate of 15%. *Lancet* 2006; 367:1216-1219.
- Retamales I, Elliott WM, Meshi B, Coxson HO, Pare PD, Sciruba FC, Rogers RM, Hayashi S, Hogg JC. Amplification of inflammation and its association with latent adenoviral infection. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164:469-473.
- Richmond I, Pritchard GE, Ashcroft T, Avery A, Corris PA, Walters EH. Bronchus associated lymphoid tissue (BALT) in human lung: its distribution in smokers and non-smokers. *Thorax* 1993; 48:1130-1134.
- Rodriguez-Roisin R. Toward a consensus definition for COPD exacerbations. *Chest* 2000; 117:398S-401S.
- Romieu I, Trenga C. Diet and obstructive lung diseases. *Epidemiol Rev* 2001; 23:268-287.
- Rose MG, Berliner N. T-cell large granular lymphocyte leukemia and related disorders. *Oncologist* 2004; 9: 247-258.

- Rosen SD, Tsay D, Singer MS, Hemmerich S, Abraham WM. Therapeutic targeting of endothelial ligands for L-selectin (PNAd) in a sheep model of asthma. *Am J Pathol* 2005; 166: 935-944.
- Russell RE, Culpitt SV, De Matos C, Donnelly L, Smith M, Wiggins J, Barnes PJ. Release and activity of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 by alveolar macrophages from patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002; 26:602-609.
- Rutgers SR, Postma DS, ten Hacken NH, Kauffman HF, van Der Mark TW, Koeter GH, Timens W. Ongoing airway inflammation in patients with COPD who do not currently smoke. *Chest* 2000; 117:262S.
- Saetta M, Baraldo S, Corbino L, Turato G, Braccioni F, Rea F, Cavallesco G, Tropeano G, Mapp CE, Maestrelli P, Ciaccia A, Fabbri LM. CD8+ve cells in the lungs of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*, 1999; 160:711-717.
- Saetta M, Di Stefano A, Maestrelli P, Ferrareso A, Drigo R, Potena A, Ciaccia A, Fabbri LM. Activated T-lymphocytes and macrophages in bronchial mucosa of subjects with chronic bronchitis. *Am Rev Respir Dis* 1993; 147:301-306.
- Saetta M, Di Stefano A, Turato G, Facchini FM, Corbino L, Mapp CE, Maestrelli P, Ciaccia A, Fabbri LM. CD8⁺ T-lymphocytes in peripheral airways of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157:822-826.
- Saetta M, Turato G, Baraldo S, Zanin A, Braccioni F, Mapp CE, Maestrelli P, Cavallesco G, Papi A, Fabbri LM. Goblet cell hyperplasia and epithelial inflammation in peripheral airways of smokers with both symptoms of chronic bronchitis and chronic airflow limitation. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161:1016-1021.
- Saetta M, Turato G, Facchini FM, Corbino L, Lucchini RE, Casona G, Maestrelli P, Mapp CE, Ciaccia A, Fabri LM. Inflammatory cells in the bronchial glands of smokers with chronic bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156:1633-1639.

- Semenzato G, Bortolin M, Facco M, Tassinari C, Sancetta R, Agostini C. Lung lymphocytes: origin, biological functions, and laboratory techniques for their study in immune-mediated pulmonary disorders. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1996; 33:423-455.
- Serhan CN, Savill J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nat Immunol* 2005; 6:1191-1197.
- Serhan CN. Resolution phase of inflammation: novel endogenous anti-inflammatory and proresolving lipid mediators and pathways. *Annu Rev Immunol* 2007; 25:101-137.
- Sethi S, Murphy TF. Infection in the pathogenesis and course of chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2008; 359:2355-2365.
- Shaheen SO, Barker DJ, Holgate ST. Do lower respiratory tract infections in early childhood cause chronic obstructive pulmonary disease? *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 151:1649-1651.
- Shapiro SD, Ingenito EP. The pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease: advances in the past 100 years. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2005; 32:367-372.
- Silverman EK, Speizer FE. Risk factors for the development of chronic obstructive pulmonary disease. *Med Clin North Am* 1996; 80:501-522.
- Smyth MJ, Cretney E, Kelly JM, Westwood JA, Street SE, Yagita H, Takeda K, van Dommelen SL, Degli-Esposti MA, Hayakawa Y. Activation of NK cell cytotoxicity. *Mol Immunol* 2005; 42:501-510.
- Snoeck-Stroband JB, Laperre TS, Gosman MM, Boezen HM, Timens W, ten Hacken NH, Sont JK, Sterk PJ, Hiemstra PS. Chronic bronchitis sub-phenotype within COPD: inflammation in sputum and biopsies. *Eur Respir J* 2008; 31:70-77.

