

**UNIVERSITAT DE LES ILLES BALEARS**

**Departament de Biologia Fonamental i Ciències de la Salut**

**TESI DOCTORAL**

**PAPER DEL MACRÒFAG ALVEOLAR A LA MALALTIA  
PULMONAR OBSTRUCTIVA CRÒNICA**

**ANTÒNIA R. PONS MAS**

**2011**

# TESI DOCTORAL

## PAPER DEL MACRÒFAG ALVEOLAR A LA MALALTIA PULMONAR OBSTRUCTIVA CRÒNICA

Per optar al grau de Doctora en Ciències Mèdiques Bàsiques

**Autora: Antònia R. Pons Mas**

### Directors:

**Dra. F. Aina Noguera Bennaser**

Adjunta Servei d'Anàlisis Clíniques

Hospital Universitari Son Espases

**Dr. Jaume Sauleda Roig**

Coordinador Servei de Pneumologia

Hospital Universitari Son Espases

**Ponent: Dra. Pilar Roca Salom**

Catedràtica de Bioquímica i Biologia Molecular

Departament de Biologia Fonamental i Ciències de la Salut

Universitat Illes Balears



**Universitat de les  
Illes Balears**



## **PRESENTACIÓ**

Aquesta tesi doctoral s'estructura segons les directrius de la normativa per a la presentació de tesis doctorals de la Universitat de les Illes Balears. La tesi doctoral es centra en analitzar si les alteracions funcionals dels macròags alveolars (MA) poden tenir un paper en la patogènia de l'alteració de la resposta inflamatòria característica de la malaltia pulmonar obstructiva crònica.

Els estudis que comprenen aquesta tesi doctoral pertanyen a la mateixa línia d'investigació desenvolupada des del 2001 a la Unitat d'Investigació de l'Hospital Universitari Son Dureta sota la direcció de la Dra. Noguera i del Dr. Sauleda. Els resultats obtinguts han aportat informació rellevant que ha estat recollida en dos articles originals publicats en revistes d'àmplia difusió internacional, amb un factor d'impacte global de 7.894, dels que la doctoranda és l'autora principal. La tesi s'ha completat amb una publicació addicional prèvia a l'inici dels estudis i les beques obtingudes en relació a la mateixa.

Actualment, la present línia de treball continua en desenvolupament amb la realització d'altres estudis experimentals a la Unitat d'Investigació de l'Hospital.

## **AGRAÏMENTS**

A la Dra. Aina Noguera i al Dr. Jaume Sauleda, pel seu treball científic, orientació, supervisió i comprensió constants que han estat fonamentals per a l'elaboració d'aquesta tesi doctoral. Vull donar les gràcies especialment a n'Aina per la seva ajuda des del meu començament a l'Hospital com a resident.

Al Dr. Alvar Agustí, per la seva gran capacitat d'analitzar l'evidència científica i ensenyar a formular-se preguntes constantment, enriquint així el coneixement científic.

Als pacients que han participat voluntàriament en els estudis que componen aquesta tesi per tal de contribuir a millorar el coneixement de les bases fisiopatològiques de la seva malaltia.

A Joana i Joan.

Al meu germà.

Als meus pares.

A Toni.  
A Pere i Tomeu.

# ÍNDIX

<b>I. INTRODUCCIÓ .....</b>	<b>9</b>
<b>1. CARACTERÍSTIQUES GENERALS DE LA MALALTIA PULMONAR OBSTRUCTIVA CRÒNICA.....</b>	<b>10</b>
<b>2. MECANISMES FISIOPATOLÒGICS EN LA MPOC .....</b>	<b>12</b>
2.1. Inflamació pulmonar.....	13
2.2. Estrés Oxidatiu .....	16
2.3. Equilibri proteases- antiproteases .....	17
2.4. Remodelat .....	17
2.5. Apoptosi cel.lular .....	18
2.6. Altres factors.....	18
2.7. Inflamació sistèmica.....	18
2.8. Autoimmunitat.....	19
<b>3. EL MACRÒFAG ALVEOLAR EN LA MPOC .....</b>	<b>21</b>
3.1. Iniciació de la inflamació.....	22
3.2. Activació dels macròfags .....	22
3.3. Resolució de la inflamació .....	23
3.4. Inflamació sistèmica .....	26
<b>II. HIPÒTESIS DE TREBALL .....</b>	<b>27</b>



**III. ARTICLES PUBLICATS..... 31**

**Estudi I: “Decreased macrophage release of TGF-  $\beta$  and TIMP-1 in chronic obstructive pulmonary disease”. AR. Pons, J. Sauleda, A. Noguera, J. Pons, B. Barceló, A. Fuster, AGN Agustí. Eur Respir J. 2005; 26: 60-66. [FI: 3.947]..... 32**

**Estudi II: “Phenotypic characterization of alveolar macrophages and peripheral blood monocytes in COPD”. AR. Pons, A. Noguera, D. Blanquer, J. Sauleda, J. Pons, AGN Agustí. Eur Respir J. 2005; 25: 647-652. [FI: 3.947]..... 33**

**IV. DISCUSSIÓ..... 34**

**1. Alliberament del factor transformant del creixement  $\beta$  i de l'inhibidor tissular de la metal.loproteasa 1 pels MA en la MPOC. .... 35**

**2. Caracterització fenotípica dels MA i dels monòcits circulants en la MPOC. 40**

**V. CONCLUSIONS..... 44****VI. ABREVIATURES ..... 46**

**VII. BIBLIOGRAFIA..... 48****VI. ANNEXOS..... 59****ALTRES ARTICLES JA PUBLICATS ..... 60****BEQUES RELACIONADES AMB EL TEMA ..... 60**

**Títol del projecte: Papel del macrófago alveolar en la regulación de la susceptibilidad en la enfermedad pulmonar obstructiva crónica..... 60**

**Entitat finançadora: CICYT SAF-2001-0302..... 60**

**Títol del projecte: Papel de la respuesta inmune en la patogénesis de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica. .... 60**

**Entitat finançadora: FIS 02/986. .... 60**

**Títol del projecte: Mecanismos moleculares de la respuesta inflamatoria durante las agudizaciones de la EPOC..... 60**

**Entitat finançadora: FIS 04/2146. .... 60**

## **I. INTRODUCCIÓ**

## 1. CARACTERÍSTIQUES GENERALS DE LA MALALTIA PULMONAR OBSTRUCTIVA CRÒNICA

La malaltia pulmonar obstructiva crònica (MPOC) es, segons la Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) 2009 (1), una malaltia prevenible i tractable, que es caracteritza per una limitació al flux d'aire que no és completament reversible, és progressiva i s'associa amb una resposta inflamatòria pulmonar anòmala a partícules o gasos nocius, fonamentalment al fum del tabac. A més, pot presentar una afectació sistèmica extrapulmonar que pot contribuir a la gravetat en alguns pacients.

La MPOC suposa un problema sanitari de primer ordre degut a la seva alta prevalença, a la seva alta morbimortalitat i a l'important cost sanitari que comporta (2). A Espanya, la prevalença és del 10.2% a la població adulta d'entre 40 i 80 anys, sent més alta en homes (15.1%) que en dones (5.6%) (3). Rennard assenyala que, entre les persones molt fumadores, la prevalença pot arribar al 50% (4).

Els símptomes característics són la dispnea, la tos i l'expectoració d'evolució crònica i progressiva encara que alguns individus desenvolupen una limitació important al flux d'aire, sense presentar símptomes de tos ni d'augment de l'expectoració (1).

Les alteracions anatomopatològiques poden trobar-se a les vies aèries centrals i perifèriques, en el parènquima i en la circulació pulmonar. Existeix un procés inflamatori crònic amb augment de cèl.lules inflamatòries específiques que comporten cicles repetits de lesió i reparació de la paret de la via aèria i que produeix el remodelat estructural (5). Generalment, la inflamació i el remodelat augmenten amb la severitat de la malaltia i persisteixen al deixar de fumar (6).

La inflamació pulmonar en els pacients amb la malaltia sembla una amplificació de la resposta inflamatòria del pulmó a irritants como el fum del tabac. No

es coneix el mecanisme pel que es produeix aquesta resposta, però podria estar determinada genèticament.

A més de la inflamació, altres dos processos semblen rellevants en la patogènesi de la MPOC: l'estrés oxidatiu i el desequilibri dels enzims proteolítics i antiproteases del pulmó que afavoreixen la destrucció del parènquima amb dilatació dels espais alveolars distals. És el que s'anomena emfisema pulmonar (2).

El cessament de l'hàbit tabàquic és la mesura més efectiva per a disminuir el risc de desenvolupament de la malaltia i aturar la seva progressió (9).

Els tractaments utilitzats en la MPOC (broncodilatadors, glucocorticoides inhalats) milloren els símptomes, disminueixen les exacerbacions i milloren la qualitat de vida, però cap d'ells ha aconseguit reduir la caiguda de la funció pulmonar que es produeix al cap dels anys (10-12). L'únic tractament que ha demostrat augmentar la supervivència en pacients amb malaltia avançada és l'oxigen domiciliari durant 15 o més hores al dia (13,14). No obstant això, hi ha fàrmacs que mostren una clara tendència a disminuir la mortalitat, com el tiotropi (15) i el tractament combinat de salmeterol i fluticasona (16). En els darrers anys, fàrmacs com els antioxidants, els inhibidors de la fosfodiesterassa IV i la teofilina a baixa dosi han mostrat també la seva eficàcia (17).

Altres tractaments, que no són específics de la malaltia, com les estatines i els inhibidors de l'enzim convertidor de l'angiotensina, també han mostrat efectes beneficiosos (18, 19).

## 2. MECANISMES FISIOPATOLÒGICS EN LA MPOC

La inflamació i el remodelat són dos aspectes importants en la MPOC i són claus per a entendre la patogènesi de l'obstrucció al flux aeri característica d'aquesta malaltia (5). La inflamació es caracteritza per la presència d'un infiltrat de cèl.lules inflamatòries (macròfags, neutròfils i limfòcits) en la via aèria i en el parènquima pulmonar, que alliberen mediadors inflamatoris (radicals lliures, interleucines, proteases) que perpetuen aquesta inflamació (5). Com a conseqüència d'aquest procés crònic es produeix una resposta reparadora anòmala amb canvis en l'estructura de la via aèria i del parènquima que es coneix com a remodelat. Aquest procés és més accentuat en el cas de no existir una adequada activitat antiinflamatòria. La conseqüència final és la disminució del calibre de la via aèria amb obstrucció crònica al flux aeri (5) (Figura1).



Figura 1. Inflamació i remodelat en el parènquima i vies aèries en la MPOC.

Sharafkhaneh A *et al.* Proc Am Thor Soc. 2007; 5:475- 477.

A aquesta inflamació crònica de les vies aèries es sumen el desequilibri entre l'activitat proteolítica i antiproteolítica, i l'estrés oxidatiu. Juntament amb aquests mecanismes patogènics acceptats, s'han proposat altres que poden contribuir com la malnutrició, la inestabilitat del surfactant pulmonar, la inhibició de la histona deacetilasa i l'errada en el manteniment estructural per apoptosi cel.lular (20).

## **2.1. Inflamació pulmonar**

La resposta inflamatòria exagerada a la inhalació de partícules (majoritàriament fum del tabac), més enllà de ser una resposta protectora, és un fet característic de la MPOC que acaba produint dany en el pulmó dels fumadors susceptibles. S'ha estudiat el tipus, el lloc i el grau d'inflamació al pulmó, així com la seva relació amb la intensitat de la malaltia (21). Les cèl.lules i mediadors que hi participen són els següents:

### ***Limfòcits***

Les biòpsies bronquials de pacients amb MPOC lleu o moderada mostren més infiltració per cèl.lules inflamatòries en les vies centrals que els no fumadors i els fumadors que no desenvolupen la malaltia (22-24). S'observa un predomini de limfòcits T, especialment CD8+, i macròfags (CD68+) i es troba una correlació entre el nombre de limfòcits T, el nivell de destrucció alveolar i el grau d'obstrucció al flux aèri (24, 25). No obstant, el paper dels CD8+ en la MPOC no està del tot clar i s'ha de considerar la possibilitat que no siguin la població cel.lular més important, encara que sí la més abundant (6).

Recentment, s'ha descrit que la malaltia podria tenir un component autoimmune i es produiria com a conseqüència de l'activació de les cèl.lules T pels antigens alliberats durant el dany tissular produït pel tabac (26).

En les mostres quirúrgiques de parènquima pulmonar, la progressió de la malaltia està associada a un major remodelat en les parets bronquials i a una acumulació d'exsudats inflamatoris en la llum de les petites vies. El perfil cel·lular està compost per neutròfils, macròfags i limfòcits T CD8+ i CD4+, amb una gran quantitat de limfòcits B i folicles limfoides peribronquials (21).

Els limfòcits T poden causar dany tissular per activitat citolítica directa o a través de citocines proinflamatòries. Els limfòcits CD8+ secreten un perfil de citocines Th1 i mediadors citotòxics com granzimes i perforines que augmenten l'expressió de Fas (25, 27). La granzima B i les perforines indueixen l'apoptosi de pneumòcits tipus I, contribuint així al desenvolupament de l'emfisema. Alguns estudis demostren la correlació existent entre els nivells d'infiltració de limfòcits T i l'apoptosi present en teixits emfisematosos (22, 28). Els limfòcits CD4+ participen en la resposta immune alliberant citocines i amplificant la resposta d'altres cèl·lules immunes efectores.

### ***Neutròfils***

Els neutròfils es troben augmentats en l'esput i en la rentada broncoalveolar dels pacients amb MPOC. El seu nombre, tant en l'esput induït com en les biòpsies bronquials, es relaciona amb la gravetat de la MPOC (29) així com amb la rapidesa de la pèrdua de la funció pulmonar (30). A més, es coneix que els neutròfils són una potent font de mediadors inflamatoris tals com espècies reactives d'oxigen, mediadors lipídics amb activitat quemoatracent i proteases tissulars (31).

No obstant això, el paper dels neutròfils a la patogènia de la MPOC no està del tot clar (32). El fum del tabac produeix un augment dels leucòcits circulants i un segrest dels mateixos als microcapilars pulmonars a on és possible que siguin activats per alliberar espècies reactives d'oxigen i proteases, que poden tenir un efecte tòxic directe (32). Les proteases secretades, que inclouen l'elastasa dels neutròfils, la



catepsina G, la proteasa 3, així com les metal·loproteases MMP-8 i MMP-9, poden contribuir a la destrucció alveolar i són potents estimuladors de la secreció de moc (32).

### ***Macròfags***

El nombre de macròfags és fins a 10 vegades superior en les vies aèries, en el parènquima pulmonar i en la rentada broncoalveolar dels pacients amb MPOC (32). Els pulmons dels fumadors sense MPOC també mostren major nombre de macròfags, encara que menys activats (33, 34). Donat que és el nucli central de la present tesi, aquest apartat es desenvolupa al detall més endavant.

En resum, la majoria de les cèl·lules del sistema immune estan implicades en aquest procés inflamatori: (a) Cèl·lules Fagocítiques, macròfags i neutròfils, que produeixen gran quantitat de mediadors inflamatoris i (b) Limfòcits T, que actuen com a cèl·lules efectores i reguladores de la resposta immune.

### ***Citocines***

Les citocines juguen un paper fonamental en el desenvolupament de la inflamació ja que participen en la captació i activació cel·lular i promouen la supervivència de múltiples cèl·lules inflamatòries. Les citocines inclouen: (a) Limfocines, secretades per limfòcits T i que regulen la resposta immune, (b) Citocines proinflamatòries (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8), que amplifiquen i perpetuen el procés inflamatori, (c) Factors de creixement, que promouen la supervivència cel·lular i participen en els canvis estructurals de la via aèria (GM-CSF, TGF- $\beta$ , EGF, VEGF), (d) Quimiocines, atrauen cèl·lules inflamatòries (MIP- $\alpha$ , MIP- $\beta$ 1, MCP-1) i (e) Citocines antiinflamatòries, que modulen la resposta inflamatòria de manera negativa (IL-10 i TGF- $\beta$ ) (35).

### ***Mediadors proinflamatoris lipídics***

Durant la resposta inflamatòria, algunes cèl·lules participants alliberen leucotriè B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) que actua com a mediador quemoatraient dels neutròfils i també com a activador dels mateixos i, en menor grau, dels eosinòfils.

S'ha descrit que la concentració de LTB<sub>4</sub> està elevada en l'aire expirat (36), en l'esput induït (36) i en el sèrum (37) dels pacients amb MPOC. La concentració observada en l'esput dels pacients amb MPOC es correlaciona amb el nombre de neutròfils trobats (38, 39).

La concentració de LTB<sub>4</sub> en el sèrum dels pacients amb MPOC està més augmentada que en el de pacients amb asma o en el de controls i, l'administració de corticoesteroides, no està associada a la seva disminució, per la qual cosa els efectes beneficiosos dels corticoesteroides en els processos obstructius de las vies aèries no pareixen estar mediat pel LTB<sub>4</sub> (37, 40).

## **2.2. Estrés Oxidatiu**

Les accions que poden derivar-se de l'estrés oxidatiu inclouen la inactivació de les antiproteases (com l' $\alpha_1$ -antitripsina i l'inhibidor de les leucoproteases (SLPI)) (41) o l'activació de les metal·loproteases (42). Els oxidants també poden danyar directament els components de la matriu pulmonar (elastina i col·lagen) (43) i interferir en la síntesi i reparació de l'elastina (44). Tot això pot lesionar el pulmó amb destrucció del mateix i aparició d'emfisema.

### 2.3. Equilibri proteases- antiproteases

El desequilibri entre l'activitat de les proteases i antiproteases és una de les hipòtesis dominants en la patogènesi de la MPOC. Aquest equilibri és necessari per aconseguir un òptim manteniment de l'estructura pulmonar (20). Les alteracions del mateix originen un increment de la destrucció tissular o una reparació anòmala que origina l'emfisema. Els enzims proteolítics, com les serinproteases (fonamentalment l'elastasa del neutròfil) i les metal.loproteases (MMPs), són famílies d'enzims que degraden proteïnes de la matriu extracel.lular i la seva activitat és neutralitzada per uns altres enzims, l' $\alpha_1$ -antitripsina (45-47) i els inhibidors tissulars de les metal.loproteases (TIMPs) (46, 47), respectivament. El dèficit d'aquests enzims pot ocasionar emfisema pulmonar.

A més de la destrucció de la matriu, els fragments d'elastina generats per les proteases exerceixen un efecte quimiotàctic sobre els monòcits incrementant la inflamació i creant un "feed-back" positiu que resulta en una destrucció contínua del parènquima pulmonar (48-50).