- Sobradillo V, Miravittles M, Jiménez CA, Gabriel R, Viejo JL, Masa JF, Fernandez-Fau L, Villasante C. Epidemiological study of chronic obstructive pulmonary disease in Spain (IBERPOC): prevalence of chronic respiratory symptoms and airflow limitation. *Arch Bronconeumol* 1999; 35:159-166.
- Sokol CL, Barton GM, Farr AG, Medzhitov R. A mechanism for the initiation of allergen-induced T helper type 2 responses. *Nature Immunol* 2008; 9:310-318.
- Soriano JB, Miravittles M. Datos epidemiológicos de EPOC en España. *Arch Bronconeumol* 2007; 43:2-9.
- Sower LE, Froelich CJ, Allegretto N, Rose PM, Hanna WD, Klimpel GR. Extracellular activities of human granzyme A. Monocyte activation by granzyme A versus alpha-thrombin. *J Immunol* 1996a; 156:2585-2590.
- Sower LE, Klimpel GR, Hanna W, Froelich CJ. Extracellular activities of human granzymes. I. Granzyme A induces IL6 and IL8 production in fibroblast and epithelial cell lines. *Cell Immunol* 1996b; 171:159-163.
- Sparrow D, O'Connor G, Weiss ST. The relation of airways responsiveness and atopy to the development of chronic obstructive lung disease. *Epidemiol Rev* 1988; 10:29-47.
- Stricker RB, Winger EE. Decreased CD57 lymphocyte subset in patients with chronic Lyme disease. *Immunol Lett* 2001; 76:43-48.
- Sunyer J, Sáez M, Murillo C, Castellsague J, Martínez F, Antó JM. Air pollution and emergency room admissions for chronic obstructive pulmonary disease: a 5-year study. *Am J Epidemiol* 1993; 137:701-705.
- Sutherland ER, Martin RJ. Airway inflammation in chronic obstructive pulmonary disease: comparisons with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 112:819-827; quiz 828.

- Suzawa K, Kobayashi M, Sakai Y, Hoshino H, Watanabe M, Harada O, Ohtani H, Fukuda M, Nakayama J. Preferential induction of peripheral lymph node addressin on high endothelial venule-like vessels in the active phase of ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 2007; 102:1499-1509.
- Tarazona R, DelaRosa O, Alonso C, Ostos B, Espejo J, Peña J, Solana R. Increased expression of NK cell markers on T lymphocytes in aging and chronic activation of the immune system reflects the accumulation of effector/senescent T cells. *Mech Ageing Dev* 2000; 121:77-88.
- Taub DD, Ortaldo JR, Turcovski-Corrales SM, Key ML, Longo DL, Murphy WJ. Beta chemokines costimulate lymphocyte cytolysis, proliferation, and lymphokine production. *J Leukoc Biol* 1996; 59:81-89.
- Tetley TD. Macrophages and the pathogenesis of COPD. *Chest* 2002; 121:156S-159S.
- Tetley TD. New perspectives on basic mechanisms in lung disease. 6. Proteinase imbalance: its role in lung disease. *Thorax* 1993; 48:560-565.
- Theoharides TC, Kalogeromitros D. The critical role of mast cells in allergy and inflammation. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1088:78-99.
- Thompson AB, Daughton D, Robbins RA, Ghafouri MA, Oehlerking M, Rennard SI. Intraluminal airway inflammation in chronic bronchitis. Characterization and correlation with clinical parameters. *Am Rev Respir Dis* 1989; 140:1527-1537.
- Thurlbeck WM, Dunnill MS, Hartung W, Heard BE, Heppelston AG, Ryden RC. A comparison of three methods of measuring emphysema. *Hum Pathol* 1970; 1:215-26.
- Trupin L, Earnest G, San Pedro M, Balmes JR, Eisner MD, Yelin E, Katz PP, Blanc PD. The occupational burden of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2003; 22:462-469.

- Tsoumakidou M, Demedts IK, Brusselle GG, Jeffery PK. Dendritic cells in chronic obstructive pulmonary disease: new players in an old game. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 177:1180-1186.
- Tsoumakidou M, Tzanakis N, Chrysoufakis G, Kyriakou D, Siafakas NM. Changes in sputum T-lymphocyte subpopulations at the onset of severe exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Med* 2005; 99:572-579.
- Tsoumakidou M, Tzanakis N, Siafakas NM. Induced sputum in the investigation of airway inflammation of COPD. *Respir Med* 2003; 97:863-871.
- Turato G, Zuin R, Miniati M, Baraldo S, Rea F, Beghé B, Monti S, Formichi B, Boschetto P, Harari S, Papi A, Maestrelli P, Fabbri LM, Saetta M. Airway inflammation in severe chronic obstructive pulmonary disease: relationship with lung function and radiologic emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166:105-110.
- Uchimura K, Rosen SD. Sulfated L-selectin ligands as a therapeutic target in chronic inflammation. *Trends Immunol* 2006; 27:559-565.
- Ulrik CS, Backer V. Nonreversible airflow obstruction in life-long nonsmokers with moderate to severe asthma. *Eur Respir J* 1999; 14:892-896.
- Urbanowicz RA, Lamb JR, Todd I, Corne JM, Fairclough LC. Enhanced effector function of cytotoxic cells in the induced sputum of COPD patients. *Respir Res* 2010; 11:76.
- van der Strate BW, Postma DS, Brandsma CA, Melgert BN, Luinge MA, Geerlings M, Hylkema MN, van den Berg A, Timens W, Kerstjens HA. Cigarette smoke-induced emphysema: a role for the B cell? *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 173:751-758.
- Vernooy JH, Möller GM, van Suylen RJ, van Spijk MP, Cloots RH, Hoet PH, Pennings HJ, Wouters EF. Increased granzyme A expression in type II pneumocytes of patients with severe chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 175:464-472.

- Wardlaw AJ, Guillen C, Morgan A. Mechanisms of T cell migration to the lung. *Clin Exp Allergy* 2005; 35:4-7.
- Washko GR, Fan VS, Ramsey SD, Mohsenifar Z, Martinez F, Make BJ, Sciruba FC, Criner GJ, Minai O, Decamp MM, Reilly JJ; National Emphysema Treatment Trial Research Group. The effect of lung volume reduction surgery on chronic obstructive pulmonary disease exacerbations. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 177:164-169.
- Wedzicha JA. Exacerbations: etiology and pathophysiologic mechanisms. *Chest* 2002; 121:136S-141S.
- White AJ, Gompertz S, Bayley DL, Hill SL, O'Brien C, Unsal I, Stockley RA. Resolution of bronchial inflammation is related to bacterial eradication following treatment of exacerbations of chronic bronchitis. *Thorax* 2003a; 58:680-685.
- White AJ, Gompertz S, Stockley RA. Chronic obstructive pulmonary disease. 6: The aetiology of exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 2003b; 58:73-80.
- Wilkinson TM, Hurst JR, Perera WR, Wilks M, Donaldson GC, Wedzicha JA. Effect of interactions between lower airway bacterial and rhinoviral infection in exacerbations of COPD. *Chest* 2006; 129:317-324.
- Willemse BW, ten Hacken NH, Rutgers B, Postma DS, Timens W. Association of current smoking with airway inflammation in chronic obstructive pulmonary disease and asymptomatic smokers. *Respir Res* 2005; 25:6-38.
- Xu B, Wagner N, Pham LN, Magno V, Shan Z, Butcher EC, Michie SA. Lymphocyte homing to bronchus-associated lymphoid tissue (BALT) is mediated by L-selectin/PNAd, alpha4beta1 integrin/VCAM-1, and LFA-1 adhesion pathways. *J Exp Med* 2003; 197:1255-1267.

Yildiz F, Kaur AC, Ilgazli A, Celikoglu M, Kaçar Ozkara S, Paksoy N, Ozkarakaş O. Inhaled corticosteroids may reduce neutrophilic inflammation in patients with stable chronic obstructive pulmonary disease. *Respiration* 2000; 67:71-76.

**Annex I:
Informe dels
directors**

La tesi d'en Jordi Olloquequi González es basa en els articles següents:

Article 1) *Differential lymphocyte infiltration in small airways and lung parenchyma in COPD patients*

Autors: J. Olloquequi, J. Ferrer, J.F. Montes, E. Rodríguez, M.A. Montero, J. García-Valero

Referència: *Respiratory Medicine* 2010; 104:1310-1318.

Factor d'impacte: 2,331

Article 2) *Significant increase of CD57⁺ cells in pulmonary lymphoid follicles of COPD patients*

Autors: J. Olloquequi, J.F. Montes, A. Prats, E. Rodríguez, M.A. Montero, J. García-Valero, J. Ferrer

Referència: *European Respiratory Journal* 2010; doi:10.1183/09031936.00201509.

Factor d'impacte: 5,527

José García Valero, Juan Francisco Montes Castillo i Jaume Ferrer Sancho, directors de la tesi doctoral de Jordi Olloquequi González, certifiquen que el doctorand ha contribuït als treballs recollits en els tres articles de la manera següent:

Articles 1) El doctorand ha dut a terme les immunolocalitzacions, les micrografies, les estimacions de les densitats cel·lulars i l'anàlisi de les dades. També ha participat en la discussió dels resultats obtinguts, ha realitzat l'escriptura de les primeres versions dels manuscrits i els ha modificat d'acord amb les suggerències dels directors.

Article 2) El doctorand ha dut a terme tant les immunolocalitzacions com les micrografies i les estimacions de les densitats de les cèl·lules inflamatòries fol·liculars. D'altra banda, també ha participat en l'obtenció i en l'anàlisi de les dades referents a l'estructura i a la localització dels OL3, així com en les dades referents a la proliferació i a l'apoptosi en aquestes estructures. Finalment, el doctorand ha participat en la discussió de tots resultats recollits en l'article, ha

realitzat l'escriptura de la primera versió del manuscrit i l'ha modificat d'acord amb les suggerències dels directors.

Barcelona, 10 de setembre de 2010

Dr. José García Valero

Dr. Juan F. Montes Castillo

Dr. Jaume Ferrer Sancho

**Annex II:
Material i
mètodes**

1. PACIENTS

El nostre estudi s'ha realitzat a partir de teixit pulmonar procedent de 59 pacients de l'Hospital General Universitari Vall d'Hebron sotmesos a lobectomia o pneumectomia per tumors pulmonars no obstructius, i de malalts d'MPOC aollits a un programa de trasplantament pulmonar. El Comitè Ètic de l'Hospital Vall d'Hebron va aprovar el protocol i tots els pacients van signar un full de consentiment informat en què s'hi detallaven els objectius de l'estudi i les implicacions de la seva participació.