### 2.4. Remodelat

La reparació tissular consisteix en els mecanismes que el pulmó posa en marxa per a reduir el dany tissular i perquè les cèl.lules lesionades o mortes es multipliquin de manera suficient per a recuperar la seva integritat (51). De totes maneres, quan es produeix una reparació anòmala, com per exemple després de la inflamació crònica, es parla de remodelat. A la MPOC, el remodelat s'aprecia fonamentalment en la via aèria amb fibrosi de la paret bronquial i hipertrofia del múscul llis, la qual cosa agreuja l'obstrucció al flux aèri (52).

## 2.5. Apoptosi cel.lular

Com a conseqüència de la inflamació i de l'estrés oxidatiu pot produir-se apoptosi. Els estudis en animals d'experimentació i en humans han demostrat un increment de l'apoptosi de cèl.lules estructurals de pacients amb MPOC en comparació amb fumadors i sans (53). L'errada en el manteniment de l'estructura alveolar pel desequilibri entre l'apoptosi i la substitució de les cèl.lules estructurals (endotelials, epitelials i fibroblastes) pot ser causa de desenvolupament d'emfisema. L'emfisema pot resultar d'un increment de la mort de les cèl.lules de la paret alveolar i/ o una proliferació ineficient de l'epiteli i de l'endoteli alveolar (20, 54).

## 2.6. Altres factors

Alguns estudis suggereixen que la malnutrició pot contribuir a l'aparició d'emfisema: la restricció calòrica pot desenvolupar un emfisema i pèrdua de cèl.lules alveolars que pot ser reversible si s'augmenta la ingesta. També assenyalen que l'emfisema originat a partir d'un estímul intern (restricció calòrica) és reversible mentre que el degut a l'exposició a agents externs no ho és (55).

Altres estudis assenyalen que el surfactant juga un paper important en el manteniment de l'estructura alveolar al augmentar la seva plasticitat. Ito *et al* (56) han demostrat que alteracions epigenètiques com les de l'acetilació de les histones poden tenir un paper en la patogènia de la malaltia.

## 2.7. Inflamació sistèmica

Les evidències recents suggereixen que la MPOC és una malaltia complexa que a més de l'obstrucció al flux aèri comporta conseqüències extrapulmonars relacionades amb la inflamació sistèmica (57). El procés inflamatori generat i amplificat

implica l'alliberament a la circulació sistèmica de mediadors inflamatoris que poden determinar l'existència de manifestacions extrapulmonars, tals com la pèrdua de massa muscular i la caquèxia. La inflamació sistèmica pot iniciar o complicar altres patologies com la patologia cardiovascular, l'osteoporosi, l'anèmia normocítica, el càncer de pulmó, la depressió i la diabetis (58). Aquesta inflamació té relevància clínica ja que està relacionada amb la disminució de la funció pulmonar, està augmentada durant les exacerbacions (58) i és un marcador pronòstic (59).

## 2.8. Autoimmunitat

La possibilitat de la existència d'un component autoimmune en la patogènia de la MPOC va ser formulada per Agustí *et al* (60) el 2003. En els darrers anys, s'han establert els mecanismes que tenen lloc en les diferents etapes que condueixen a la MPOC (26): (a) resposta immune innata al fum del tabac, que es basa en el reconeixement del dany tissular per les cèl·lules epitelials, macròfags i neutròfils, (b) activació i proliferació de cèl·lules T i (c) reacció immune adaptativa conduïda pels limfòcits CD8+ i les cèl·lules B, amb la formació de fòlicles limfoides. Aquesta darrera etapa contribueix a la persistència de la resposta inflamatòria anys després del cessament de l'hàbit tabàquic, com a resposta als autoantígens originats al llarg de tot aquest procés.

D'altra banda, les conseqüències de la falta de retirada de les cèl·lules apoptòtiques també contribueix a que continuï l'estat inflamatori i, per tant, al risc de desenvolupament de la resposta autoimmunitària (61).

Recentment, s'han publicat dades tals com l'existència d'anticossos circulants contra el component principal de la matriu pulmonar, l'elastina (62), contra l'epiteli pulmonar (63), la descripció d'un model animal d'emfisema autoimmune (64) i l'augment dels títols d'anticossos antinuclears i antiteixit circulants en els malalts amb

MPOC (fet relacionat amb la disminució de la funció pulmonar) (65), que indiquen que l'autoimmunitat juga un paper dins aquesta resposta inflamatòria. No obstant això, són necessaris més estudis encaminats a demostrar la relació de causalitat entre l'autoimmunitat i el desenvolupament de la MPOC.

### 3. EL MACRÒFAG ALVEOLAR EN LA MPOC

La importància del macròfag alveolar en la patogènesi de la MPOC es basa en diverses evidències:

(a) El nombre de macròfags és fins a 10 vegades major en les vies aèries, parènquima pulmonar i rentada broncoalveolar dels pacients amb MPOC (32) i es correlaciona amb la severitat de la mateixa (66-68).

(b) El macròfag constitueix la primera línia de defensa de la via aèria davant els agents nocius i, a causa de les seves múltiples funcions, està involucrat en la majoria de processos patològics que es desenvolupen a les vies aèries (2, 69, 70).

(c) Els macròfags, que s'originen en els teixits a partir dels monòcits procedents del moll de l'os (69), són el principal component del sistema mononuclear fagocític i juguen un paper crític en la iniciació, manteniment i resolució de la inflamació (71).

Per al desenvolupament d'aquestes funcions, els MA tenen l'habilitat de canviar les seves propietats funcionals en resposta a estímuls exògens o a processos patològics en el parènquima pulmonar (72, 73). Alguns dels marcadors associats amb la defensa de l'hoste i amb la inflamació actuen com a marcadors de l'activació funcional dels macròfags i poden ser modificats per diferents senyals inflamatòries que es produeixen a diversos processos pulmonars (72-76). Alguns exemples d'aquests receptors són: (a) receptors implicats en la fagocitosi (CD44, CD36, CD51, CD61 i CD14), (b) receptors relacionats amb la capacitat de presentació de l'antígen (HLA-DR), (c) algunes molècules coestimuladores (CD80, CD86 i CD40) o (d) el receptor del complement tipus 3 (CD11b).

Els macròfags poden intervenir en la patogènia de la MPOC en diferents aspectes:

### 3.1. Iniciació de la inflamació

La inflamació s'inicia amb un canvi en el perfil de les molècules d'adhesió local i es crea un gradient quimiotàctic que comporta el segrest de cèl.lules des de la circulació sistèmica (71). Els polimorfonuclears són les primeres cèl.lules que sofreixen extravasació i arriben al lloc de la inflamació. Les cèl.lules mononuclears fagocítiques (monòcits/ macròfags) i els limfòcits, són també captades per a participar en el procés. Els macròfags participen en la producció, movilització, activació i regulació de les cèl.lules efectores inflamatòries/ immunes (71).

### 3.2. Activació dels macròfags

El fum del tabac activa als macròfags i aquests alliberen mediadors inflamatoris com citocines proinflamatòries (TNF- $\alpha$ , IL-8, la proteïna quimiotàctica dels monòcits-1 (MCP-1)), el leucotriè B<sub>4</sub>, espècies reactives d'oxígen, així com proteases tals com MMP-2, MMP-9, MMP-12 i catepsines K, L i S (32).

Els pacients amb emfisema presenten una major concentració en la rentada broncoalveolar i una major expressió en MA de MMP-1 (Col.lagenasa) i MMP-9 (Gelatinasa B) (77, 78). També s'ha observat un increment de l'activitat de MMP-9 (79, 80) i MMP-2 (81) en el parènquima pulmonar de pacients amb emfisema. L'interés per les MMPs s'ha vist incrementat després de la demostració de que la delecció en el gen que codifica la MMP-12 (Macròfag metal.loelastasa) prevé el desenvolupament de l'emfisema després de l'exposició al fum de tabac en el ratolí transgènic (82). Les metal.loproteases tenen tres enzims que inhibeixen el seu efecte: són els anomenats



inhibidors tissulars de les metal·loproteases (TIMP-1, TIMP-2 i TIMP-3) (83). En els fumadors que desenvolupen la MPOC, la producció d'antiproteases pot ser inadequada per a neutralitzar els efectes de les múltiples proteases, probablement a causa de polimorfismes genètics que alteren la funció o la quantitat d'aquests enzims (84).

### 3.3. Resolució de la inflamació

La resolució de la resposta inflamatòria o catabasi no és un procés passiu que es doni en aturar-se l'estímul que el va produir, és a dir, quan es produeix l'abandonament de l'hàbit tabàquic. Es tracta d'un procés complex i altament regulat que precisa de l'actuació coordinada de diversos mecanismes (85-87).

#### ***Eferocitosi***

L'eferocitosi consisteix en l'eliminació de les cèl·lules apoptòtiques per les cèl·lules fagocítiques, fonamentalment macròfags. La fagocitosi de les cèl·lules apoptòtiques (normalment neutròfils) per part dels macròfags és un procés antiinflamatori clau (87). El seu normal funcionament evita la necrosi secundària de les cèl·lules apoptòtiques no fagocitades (amb el consegüent alliberament del contingut intracel·lular proinflamatori) i contribueix a la secreció per part del macròfag fagocitador de diversos mediadors antiinflamatoris (PPAR, IL-10, TGF- $\beta$ , VEGF, HGF). Perquè el procés d'eferocitosi sigui efectiu, tant la cèl·lula apoptòtica com el macròfag han d'expressar a la seva superfície una sèrie de senyals específics. En la cèl·lula apoptòtica l'expressió de fosfatidilserina (PS) constitueix un senyal molt específic ("Eat-me signal") (87). En el macròfag, els receptors scavengers millor caracteritzats són el propi receptor de PS i els receptors CD36, CD14 i CD44 (87).