Els pacients van ser sotmesos a una entrevista i exploració física per tal d'obtenir les dades demogràfiques i clíniques pertinents (edat, hàbits tabàquics, símptomes actuals, etc.) així com a proves de funció pulmonar, entre les quals s'inclogueren el volum espirat forçat en el primer segon (FEV₁) i la capacitat vital forçada (FVC) (ambdues realitzades postbroncodilatació), el volum residual (RV), la capacitat pulmonar total (TLC) i la capacitat de transferència del monòxid de carboni (DL_{CO}). Cap individu va rebre quimioteràpia ni corticosteroides orals de forma contínua abans de l'estudi.

Finalment, la població mostral es va classificar en 4 grups, segons l'estatus tabàquic (fumadors i no fumadors) i els criteris de la GOLD (2007):

- 1) **Non-smokers (A):** 9 pacients no fumadors i amb funció pulmonar normal.
- 2) **Smokers without COPD (B):** 18 fumadors que no havien desenvolupat l'MPOC.
- 3) **Moderate COPD (C):** 16 fumadors que mostraven signes clínics moderats de l'MPOC (estadi II de la GOLD).
- 4) **Very severe COPD (D):** 16 pacients sotmesos a un doble trasplantament pulmonar per trobar-se en un estat molt greu de l'MPOC (estadi IV de la GOLD).

A la Taula 3 s'especifiquen les dades demogràfiques i clíniques més rellevants dels pacients estudiats.

Taula 3. Dades demogràfiques i clíniques de la població mostral.

Pacient	Grup	Sexe	Edat (anys)	Historial tabàquic (paquets-any)	FEV ₁ (% predit)	FEV ₁ /FVC (%)	RV (%)	TLC (%)	DL _{CO} (%)	GEM (%)
0	D	Home	58	23	20,0	20,0	297,0	147,0	39,0	50
1	B	Home	57	75	79,1	78,3	99,2	87,2	78,7	10
2	C	Home	69	47	100,1	67,0	70,0	101,7	65,6	50
3	B	Home	72	85	96,9	80,3	97,7	95,7	84,3	5
4	C	Home	78	47	60,9	44,9	145,0	123,5	47,3	35
5	B	Home	69	90	81,8	71,1	108,6	97,0	74,7	30
6	B	Dona	39	48	106,8	81,4	53,6	95,5	86,6	0
7	B	Home	59	31	81,6	77,3	75,6	79,4	75,7	45
8	A	Dona	67	0	59,1	67,0	137,6	90,5	56,0	0
9	D	Dona	59	75	25,7	42,0	251,8	134,3	42,0	80
10	D	Home	42	20	22,5	30,0	222,0	107,0	11,0	75
11	C	Home	71	85	43,8	58,9	216,0	121,0	53,0	35
12	D	Home	60	65	19,2	20,7	331,1	160,1	11,1	70
13	B	Home	75	42	76,0	76,3	101,6	90,1	76,0	0
14	C	Home	62	69	48,4	48,0	173,7	121,2	45,0	60
15	A	Dona	80	0	114,9	80,6	103,6	102,6	79,6	10
16	D	Home	62	40	24,8	39,7	229,1	118,4	43,2	50
17	D	Home	54	65	22,8	35,3	470,0	220,0	50,0	65
18	B	Dona	63	33	60,6	79,1	56,0	56,2	50,0	0
19	A	Dona	57	0	69,1	96,3	107,5	101,0	48,5	0
20	D	Home	63	75	16,0	39,3	230,2	105,7	37,0	55
21	C	Home	62	100	70,7	63,8	141,0	109,0	74,0	25
22	A	Home	33	0	96,0	81,6	125,0	99,0	113,0	0
23	D	Dona	57	70	24,6	44,0	282,7	135,2	34,8	85
24	C	Home	60	60	87,0	69,6	151,0	118,0	64,0	35
26	A	Dona	61	0	103,0	74,0	122,0	112,0	102,0	0
27	B	Home	75	20	90,0	75,0	90,0	82,0	95,0	15
28	D	Dona	50	30	12,0	47,1	371,0	148,0	34,0	75
29	A	Dona	59	0	107,0	85,8	107,6	101,0	76,0	0
30	B	Home	55	61	87,0	83,0	108,0	93,0	51,0	35
31	D	Home	57	60	30,3	44,8	109,0	91,0	43,0	55
32	C	Home	73	75	42,0	54,0	144,0	102,0	71,0	20
33	C	Home	57	64	81,0	69,0	96,0	91,0	67,0	25
35	B	Home	44	30	87,3	74,7	112,0	102,0	70,0	0
36	B	Home	49	40	96,0	99,9	98,1	90,5	71,6	0
37	A	Dona	69	0	98,0	82,4	107,6	101,0	82,1	0
39	C	Home	59	40	66,0	60,0	158,0	112,0	48,0	15
40	C	Home	70	65	67,0	62,0	146,1	113,8	63,0	5
41	B	Home	60	100	82,0	96,0	92,0	74,0	78,0	0
43	D	Home	50	30	18,3	31,2	401,0	157,0	26,2	100
44	A	Dona	54	0	104,0	74,0	78,0	102,0	84,0	2,5
45	B	Home	74	60	81,0	72,0	99,0	90,5	72,1	2,5
46	C	Home	53	70	71,0	61,0	146,1	114,0	57,6	5
47	A	Dona	76	0	143,0	79,0	79,0	100,0	98,0	2,5
48	B	Home	74	46	74,0	71,0	206,0	120,0	76,0	17,5
49	B	Home	65	63	75,0	75,0	74,0	77,0	27,0	50

Pacient	Grup	Sexe	Edat (anys)	Historial tabàquic (paquets-any)	FEV1 (% predit)	FEV1/FVC (%)	RV (%)	TLC (%)	DL _{CO} (%)	GEM (%)
50	B	Home	51	28	85,5	76,4	93,0	95,0	86,0	20
53	B	Dona	56	16	88,0	72,0	129,0	111,0	63,0	10
54	C	Home	52	30	88,0	69,0	143,0	117,0	66,0	60
55	B	Dona	60	30	101,0	83,0	73,0	93,0	74,0	10
56	D	Home	58	35	20,0	32,5	239,0	121,0	42,0	75
57	D	Home	56	80	17,2	27,3	282,7	135,2	34,8	80
58	C	Home	74	65	47,6	46,0	146,3	113,7	38,0	25
59	C	Home	58	96	96,0	61,0	169,0	135,0	56,0	15
60	D	Home	51	13	14,0	39,0	213,0	113,0	35,0	60
61	D	Home	60	60	17,0	33,0	397,0	163,0	22,0	70
62	C	Home	61	32	65,0	54,0	146,0	113,8	39,0	25
63	D	Home	58	25	27,0	37,0	196,0	107,0	51,0	35
64	C	Home	55	38	75,0	58,2	146,1	113,8	66,6	10

FEV₁: volum espirat forçat en el primer segon. **FVC**: capacitat vital forçada. **RV**: volum residual. **TLC**: capacitat pulmonar total. **DL_{CO}**: capacitat de transferència del monòxid de carboni. **GEM**: grau d'emfisema macroscòpic.

2. OBTENCIÓ DE MOSTRES

Tot el procés de la presa de mostres es va dur a terme sota la supervisió d'un metge especialista en anatomia patològica de l'Hospital General Universitari Vall d'Hebron.

2.1 Resecció i fixació

Les mostres extretes al quiròfan (lòbuls o pulmó sencer) es van fixar insuflant-hi formol al 4% (Panreac, Montcada i Reixach, Barcelona) a través de les vies aèries i submergint-les en el fixador durant un període de 24 h. Després, les peces pulmonars es van seccionar amb l'ajuda d'un visceròtom i es van obtenir tots els talls axials seriatos d'1 cm de gruix possibles. Sobre aquestes seccions es va dur a terme l'estimació del GEM (expressat en tant per cent de teixit emfisematós present a la mostra) seguint el mètode de Thurlbeck i cols (1970), que consisteix en valorar l'afinitat de la mostra que s'analitza amb un recull d'imatges de seccions pulmonars amb diferents graus d'emfisema.

Per tal d'obtenir les mostres de pulmó que s'havien d'incloure en parafina, els talls van ser col·locats en sèrie, tot girant cadascun d'ells 120° respecte l'anterior. La selecció dels blocs histològics es va basar en un model de mostreig jerarquitzat del tipus sistemàtic i a l'atzar (SURS, *Systematic Uniform Random Sampling*), el qual permet obtenir conjunts de blocs

representatius del grup experimental i introdueix increments mínims a la variabilitat de l'anàlisi. Es va col·locar una quadrícula estàndard damunt de cada tall de pulmó i es van seleccionar uniformement a l'atzar 5 quadrats de 2 cm x 2 cm x 0,3 cm de la quadrícula per lòbul pulmonar.

3. MICROSCÒPIA ÒPTICA

3.1 Inclusió en parafina

Tot seguit, les 5 mostres de cada lòbul s'introdueixen en *cassettes* d'inclusió per ser deshidratades i incloses en parafina. Un cop finalitzada la inclusió, es van confeccionar els blocs, tot orientant el teixit en la posició més òptima per a la seva microtomia. Finalment, s'escollí a l'atzar un únic bloc representatiu, en el qual s'hi reunien els diferents elements estructurals característics del teixit pulmonar.

3.2 Microtomia

De cada bloc es van obtenir seccions seriades de 4 µm de gruix amb el micròtom de rotació Microm HM340E (Heidelberg, Alemanya). Els talls es van dipositar en un bany d'aigua a 40°C i posteriorment es van recollir en portaobjectes amb càrrega positiva Starfrost Plus (Menzel-Gläser, Braunschweig, Alemanya).

3.3 Tinció hematoxilina-eosina

Es va realitzar una tinció d'hematoxilina-eosina sobre la primera secció de cada sèrie, amb l'objectiu de revelar-ne la histologia pulmonar. La tinció es va iniciar amb el desparafinat i posterior hidratació de les mostres. Un cop fet això, les seccions es van tenyir amb hematoxilina de Friedlander durant 8 min i just després es rentaren mitjançant un flux constant d'H₂O corrent durant 10 min per provocar el viratge de l'hematoxilina. En acabat, les seccions es van tenyir amb eosina durant 8 min i, passat aquest temps, es deshidrataren amb 2 banys d'etanol absolut de 2 i 5 min cadascun, seguits de 2 banys més de 5 min amb xilè. Finalment, es va procedir al muntatge de les preparacions amb un medi no hidrosoluble com l'Eukitt (Fluka, Buchs, Suïssa).