### ***Aclariment de l'àcid hialurònic***

L'àcid hialurònic (AH) és un glucosaminoglicà que forma part de la matriu extracel·lular. En la seva forma nativa existeix com a polímer d'elevat pes molecular però durant el procés inflamatori s'acumula en fragments de baix pes molecular. Aquests fragments són importants pel manteniment de la resposta inflamatòria perquè: (a) indueixen l'expressió de quimiocines (MIP- $\alpha$ , MIP- $\beta$ 1, MCP-1) (88) als MA, (b) indueixen l'expressió de citocines (IL-8, IL-10) a les cèl·lules epitelials bronquials (89) i (c) poden actuar com a senyal d'alarma endogen ("danger signals") promovent respostes antígen específiques en els limfòcits T mitjançant receptors Toll-like (TLR) (90).

El CD44 és el principal receptor per a l'AH i juga un paper clau en l'aclariment d'aquests fragments de baix pes molecular (88). En els models animals, el dèficit de CD44 provoca una inflamació pulmonar persistent caracteritzada pel dèficit de l'eferocitosi dels neutròfils apoptòtics, l'acumulació progressiva de fragments d'AH i el dèficit en l'activació de TGF- $\beta$  (91).

### ***Mecanismes antiinflamatoris***

Els Peroxisome Proliferator Activated Receptors (PPARs) constitueixen una família de factors de transcripció nuclear que regulen la resposta inflamatòria antagonitzant les vies de senyalització proinflamatòries (NF- $\kappa$ B i AP-1) inhibint l'expressió de gens proinflamatoris (citocines, metal·loproteases i reactants de fase aguda) en diferents tipus cel·lulars (92, 93). Els PPARs s'expressen al teixit pulmonar, als MA i a les cèl·lules epitelials, endotelials i musculars (94).

D'altra banda, el procés normal d'eferocitosi estimula la producció per part del macròfag que ha fagocitat la cèl·lula apoptòtica de diversos factors de creixement

(VEFG, HGF i TGF- $\beta$ ) que actuen com a mediadors antiinflamatoris i indueixen reparació tissular (95, 96).

El TGF- $\beta$  és un potent estimulador de la proliferació de cèl·lules mesenquimals que és essencial en la reparació tissular. El TGF- $\beta$  suprimeix la producció de col·lagenases, incrementa la deposició de col·lagen i disminueix l'activitat de les metal·loproteases (MMPs), induint la producció dels inhibidors tissulars de les metal·loproteases (TIMPs) (71).

Lee (97) descriu que el ratolí transgènic IL-13 desenvolupa una remodelació de la via aèria dependent de l'activació de la MMP-9 pel TGF- $\beta$  i fibrosi. Morris *et al* (98) descriuen que els ratolins que no són capaços d'activar el TGF- $\beta$ , desenvolupen inflamació i emfisema dependent de la MMP-12. És a dir, la regulació del TGF- $\beta$  és crucial: l'ausència total de TGF- $\beta$  allibera el fre damunt de la inflamació i destrucció tissular a l'espai aèri, mentre que massa TGF- $\beta$  origina fibrosi de les vies aèries (99).

S'han identificat tres isoformes del TGF- $\beta$  (TGF- $\beta_1$ , TGF- $\beta_2$ , TGF- $\beta_3$ ), la majoria implicades en l'afectació de les vies aèries, encara que per motius metodològics la isoforma més estudiada és la TGF- $\beta_1$ .

La primera descripció de l'associació d'un polimorfisme del gen del TGF- $\beta_1$  amb un augment de la susceptibilitat per al desenvolupament de la MPOC es va realitzar el 2004 (100). S'han descrit diversos polimorfismes d'un nucleòtid del gen que codifica per al TGF- $\beta_1$ , encara que no tots els treballs troben el mateix grau de significació i s'han realitzat en poblacions diferents, per la qual cosa fan falta més estudis sobre aquest tema (101).

### ***Mediadors lipídics específics***

Les lipoxines, protectines i resolvines són mediadors lipídics amb propietats antiinflamatòries i prorresolutives de la inflamació de molt recent identificació (86). Les lipoxines bloquejen el reclutament dels neutròfils al focus inflamatori i estimulen l'eferocitosi (102). Les protectines i resolvines col·laboren amb les lipoxines com a molècules senyalitzadores de la catabasi (86). Les alteracions en aquests mediadors poden interferir en la resolució de la inflamació. No s'han estudiat a la MPOC però en pacients amb asma persistent, s'ha observat una disminució dels nivells de lipoxina (103) i protectina D1 (104).

### **3.4. Inflamació sistèmica**

L'activació dels MA pot causar alteracions en la microcirculació sistèmica (105). S'ha descrit, en animals d'experimentació i en cultius primaris, que els MA activats per la hipòxia alliberen mediadors a la circulació sistèmica que activen els mastòcits perivasculars i desencadenen una extensa inflamació sistèmica. La cascada inflamatòria inclou l'activació local del sistema renina-angiotensina i produeix un increment de les interaccions leucòcits-endoteli en les vècules postcapilars, incrementa els nivells microvasculars d'espècies reactives d'oxígen i produeix extravasació d'albumina. Es precisen més estudis que intentin corroborar aquestes afirmacions.

## **II. HIPÒTESIS DE TREBALL**

Els MA dels pacients amb MPOC presenten una alteració de la seva funció en la resposta inflamatòria que pot contribuir a disminuir la seva capacitat antiinflamatòria i antiastolítica.

Per a abordar aquesta hipòtesi general, s'han dissenyat dos estudis que tracten aspectes específics de la mateixa, tal com es discuteix a continuació.

## **Estudi I: Alliberament del factor transformant del creixement $\beta$ i de l'inhibidor tissular de la metal·loproteasa 1 pels MA en la MPOC.**

### **Hipòtesi:**

Els MA dels pacients amb MPOC poden alliberar més mediadors proinflamatoris i/o menys mediadors antiinflamatoris que els dels fumadors amb funció pulmonar normal i que els dels no fumadors, el que explicaria la disminució de la seva capacitat antiinflamatòria i antielastolítica que contribueix a la patogènesi de la malaltia.

### **Objectiu:**

Estudiar l'alliberament pels MA cultivats de pacients amb MPOC, fumadors i no fumadors amb funció pulmonar normal de:

1. Espècies reactives d'oxígen
2. Mediator proinflamatori leucotriè B<sub>4</sub>
3. Mediadors antiinflamatoris: TGF- $\beta$  i TIMP-1

## **Estudi II: Caracterització fenotípica dels MA i dels monòcits circulants en la MPOC.**

### **Hipòtesi:**

Els MA dels pacients amb MPOC poden presentar alguns canvis en l'expressió dels receptors de membrana que poden tenir implicacions en la resolució de la inflamació pulmonar.

### **Objectiu:**

Estudiar en els MA i en els monòcits circulants de pacients amb MPOC, fumadors i no fumadors amb funció pulmonar normal, l'expressió dels següents receptors de membrana:

1. Receptors implicats en la fagocitosi: CD44, CD36, CD51, CD61 i CD14
2. Receptor relacionat amb la capacitat presentació de l'antígen: HLA-DR
3. Molècules coestimuladores: CD80, CD86 i CD40
4. Receptor del complement tipus 3: CD11b



### **III. ARTICLES PUBLICATS**

**Estudi I: “Decreased macrophage release of TGF-  $\beta$  and TIMP-1 in chronic obstructive pulmonary disease”.** AR. Pons, J. Sauleda, A. Noguera, J. Pons, B. Barceló, A. Fuster, AGN Agustí. Eur Respir J. 2005; 26: 60-66. [FI: 3.947].

**Estudi II: “Phenotypic characterization of alveolar macrophages and peripheral blood monocytes in COPD”.** AR. Pons, A. Noguera, D. Blanquer, J. Sauleda, J. Pons, AGN Agustí. Eur Respir J. 2005; 25: 647-652. [F1: 3.947].

## **IV. DISCUSSIÓ**

En conjunt, els resultats d'aquesta tesi doctoral contribueixen a un millor coneixement de la funció dels MA a la malaltia pulmonar obstructiva crònica.

## **1. Alliberament del factor transformant del creixement $\beta$ i de l'inhibidor tissular de la metal·loproteasa 1 pels MA en la MPOC.**

En aquest estudi, s'investiga la capacitat dels MA de secretar tant molècules pro (LTB<sub>4</sub>, ROI) com antiinflamatòries (TGF- $\beta$ <sub>1</sub>, TIMP-1) en pacients amb MPOC. La resposta inflamatòria excessiva i persistent en els fumadors pot ser deguda o bé a un augment de la resposta inflamatòria al fum del tabac i/o a una errada en la detenció de l'activitat inflamatòria després del cessament de l'estímul (60). Les troballes assenyalen que, els MA d'aquests pacients, alliberen quantitats similars de LTB<sub>4</sub> i ROI que els de fumadors amb funció pulmonar normal i els dels no fumadors. Al contrari, l'alliberament de TGF- $\beta$ <sub>1</sub> i TIMP-1 pels MA està marcadament disminuït en els pacients amb MPOC.