4. IMMUNOHISTOQUÍMICA EN MICROSCÒPIA ÒPTICA

Per tal de dur a terme la detecció i localització dels tipus cel·lulars d'interès, es van destinar 18 seccions de cada pacient per a ser immunolocalitzades amb els següents anticossos primaris, a les concentracions indicades:

- Anticòs policlonal obtingut en conill contra CD3 (1:400, DakoCytomation, Glostrup, Dinamarca) per localitzar els limfòcits T totals.
- Anticòs monoclonal obtingut en ratolí contra CD4 (1:50, Novocastra, Wetzlar, Alemanya) per localitzar els limfòcits T col·laboradors.
- Anticòs monoclonal obtingut en ratolí contra CD8 (1:100, DakoCytomation) per localitzar els limfòcits T citotòxics.
- Anticòs monoclonal obtingut en ratolí contra CD20cy (1:800, DakoCytomation) per localitzar els limfòcits B.
- Anticòs monoclonal obtingut en ratolí contra CD57 (1:80; DakoCytomation) per localitzar les cèl·lules CD57⁺.
- Anticòs monoclonal obtingut en ratolí contra CD68 (1:50; DakoCytomation) per localitzar els macròfags.
- Anticòs monoclonal obtingut en ratolí contra Elastasa Humana de Neutròfils (1:250; Calbiochem, San Diego, EUA) per localitzar els neutròfils.
- Anticòs monoclonal obtingut en ratolí contra Triptasa Humana de Mastòcits (1:800; DakoCytomation) per localitzar els mastòcits.
- Anticòs monoclonal obtingut en ratolí contra CD83 (1:30; Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, EUA) per localitzar cèl·lules dendrítiques madures.
- Anticòs monoclonal obtingut en ratolí contra cèl·lules dendrítiques fol·liculars (1:20; DakoCytomation).
- Anticòs monoclonal obtingut en ratolí contra PECAM-1 (1:200; DakoCytomation).
- Anticòs monoclonal obtingut en ratolí contra Podoplanina (1:150; Abcam, Cambridge, Regne Unit).
- Anticòs monoclonal obtingut en ratolí contra MAdCAM-1 (1:30; AbD Serotec, Kidlington, Regne Unit).
- Anticòs monoclonal obtingut en ratolí contra PNAd (1:50; BD Biosciences, New Jersey, EUA).

- Anticòs monoclonal obtingut en ratolí contra Ki-67 (1:150; DakoCytomation), per localitzar cèl·lules en proliferació.
- Anticòs monoclonal obtingut en ratolí contra BCL6 (1:60; DakoCytomation), per localitzar els centres germinals dels OL3.
- Anticòs policlonal obtingut en conill contra Caspasa 3 activada (1:200; Cell Signaling Technology, Danvers, USA) per localitzar cèl·lules en apoptosi.

4.1 Immunolocalització de CD3, CD4, CD8, CD20cy, CD57, CD68, HNE, Triptasa humana de mastòcits, CD83, Cèl·lules dendrítiques fol·liculars, PECAM-1, Podoplanina, MadCAM-1, PNAd, Ki-67, BCL6 i Caspasa 3 activada

4.1.1 Desparafinat i hidratació

Abans d'iniciar el procediment immunohistoquímic es van escalfar les seccions en una estufa a 40°C durant 15 min, per tal de reforçar-ne l'adhesió als portaobjectes. Seguidament, es va començar amb el desparafinat i posterior hidratació de les seccions, a partir de 3 banys de 10 min amb xilè i una bateria d'alcohols de graduació decreixent.

4.1.2 Desemmascarament de l'antigen

Durant la fixació dels teixits amb aldehids que basen el seu mecanisme d'acció en l'entrecreuament proteic, com ara el formol, pot succeir que l'/els epítot/s reconeguts per l'anticòs quedin emmascarats. En aquestes ocasions, per tal d'afavorir la unió de l'anticòs a l'antigen és imprescindible fer, abans de realitzar la incubació amb els anticossos, un tractament de les seccions amb calor o enzims proteolítics. Aquest tractament es coneix com a desemmascarament de l'antigen.

Després de diverses provatures amb mostres irrellevants, es va determinar el mètode de desemmascarament òptim per a cada combinació d'antigen-anticòs. D'aquesta manera, les mostres es van submergir en diversos tampons amb un pH apropiat per a cada desemmascarament:

- Tris-HCl 10 mM-EDTA 0,5 mM, pH 9,0, per als marcadors CD3, CD8, CD20cy i Cèl·lules dendrítiques fol·liculars.

- EDTA-NaOH 1 mM, pH 8,0, per als marcadors CD4, CD57, Triptasa humana de mastòcits, BCL6 i Caspasa 3 activada.
- Citrat 10 mM, pH 6,0, per als marcadors PECAM, Podoplanina, PNA_d, MAdCAM i Ki-67.