Estudis previs han aportat que el LTB<sub>4</sub> està augmentat en l'aire exhalat (36), en l'esput induït (36) i en el sèrum (37) dels pacients amb MPOC però no s'ha estudiat l'alliberament de LTB<sub>4</sub> pels MA d'aquests pacients. El resultat del nostre estudi és similar al demostrat per Spencer *et al* (106) en pacients amb dèficit d' $\alpha$ <sub>1</sub>-antitripsina, suggerint que la principal font de LTB<sub>4</sub> en els pacients amb MPOC és un altre tipus cel·lular, possiblement el neutròfil (107). Això no és incompatible amb que els MA siguin els principals productors d'altres mediadors inflamatoris en la MPOC (108).

També està acceptat que l'estrés oxidatiu és un important factor que contribueix a la patogènesi de la MPOC (109) i que els MA produeixen ROI (69). Els resultats del present estudi recolzen l'observació feta per McLeod *et al* (110) de que no es detecten diferències significatives en l'alliberament de l'anió superòxid per part dels MA cultivats de fumadors amb o sense MPOC. Tot això suggereix un paper marginal dels MA en la patogènesi de l'estrés oxidatiu que caracteritza a la MPOC.

Respecte al TGF- $\beta_1$ , s'observa que els MA dels pacients amb MPOC alliberen una concentració significativament menor en resposta al lipopolisacàrid (LPS) que els de fumadors amb funció pulmonar normal i que els de no fumadors (Figura 2).

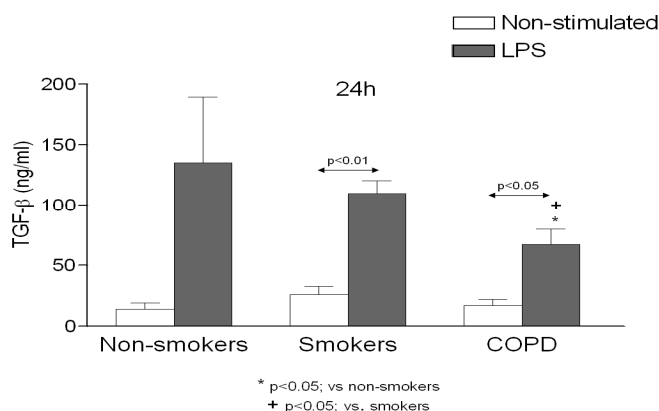


Figura 2. Alliberament de TGF- $\beta_1$  a les 24h, amb i sense estimulació amb LPS.

En estudis anteriors s'ha descrit un augment en l'expressió de TGF- $\beta_1$  a l'epiteli de la via aèria de pacients amb bronquitis crònica o MPOC (111, 112) però no s'ha estudiat el seu alliberament per part dels MA. Les diferències entre els resultats del present estudi i els d'altres previs poden ser degudes a les diferents línies

cel·lulars estudiades i a les tècniques utilitzades. L'increment de l'expressió de TGF- $\beta_1$  a l'epiteli pot reflectir la importància d'aquesta citocina en la remodelat de la via aèria a la MPOC (113). D'altra banda, la disminució de l'alliberament de TGF- $\beta_1$  per part dels MA pot orientar a una deficiència de capacitat antiinflamatòria/reparadora d'aquestes cèl·lules en pacients amb MPOC. El comportament diferent en l'epiteli aeri i en els MA de pacients amb MPOC també ha estat descrit per a altres citocines (114).

És interessant assenyalar que s'ha trobat la presència del polimorfisme del gen del TGF- $\beta_1$  (que comporta una disminució del mateix) entre els pacients amb MPOC (100). Aquesta observació està d'acord amb la troballa que reflexa una reducció de l'alliberament de TGF- $\beta_1$  pels MA dels pacients amb MPOC.

Igualment s'ha observat que els MA dels pacients amb MPOC alliberen menys TIMP-1 que els dels fumadors amb funció pulmonar normal o els de no fumadors (Figures 3 i 4).

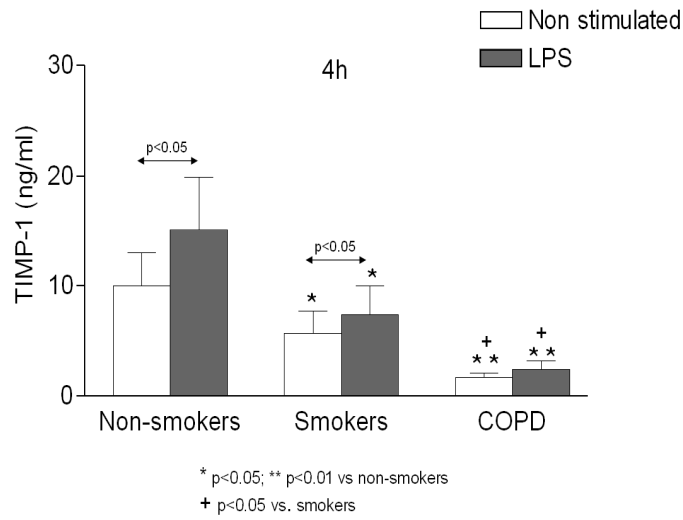


Figura 3. Alliberament de TIMP-1 a les 4h, amb i sense estimulació amb LPS.

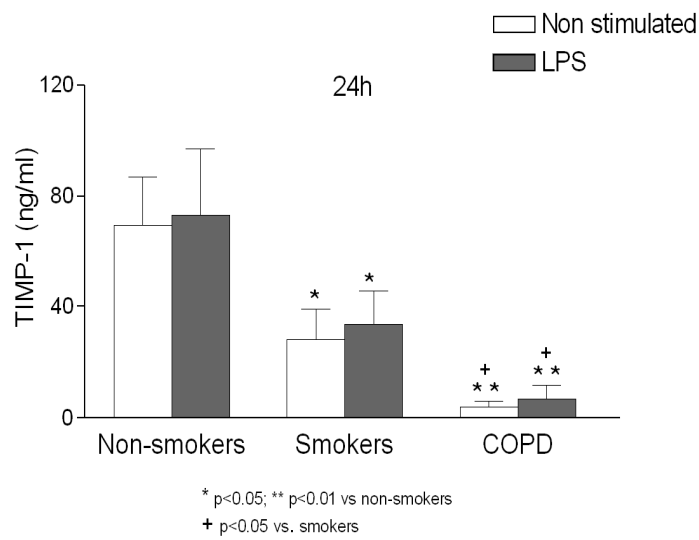


Figura 4. Alliberament de TIMP-1 a les 24h, amb i sense estimulació amb LPS.



Donat que el TGF- $\beta_1$  estimula l'alliberament de TIMP-1 (115), pot especular-se que l'alliberament més baix de TIMP-1 observat en la MPOC pot ser degut a la disminució de TGF- $\beta_1$  comentada anteriorment. En qualsevol cas, donat que el TIMP-1 és una important molècula antielastolítica (67), l'alliberament disminuït en pacients amb MPOC pot contribuir al desenvolupament de l'emfisema. Els resultats del present estudi contrasten amb els de Russell *et al* (67) que no troba diferències en l'alliberament de TIMP-1 pels MA entre els pacients amb MPOC i fumadors amb funció pulmonar normal. Això pot ser degut a aspectes metodològics, ja que els autors del present estudi han controlat els efectes aguts del tabac (evaluant els nivells de CO a aire exhalat) que poden originar estrès oxidatiu que pot disminuir l'activitat del TIMP-1 (116) o bé a una desigual distribució dels fumadors actius entre els individus que pot enmascarar potencials diferències entre els grups. El fet de que s'exclouï als pacients que presentin una infecció bronquial, que augmenta la inflamació pulmonar (117), també pot explicar les diferències amb altres estudis (67, 77).

Els resultats obtinguts indiquen que els MA dels pacients amb MPOC presenten una disminució de l'alliberament de molècules antiinflamatòries i antielastolítiques i no de les proinflamatòries estudiades. Les potencials implicacions d'aquesta observació en la patogènia o tractament de la MPOC s'han d'encaminar a considerar la possibilitat de que el dany tissular a la MPOC no sigui només degut a la existència d'un procés inflamatori sinó també a una alteració en els mecanismes de reparació d'aquest dany o d'una errada en el fre de la inflamació.

## 2. Caracterització fenotípica dels MA i dels monòcits circulants en la MPOC.

Els resultats de l'estudi anterior recolzen la idea de que els MA tenen un paper important en el desenvolupament de la MPOC. Junt amb això, es coneix que els MA tenen l'habilitat de canviar les seves propietats funcionals en resposta a estímuls exògens i/o en processos patològics al pulmó (72, 73) però no s'ha estudiat el fenotipus de superfície dels MA en la MPOC. En aquest treball s'ha estudiat el fenotipus de superfície dels MA i dels monòcits circulants (PBM) en els tres grups d'individus considerats a l'estudi anterior. El fet d'estudiar el fenotipus dels PBM permetrà explicar si les potencials diferències en el fenotipus de superfície dels MA poden estar ja determinades en la circulació sistèmica i diferenciar, així, si aquestes diferències són degudes als possibles efectes del microambient pulmonar o a un "background" genètic diferent.

Els resultats assenyalen que l'expressió en la superfície de la majoria dels receptors estudiats és similar en els tres grups estudiats, tant en els MA com en els PBM, encara que hi ha algunes notables excepcions. En primer lloc, l'expressió de l'HLA-DR i CD80 en els MA està disminuïda en els pacients amb MPOC (Figura 5) i, en segon, hi ha una subpoblació d'MA que expressen CD44 low<sup>+</sup> que està augmentada en aquests pacients (Figura 6).