Les mostres submergides en aquests tampons es van escalfar en un forn de microones Sanyo (Osaka, Japó) model EM-S1053 a potència màxima (800 W), fins arribar a una temperatura de 95°C. Una vegada assolida aquesta temperatura, les seccions van deixar-se refredar fins arribar a 70°C, abans de tornar-les a escalfar durant 15 min fins a 95°C, tot fent servir en aquesta ocasió la potència mínima (80 W) de l'aparell. Finalment, es va deixar que les seccions es refredessin a temperatura ambient fins assolir els 40°C.

Per dur a terme el desemascament dels antigens CD68, CD83 i HNE va ser imprescindible incubar les seccions amb un enzim proteolític, la tripsina. Així, la incubació es va fer amb una solució de tripsinització que contenia tripsina 0,1%, clorur de calci 0,1% en tampó Tris-HCl 20 mM pH 7,6 a 37°C durant 10 min.

4.1.3 Bloqueig de les peroxidases endògenes

Donat que el mètode de revelat que vam utilitzar es basa en la peroxidasa, vam inhibir les possibles peroxidases pròpies del teixit amb una solució composta de metanol al 10%, H₂O₂ al 3% i PBS 0,1 M durant 15 min a temperatura ambient.

4.1.4 Bloqueig de les unions inespecífiques

Tot seguit, es va procedir a bloquejar les unions inespecífiques, tot incubant les seccions amb una solució de bloqueig composta per glicina 0,1 M, ovoalbúmina 2%, sèrum de cavall (o de cabra, en el cas dels marcadors CD3 i Caspasa 3 activada) 2% en PBS 0,1 M, durant 1 h a temperatura ambient, i mantenint les seccions dins d'una cambra humida.

4.1.5 Incubació amb l'anticòs primari

En tots els casos, les mostres es van incubar amb l'anticòs primari a 4°C durant tota la nit en una cambra humida, fent ús de cobreobjectes "amb potes". Aquests cobreobjectes s'obtenen

afegint una gota d'esmalt d'ungles a cada vèrtex. Gràcies a ells s'evita que la solució d'incubació s'evapori durant les hores en què transcorre el procés. Quant a la doble immunolocalització de CD3 i de CD57, aquesta es va dur a terme fent primer la immunolocalització i revelat del CD3 i després la detecció del CD57.

Tots els anticossos diluïts en la solució de bloqueig abans esmentada es van suplementar amb NaN_3 0,03% per evitar el creixement de microorganismes; en els casos dels anticossos contra CD3 i contra CD20cy, es va afegir també Tween 20 0,05%, per tal de minimitzar les unions inespecífiques.

Una vegada finalitzada la incubació amb l'anticòs corresponent, les seccions van ser rentades 3 cops durant 5 min cada vegada amb Tween 20 0,05% - PBS 0,1 M per als marcadors contra CD3 i contra CD20cy, i amb PBS 0,1 M per a la resta de marcadors.

4.1.6 Incubació amb l'anticòs secundari

Una vegada rentat l'anticòs primari, es va procedir a incubar les seccions amb l'anticòs secundari corresponent. Mentre que pels anticossos primaris obtinguts en conill contra CD3 i contra Caspasa 3 activada es va fer servir com a secundari un anticòs obtingut en cabra contra IgG de conill (Vector, Burlingame, EUA), pels anticossos primaris obtinguts en ratolí contra la resta de marcadors, excepte pel CD57, es va utilitzar un anticòs obtingut en cavall contra IgG de ratolí (Vector). En el cas del marcador CD57, es va utilitzar com a anticòs secundari un anticòs obtingut en cavall contra IgM de ratolí (Vector).

Aquests anticossos secundaris estaven biotinitats, donat que el mètode de revelat utilitzat es basa en la tècnica de l'ABC (*Avidin - Biotin - Complex*). La dilució determinada per l'anticòs secundari va ser 1:200 en PBS 0,1 M, suplementat amb 1,5% de sèrum de cavall (o de cabra, en el cas dels marcadors CD3 i Caspasa 3 activada). Un cop transcorreguda l'hora d'incubació es van fer 3 rentats amb PBS 0,1 M.

4.1.7 Incubació amb la solució ABC

Tot seguit es va procedir a incubar les seccions amb la solució ABC diluïda 1:25 en PBS 0,1 M. La solució ABC emprada és un dels components del Kit VectaStain Elite (Vector). La

incubació es va dur a terme durant 30 min a temperatura ambient, novament fent ús de cobreobjectes “amb potes”. Passat aquest temps, es van fer 3 rentats de 5 min amb PBS 0,1 M.

4.1.8 Revelat i tinció de contrast

El revelat es fonamenta en l'oxidació del cromogen tetraclorur de diaminobenzidina (DAB) en presència de peròxid d'hidrogen, a través d'una reacció catalitzada per la peroxidasa. El producte d'aquesta reacció és insoluble i pot donar com a resultat un color marró o negre.

Les seccions van ser incubades en una solució de revelat formada per DAB 0,05%, H₂O₂ 0,01% en Tris-HCl 0,1 M, pH 7,6, i es va obtenir una marca de color marró. D'altra banda, per a les mostres immunolocalitzades amb l'anticòs anti-CD4, es va obtenir un color de revelat negre, tot afegint a la solució abans esmentada sulfat amònic de níquel al 0,165%. Pel que fa al revelat de la doble immunolocalització de CD3 i de CD57 es va dur a terme tot revelant primer en negre el marcador CD3 i després en marró el marcador CD57. La intensitat del revelat es va avaluar sota el microscopi, aturant la reacció mitjançant diversos rentats amb H₂O mQ.