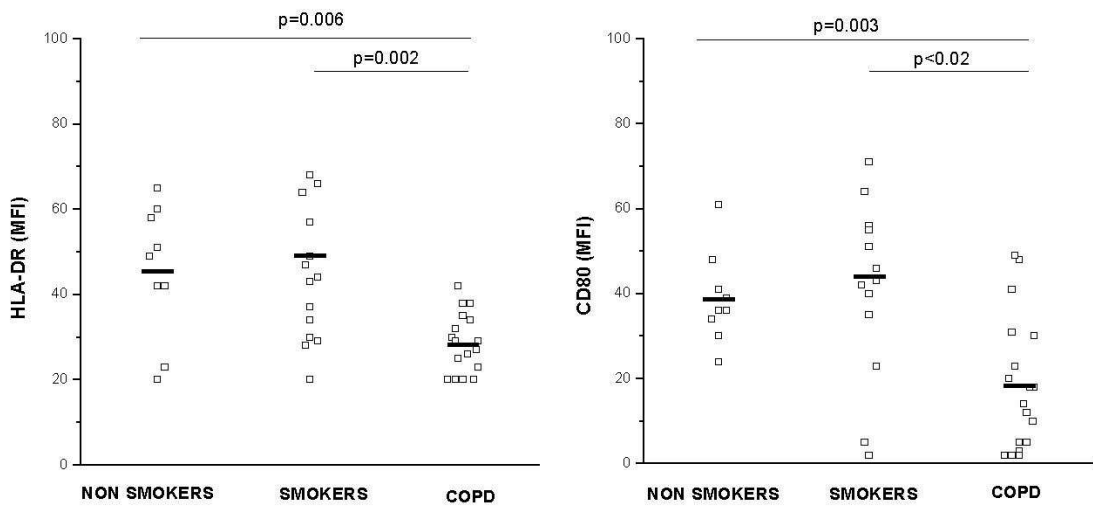


Figura 5. Expressió dels receptors de superfície HLA-DR i CD80 en els MA.

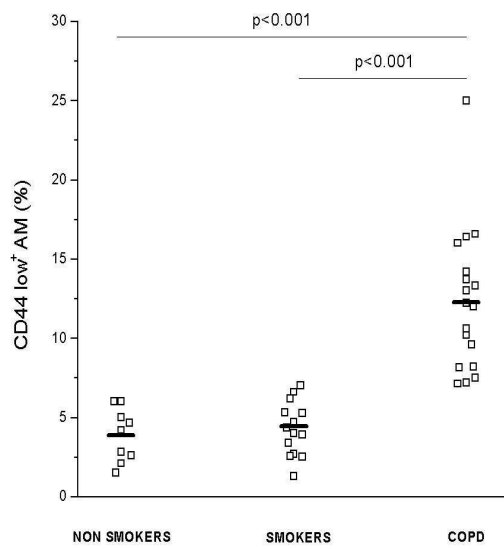


Figura 6. % de MA que expressen nivells baixos de CD44 (CD44 low<sup>+</sup>).

Es sabut que els MA funcionen com a cèl.lules presentadores de l'antigen dirigint l'activació dels diferents subtipus de limfòcits. És l'antigen HLA-DR el que regula la presentació d'aquests antigens pels MA i la seva expressió està estretament relacionada amb el seu estat d'activació (76). D'aquesta manera, una expressió reduïda de l'HLA-DR damunt dels MA està lligada a un estat d'hipoactivació (118) i pot promoure immunotolerància (119, 120). A més, el CD80 juga un paper important en proporcionar els senyals coestimuladoris necessaris pel desenvolupament de les respostes immunes antigen específiques (121). Així, la expressió reduïda de l'HLA-DR i CD80 trobada en els pacients amb MPOC suggereix que la funció immune mediada per cèl.lules pot ser anormal en aquests pacients. Això pot afavorir la colonització bronquial a través de la interferència en el reconeixement del complex amb l'antigen a la superfície dels MA pels limfòcits helper CD4+ (122). El fet que l'expressió de l'HLA-DR i CD80 als monòcits circulants sigui similar en els tres grups estudiats suggereix que les diferències observades en el fenotipus dels MA succeeix en resposta a canvis en l'entorn pulmonar i descarta la possibilitat d'un "background" genètic diferent en aquests pacients.

El CD44 és un receptor transmembrana que és el major receptor de superfície per a l'àcid hialurònic (123) i juga un paper fonamental en l'aclariment de l'AH que s'ha acumulat als llocs de la inflamació i que provoca dany tissular, ja que té funcions proinflamatòries (88). En el pulmó normal, el macròfag alveolar és la cèl.lula coneguda més important que internalitza l'HA per a la seva degradació i el CD44 participa en aquest procés (124). A més, la unió del CD44 a la superfície dels MA promou la ingesta selectiva de neutròfils apoptòtics in vitro (125). Per tot això, el CD44 juga un paper fonamental en la resolució de la inflamació (91).

Aquest estudi troba que el percentatge d'MA que expressen CD44<sup>low</sup> és superior en els malalts amb MPOC que en els fumadors amb funció pulmonar normal i que en els no fumadors. Això pot determinar una disminució en la capacitat de captació de l'àcid hialurònic (124) i, a més, una limitació en l'habilitat dels MA dels pacients amb MPOC en retirar els neutròfils apoptòtics (91, 125, 126) que pot contribuir a la inflamació pulmonar. Donat que el present estudi és transversal no es pot establir si aquestes alteracions estan relacionades amb la patogènia de la malaltia o són una conseqüència.

En resum, aquest estudi demostra que els MA dels malalts amb MPOC exhibeixen un fenotipus de superfície caracteritzat per l'expressió reduïda de l'antígen de presentació HLA-DR i del CD80 i del receptor CD44 relacionat amb la finalització de la resposta inflamatòria. Aquestes observacions donen importància al fet que les alteracions descrites contribueixen a la resposta inflamatòria anormal que caracteritza la MPOC.

## **V. CONCLUSIONS**

Els macròfags alveolars en la malaltia pulmonar obstructiva crònica presenten alteracions funcionals que poden ser determinants en el desenvolupament i progressió de la malaltia ja que:

1. Alliberen significativament menys TGF- $\beta_1$  i TIMP-1 que els de fumadors amb funció pulmonar normal i els de no fumadors el que suggereix un menor estat antiinflamatori i antiproteolític.
2. Expressen un fenotipus específic caracteritzat per una expressió reduïda de dos receptors implicats en la presentació de l'antígen i del receptor CD44 implicat en la resolució de la inflamació pulmonar.

## **VI. ABREVIATURES**



**AH:** àcid hialurònic

**AP-1:** proteïna activada 1

**EGF:** factor de creixement epitelial

**GM- CSF:** factor estimulant de colònies granulo-monocítiques

**GOLD:** iniciativa global per a la malaltia pulmonar obstructiva crònica

**HGF:** factor de creixement hepàtic

**IL-6, IL-8, IL-10, IL-13:** interleucines 6, 8, 10, 13

**LTB<sub>4</sub>:** leucotriè B4

**MA:** macròfags alveolars

**MCP-1:** proteïna quimiotàctica dels monòcits 1

**MIP- $\alpha$ :** proteïna inflamatòria dels macròfags  $\alpha$

**MIP- $\beta$ 1:** proteïna inflamatòria dels macròfags  $\beta$ 1

**MMPs:** metal.loproteases

**MMP-1, 2, 8, 9, 12:** metal.loproteasa 1, 2, 8, 9, 12

**NF- $\kappa$  $\beta$ :** factor de transcripció nuclear  $\kappa$  $\beta$

**PBM:** monòcits circulants

**PPAR:** peroxisome proliferator activated receptors

**PS:** fosfatidilserina

**ROI:** espècies reactives d'oxígen

**SLPI:** inhibidor de les leucoproteases

**TGF- $\beta$ <sub>1, 2, 3</sub>:** factor transformant de creixement  $\beta$  1, 2, 3

**TIMPS (TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3):** inhibidors tissulars de les metal.loproteases

**TLR:** receptors Toll-like

**TNF- $\alpha$ :** factor de necrosis tumoral  $\alpha$

**VEFG:** factor de creixement vasculo-endotelial

## **VII. BIBLIOGRAFIA**

1. Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of Chronic Pulmonary Disease. NHLBI/WHO Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD). Updated 2009. [www.goldcopd.com](http://www.goldcopd.com).
2. Barnes PJ. Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *N Engl J Med*. 2000; 343(4): 269-280.
3. Miravittles M, Soriano J B, García- Ríó F, Muñoz L, Duran- Tauleria E, Sanchez G, Sobradillo V, Ancochea J. Prevalence of COPD in Spain: Impact of undiagnosed COPD on quality of life and daily life activities. *Thorax*. 2009; 64: 863-868.
4. Rennard SI, Vestbo J. COPD: the dangerous underestimate of 15%. *Lancet*. 2006; 367 (9518): 1216-9.
5. J. Sauleda, J. Pons, A. Agustí. Inflamación y remodelado en la enfermedad pulmonar obstructiva crónica. En: *Inflamación y remodelado en los procesos obstructivos respiratorios*. Eds V. Sobradillo y J.L. Viejo. 2003;143-145. Medical & Marketing communications 2003.
6. Kim V, Rogers TJ, Criner G. New concepts in the pathobiology of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc*. 2008; 5: 478-485.
7. Celli BR, Halbert RJ, Nordyke RJ, Schan B. Airway obstruction in never smokers: results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Am J Med*. 2005; 118: 1364-72.
8. Behrendt CE. Mild and moderate-to-severe COPD in non-smokers. Distinct demographic profiles. *Chest*. 2005, 128: 1239-44.
9. Anthonisen NR, Connett JE, Kiley JP, Altose MD, Bailey WC, Buist AS, et al. Effects of smoking intervention and the use of an inhaled anticholinergic bronchodilator on the rate of decline of FEV<sub>1</sub> . The Lung Health Study. *JAMA*. 1994; 272 (19): 1497-505.
10. Pauwels RA, Lofdahl CG, Laitinen LA, Schonten JP, Postma DS, Pride NB, et al. Long-term treatment with inhaled budesonide in persons with mild chronic obstructive pulmonary disease who continue smoking. European Respiratory Society Study on Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *N Engl J Med*. 1999; 340 (25): 1948-53.
11. Vestbo J, Sorensen T, Lange P, Brix A, Torre P, Viskum K. Long-term effect of inhaled budesonide in mild and moderate chronic obstructive pulmonary disease: a randomised controlled trial. *Lancet*. 1999; 353(9167):1819-23.
12. Burge PS, Calverley PM, Jones PW, Spencer S, Anderson JA, Maslen TK. Randomised, double blind, placebo controlled study of fluticasone propionate in patients with moderate to severe chronic obstructive pulmonary disease: the ISOLDE trial. *BMJ*. 2000; 320(7245): 1297-303.