En acabat el procés de revelat, les mostres es van contrastar amb eosina durant 7 s, en el cas de la immunolocalització de CD4 i de BCL6, o amb hematoxilina durant 25 s per a la resta de marcadors. Per afavorir el contrast, l'hematoxilina va ser virada mitjançant un flux continu d'H₂O corrent durant 10 min.

4.1.9 Deshidratació i muntatge

Per últim, les seccions es van deshidratar mitjançant una bateria d'alcohols de graduació creixent, després es rentaren en xilè i ràpidament es va procedir a muntar-les amb el medi de muntatge Eukitt.

4.1.10 Controls

Durant el procediment immunohistoquímic es van utilitzar com a controls positius seccions de gangli limfàtic reactiu i d'intestí. Els controls negatius van ser realitzats sobre mostres de teixit pulmonar que es van incubar tota la nit en solució de bloqueig, sense addicionar-hi l'anticòs primari o bé substituint l'anticòs primari per un isotip de control (Dako) apropiat.

4.1.11 Observació

Les observacions es van realitzar amb el microscopi òptic Olympus BX61 (Olympus, Tokio, Japó) i les imatges es van prendre amb una càmera digital Olympus DP70 (Olympus).

5. ESTIMACIÓ DE LES DENSITATS DE LES CÈL·LULES INFLAMATÒRIES EN PARÈNQUIMA, EN BRONQUÍOLS I EN OL3

L'estimació de la densitat dels efectors inflamatoris estudiats es va dur a terme en tres compartiments del teixit pulmonar: el parènquima, els bronquíols i els OL3. Els comptatges es van realitzar mitjançant una quadrícula de 5x5 inserida en un dels oculars del microscopi, a un augment de 100x o 400x. L'anàlisi es va fer sobre una secció de cada pacient.

5.1 Densitat cel·lular en el parènquima

El primer pas va ser mostrejar la secció de manera uniforme i a l'atzar (SURS), de tal manera que vam analitzar 12 camps o rèpliques per secció. A cada camp, es quantificaren els punts interceptats pels perfils de l'espai de referència, en aquest cas, de l'interstici alveolar. En multiplicar els punts d'interstici alveolar pel factor de superfície (superfície d'un punt de la quadrícula calculat per a un augment de 100x i de 400x), vam obtenir l'estimació dels mm² d'interstici alveolar analitzats a cada camp. Paral·lelament, es va comptar el nombre de cèl·lules marcades en la superfície delimitada per la quadrícula, tot distingint les que circulaven pels capil·lars (les quals no es van comptar) de les infiltrades en teixit. Fent el promig de tots els camps, es va obtenir el nombre de cèl·lules per mm² d'interstici alveolar de cada pacient.

Per tal de comparar la densitat limfocitària entre parènquima normal i parènquima emfisematós, es van comptar les cèl·lules marcades de tres camps de parènquima emfisematós (de 100 a 300 µm de distància de l'emfisema) i tres camps més de parènquima normal (entre 300-600 µm de distància de l'emfisema), tots ells escollits a l'atzar. Aquest comptatge es va dur a terme exclusivament sobre les mostres dels malalts d'MPOC.

5.2 Densitat cel·lular en els bronquíols i en els OL3

El recompte s'ha realitzat sobre tots els perfils de bronquíols no terminals i sobre tots els perfils d'OL3 presents a cada secció. En aquest cas, es va col·locar la retícula sobre un mínim de 6 camps aleatoris de cada perfil, determinats per coordenades a l'atzar i no solapats, o bé es van analitzar tots els camps possibles fins a cobrir tot el perfil. Les mesures del nombre de cèl·lules per unitat de superfície es van dur a terme seguint el mateix procediment que s'ha detallat a l'apartat anterior. En aquest cas, es va estimar el nombre de cèl·lules per mm^2 d'epiteli, de múscul llis i de teixit conjuntiu de la via, així com de tota la paret bronquiolar i d'OL3. El resultat per pacient es van obtenir amb el promig de tots els camps analitzats.

6. ANÀLISI ESTADÍSTICA

Totes les anàlisis estadístiques es van realitzar amb el programa Statgraphics Centurion XV (StatPoint Inc., Virginia, EUA). Les anàlisis corresponents a l'estadística descriptiva van incloure mitjanes i errors estàndards per a tots els paràmetres. Les diferències significatives entre els quatre grups pel que fa als paràmetres demogràfics i clínics van ser detectades tot aplicant una anàlisi de la variança (ANOVA). En els casos en què el test F va revelar diferències significatives, es van realitzar comparacions posteriors amb el test LSD de Fisher. D'altra banda, les diferències significatives referents als paràmetres de densitat cel·lular, els quals no van complir les assumpcions de l'ANOVA, van ser detectades mitjançant el test de Kruskal-Wallis i posteriorment es va aplicar el test U de Mann-Whitney per comparar entre grups. Les correlacions entre variables es van obtenir amb el test de rangs d'Spearman. En tots els casos el nivell de significació va ser de $p < 0,05$.