13. Nocturnal Oxygen Therapy Trial Group. Continuous or nocturnal oxygen therapy in hypoxemic chronic obstructive lung disease. a clinical trial. *Ann Intern Med.* 1980; 93(3): 391-8.
14. Report of the Medical Research Council Working Party. Long term domiciliary oxygen therapy in chronic hypoxic cor pulmonale complicating chronic bronchitis and emphysema. *Lancet.* 1981; 1(8222): 681-6.
15. Tashkin D, Celli B, Senn S, Burkhart D, Kesten S, Menjoge S, Decramer M. UPLIFT Study Investigators. A 4-year trial of tiotropium in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med.* 2008; 359: 1543-1554.
16. Calverley P, Anderson JA, Celli B, et al. Salmeterol and fluticasone propionate and survival in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med.* 2007; 356: 775-89.
17. Barnes P. Emerging pharmacotherapies for COPD. *Chest.* 2008; 134: 1278-1286.
18. Janda S, Park K, Fitzgerald JM, Etminan M, Swiston J. Statins in COPD. A systematic review. *Chest.* 2009; 136: 734-743.
19. Andreas S, Herrmann-Lingen C, Raupach T, Lüthje L, Fabricius JA, Hruska N, Körber W, Büchner B, Criée, Hasenfub G, Calverley P. Angiotensin II blockers in obstructive pulmonary disease: a randomised controlled trial. *Eur Respir J.* 2006; 27: 972- 979.
20. Sharafkhaneh A, Hanania NA, Kim V. Pathogenesis of emphysema. From the bench to the bedside. *Proc Am Thorac Soc.* 2007; 5: 475-477.
21. Hogg JC, Chu F, Utokaparch S, Woods R, Elliot M, Buzatu L, Cherniack R, Rogers R, Sciurba F, Coxson H, Pare P. The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med.* 2004; 350: 2645-53.
22. Majo J, Ghezzi H, Cosio MG. Lymphocyte population and apoptosis in the lungs of smokers and their relation to emphysema. *Eur Respir J.* 2001; 17: 946-953.
23. Kikly K, Liu L, Na S, Sedgwick JD. The IL-23/Th(17) axis. Therapeutic targets for autoimmune inflammation. *Curr Opin Immunol.* 2006; 18: 670-75.
24. Saetta M. Airway inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999; 160: S17-20.
25. Grumelli S, Corry DB, Song LZ, Song L, Green L, Huh J, Hacken J, Espada R, Bag R, Lewis DE, Kheradmand F. An immune basis for lung parenchymal destruction in chronic obstructive pulmonary disease and emphysema. *PLoS Med.* 2004; 1:e8.
26. Cosio M, Saetta M, Agustí A. Immunologic aspects of chronic obstructive disease. *N Engl J Med.* 2009; 360: 2445-54.

27. Gadgil A, Duncan SR. Role of T-lymphocytes and pro-inflammatory mediators in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Int J Chronic Obstruct Pulmon Dis.* 2008; 3: 531-541.
28. Kasahara Y, Tuder RM, Cool CD, Lynch DA, Flores SC; Voelkel NF. Endothelial cell death and decreased expression of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor 2 in emphysema. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001; 163: 737-44.
29. Di Stefano A, Capelli A, Lusuardi M, et al. Severity of airflow limitation is associated with severity of airway inflammation in smokers. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998; 158: 1277-85.
30. Stanescu D, Sanna A, Veriter C, Kostianev S, Calgagni PG, Fabri LM, Maestrelli P. Airways obstruction, chronic expectoration and rapid declined in FEV<sub>1</sub> in smokers are associated with increased levels of sputum neutrophils. *Thorax.* 1996; 51: 267-271.
31. Hiemstra PS, vanWetering S, Stolk J. Neutrophil serine proteases and defensins in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J.* 1998; 12(5): 1200-8.
32. MacNee W. Pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc.* 2005; 2: 258-266.
33. Lim S, Roche N, Oliver BG, Mattos W, Barnes PJ, Fan CK. Balance of matrix metalloprotease-9 and tissue inhibitor of metalloprotease-1 from alveolar macrophages in cigarette smokers, regulation by interleukin-10. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000; 162: 1355-1360.
34. Capelli A, Di Stefano A, Gnemmi I, Balbo P, Cerutti CG, Balbi B, Lusuardi M, Donner CF. Increased MCP-1 and MIP-1 $\beta$  in bronchoalveolar lavage fluid of chronic bronchitis. *Eur Respir J.* 1999; 14: 160-165.
35. Barnes PJ. The cytokine network in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *J Clin Invest.* 2008; 118: 3546-3556.
36. Montuschi P, Kharitonov SA, Ciabattoni G, Barnes PJ. Exhaled leukotrienes and prostaglandins in COPD. *Thorax.* 2003; 58(7): 585-588.
37. Seggev JS, Thornton WH, Jr., Edes TE. Serum leukotriene B4 levels in patients with obstructive pulmonary disease. *Chest.* 1991; 99(2): 289-291.
38. Profita M, Giorgi RD, Sala A, et al. Muscarinics receptors, leukotriene B4 production and neutrophilic inflammation in COPD patients. *Allergy.* 2005; 60: 1361-1369.
39. Beeh KM, Kornmann O, Buhl R, Culpitt SV, Giembycz MA, Barnes PJ. Neutrophil chemotactic activity of sputum from patients with COPD: role of IL-8 and LB4. *Chest.* 2003; 123(4): 1240-7.
40. Woolhouse IS, Bayley DL, Stockley PA. Sputum chemotactic activity in

- chronic obstructive pulmonary disease: effect on alpha(1) antitrypsin deficiency and the role of leukotriene B (4) and interleukin 8. *Thorax*. 2002; 57(8): 709-14.
41. Cavarra E, Lucattelli M, Gambelli F, Bartalesi B, Fineschi S, Szarka A, Giannerini F, Martorana PA, Lungarella G. Human SLPI inactivation after cigarette smoke exposure in a new in vivo model of pulmonary oxidative stress. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2001; 281: L412-L417.
  42. Shapiro SD. Proteolysis in the lung. *Eur Respir J Suppl*. 2003; 44: 30s-32s.
  43. Cantin A, Crystal RG. Oxidants, antioxidants and the pathogenesis of emphysema. *Eur J Respir Dis Suppl*. 1985; 139: 7-17.
  44. MacNee W. Oxidative stress and chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir Monograph*. 2006; 11: 100-129.
  45. Stoller JK, Aboussouan LS.  $\alpha$ 1- antitrypsin deficiency. *Lancet*. 2005; 365: 2225-36.
  46. Larsson K. Aspects on pathophysiological mechanisms in COPD. *J Intern Med*. 2007; 262(3): 311-40.
  47. Owen CA. Roles for proteinases in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *International Journal of COPD*. 2008; 3(2): 253-268.
  48. Hautamaki RD, Kobayashi DK, Senior RM, Shapiro SD. Requirement for macrophage elastase for cigarette smoke-induced emphysema in mice. *Science*. 1997; 277 (5334): 2002-4.
  49. Hunninghake GW, Davidson JM, Rennard S, Szapiel S, Gadek JE, Crystal RG. Elastin fragments attract macrophage precursors to diseased sites in pulmonary emphysema. *Science*. 1981; 212: 925-927.
  50. Senior RM, Griffin GL, Mecham RP. Chemotactic activity of elastin-derived peptides. *J Clin Invest*. 1980; 66: 859-862.
  51. Vassilakopoulos T, Zakyntinos E, Roussos C. Strenuous resistive breathing induces proinflammatory cytokines and stimulates the HPA axis in humans. *Am J Physiol*. 1999; 277: R1013-R1019.
  52. Roche WR, Beasley R, Williams JH, Holgate ST. Subepithelial fibrosis in the bronchi of asthmatics. *Lancet*. 1989; 1: 520-4.
  53. Demedts I, Demoor T, Bracke K, Joos G, Brusselle G. Role of apoptosis in the pathogenesis of COPD and pulmonary emphysema. *Respiratory Research*. 2006; 7:53.
  54. MacNee W, Tuder R. New paradigms in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease I. *Proc Am Thorac Soc*. 2009; 6:527-531.

55. Massaro D, Massaro GD. Hunger disease and pulmonary alveoli. *Am J Respir Crit Care Med.* 2004; 170: 723-724.
56. Ito K, Ito M, Elliott WM, Cosio B, Caramori G, Kon OM, Barczyk A, Hayashi S, Adcock IM, Hogg JC, Barnes PJ. Decreased histone deacetylase activity in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med.* 2005; 352: 1967-76.
57. Agustí A. Systemic effects of chronic obstructive pulmonary disease. What we know and what we don't know (but should). *Proc Am Thorac Soc.* 2007; 4: 522-525.
58. Barnes PJ, Celli BR. Systemic manifestations and comorbidities of COPD. *Eur Respir J.* 2009; 33(5): 1165-85.
59. Dahl M, Vestbo J, Lange P, Bojesen SE, Tybjaerg-Hansen A, Nordestgaard BG. C-Reactive protein as a predictor of prognosis in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007; 175: 250-255.
60. Agusti A, MacNee W, Donaldson K, Cosio M. Hypothesis: Does COPD have an autoimmune component?. *Thorax.* 2003; 58(10): 832-834.
61. Taraseviciene-Stewart L, Douglas I, Nana-Sinkam PS, Lee JD, Tuder RM, Nicolls MR, Voelkel NF. Is alveolar destruction and emphysema in chronic obstructive pulmonary disease an immune disease?. *Proc Am Thorac Soc.* 2006; 687-690.
62. Lee SH, Goswami S, Grudo A, Song LZ, Bandi V, Goodnight-White S, Green L, Hacken-Bitar J, Huh J, Bakaeen F et al. Antielastin autoimmunity in tobacco smoking-induced emphysema. *Nat Med.* 2007; 13: 567-569.
63. Feghali-Bostwick CA, Gadgil AS, Otterbein LE, Pilewski JM, Stoner MW, Csizmadia E, Zhang Y, Scirba FC, Duncan SR. Autoantibodies in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008; 177: 156-163.
64. Taraseviciene-Stewart L, Scerbavicius R, Choe KH, Moore M, Sullivan A, Nicolls MR, Fontenot AP, Tuder RM, Voelkel NF. An animal model of autoimmune emphysema. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005; 171: 734-742.
65. Núñez B, Sauleda J, Antó JM, Julià MR, Orozco M, Monsó E, Noguera A, Gómez F, García-Aymerich J, Agustí A. Anti-tissue antibodies are related to lung function in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2011; 1025-1031.
66. Retamales I, Elliot WM, Meshi B, Coxson HO, Pare PD, Scirba FC, Rogers RM, Hayashi S, Hogg JC. Amplification of inflammation in emphysema and its association with latent adenoviral infection. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001; 164: 469-473.

67. Russell RE, Culpitt SV, DeMatos 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(5): 602-609
68. Di Stefano A, Caramori G, Ricciardolo FLM, Capelli A, Adcock IM, Donner CF. Cellular and molecular mechanisms in chronic obstructive respiratory disease: an overview. *Clin Exp Allergy.* 2004; 34: 1156- 1167.
69. Lohmann-Matthes ML, Steinmuller C, Franke-Ullmann G. Pulmonary Macrophages. *Eur Respir J.* 1994; 7(9): 1678-1689.
70. Tetley T. Macrophages and the pathogenesis of COPD. *Chest.* 2002; 121:156S-159S.
71. Fujiwara N, Kobayashi K. Macrophages in inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy.* 2005; 4(3): 281-6.
72. Somoskovi A, Zissel G, Ziegenhagen MW, Schlaak M, Muller-Quernheim J. Accessory function and costimulatory molecule expression of alveolar macrophages in patients with pulmonary tuberculosis. *Immunobiology.* 2000; 201: 450-460.
73. Taylor ML, Noble PW, White B, Wise R, Liu MC, Bochner BS. Extensive surface phenotyping of alveolar macrophages in interstitial lung disease. *Clin Immunol.* 2000; 94: 33-41.
74. Striz I, Wang YM, Kalaycioglu O, Costabel U. Expression of alveolar macrophage adhesion molecules in pulmonary sarcoidosis. *Chest.* 1992; 102: 882-886.
75. Viskman MY, Bochner BS, Stokes Peebles R, Schleimer RP, Liu PP. Expression of activation markers on alveolar macrophages in allergic asthmatics after endobronchial or whole-lung allergen challenge. *Clin Immunol.* 2002; 104: 77-85.
76. Viskman MY, Liu MC, Bickel CA, Schleimer RP, Bochner BS. Phenotypic analysis of alveolar macrophages and monocytes in allergic airway inflammation. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997; 155: 858-863.
77. 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(1): 240-247.
78. Culpitt SV, Maziak W, Loudikis S, Nightingale JA, Matthews JL, Barnes PJ. Effect of high dose inhaled steroid on cells, cytokines and proteases in induced sputum in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999; 160: 1635-1639.
79. Betsuyaku T, Nishimura M, Takeyabu K, Tanino M, Venge P, Xu S, Kawakami Y. Neutrophil granule proteins in bronchoalveolar lavage fluid



- from subjects with subclinical emphysema. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999; 159: 1985-1991.
80. Ohnishi K, Takagi M, Kurokawa Y, Satomi S, Konttinen YT. Matrix metalloproteinase-mediated extracellular matrix protein degradation in human pulmonary emphysema. *Lab Invest.* 1998; 78(9): 1077-87.
81. Baraldo S, Bazzan E, Zanin ME, Turato G, Garbisa S, Maestrelli P, Papi A, Miniati M, Fabbri LM, Zuin R, Saetta M. Matrix metalloproteinase-2 protein in lung periphery is related to COPD progression. *Chest.* 2007; 132(6):1733-40.
82. Wesselschmidt RL, Kobayashi DK, Ley TJ, Shapiro SD. Metalloelastase is required for macrophage-mediated proteolysis and matrix invasion in mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996; 93:3942-3946.
83. Cawston T, Carrere S, Catterall J, *et al.* Matrix metalloproteinases and TIMPs: properties and implications for the treatment of chronic obstructive pulmonary disease. *Novartis Found Symp.* 2001; 234: 205-218.
84. Hirano K, Sakamoto T, Uchida Y, *et al.* Tissue inhibitor of metalloproteinases-2 gene polymorphisms in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J.* 2001; 18: 748-752.
85. Nathan, C. Points of control in inflammation. *Nature.* 2002; 420: 846-852.
86. Serhan CN, Savill J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nat Immunol.* 2005; 6: 1191-1197.
87. Vandivier RW, Henson PM, Douglas IS. Burying the dead: the impact of failed apoptotic cell removal (Efferocytosis) on chronic inflammatory lung disease. *Chest.* 2006; 129: 1673-1682.
88. McKee CM, Penno MB, Cowman M, Burdick MD, Strieter RM, Bao C, Noble PW. Hyaluronan (HA) fragments induce chemokine gene expression in alveolar macrophages. The role of HA size and CD44. *J Clin Invest.* 1996; 98: 2403-2413.
89. Boodoo S, Spannhake EW, Powell JD, Horton MR. Differential regulation of hyaluronan-induced IL-8 and IP-10 in airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2006; 291: 479-486.
90. Scheibner KA, Lutz MA, Boodoo S, Fenton MJ, Powell JD, Horton MR. Hyaluronan fragments act as an endogenous danger signal by engaging TLR2. *J Immunol.* 2006; 177: 1272-1281.
91. Teder P, Vandivier RW, Jiang D, Liang J, Cohn L, Pure E, Henson PM, Noble PW. Resolution of lung inflammation by CD44. *Science.* 2002; 296: 155-158.
92. Liu D, Zeng BX, Zhang SH, Wang YL, Zeng L, Geng ZL, Zhang SF. Rosiglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist, reduces acute lung injury in endotoxemic rats. *Crit Care Med.*

- 2005; 33: 2309-2316.
93. Delerive P, Fruchart JC, Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptors in inflammation control. *J Endocrinol.* 2001; 169: 453-459.
  94. Devchand PR, Keller H, Peters JM, Vazquez M, Gonzalez FJ, Wahli W. The PPAR $\alpha$ -leukotriene B<sub>4</sub> pathway to inflammation control. *Nature.* 1996; 384: 39-43.
  95. Huynh MN, Fadok VA, Henson P. Phosphatidylserine-dependent ingestion of apoptotic cells promotes TGF- $\beta$ 1 secretion and the resolution of inflammation. *J Clin Invest.* 2002; 109: 41-50.
  96. Morimoto K, Amano H, Sonoda F, Baba M, Senba M, Yoshimine H, Yamamoto H, Ii T, Oishi K, Nagatake T. Alveolar macrophages that phagocytose apoptotic neutrophils produce hepatocyte growth factor during bacterial pneumonia in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2001; 24: 608-615.
  97. Lee CG, Homer RJ, Zhu Z, Lanone S, Wang X, Kotliansky V, Shipley JM, Gotwals P, Noble P, Chen Q et al. Interleukin-13 induces tissue fibrosis by selectively stimulating and activating transforming growth factor beta (1). *J Exp Med.* 2001; 194: 809-821.
  98. Morris D, Huang X, Kaminski N, Wang Y, Shapiro S, Dolganov G, Glick A, Sheppard D. Loss of integrin-mediated TGF $\beta$  activation causes MMP-12 dependent pulmonary emphysema. *Nature.* 2003; 422: 169-173.
  99. 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(5): 367-72.
  100. Wu L, Chau J, Young RP, Pokorny V, Mills GD, Hopkins R, McLean L, Black PN. Transforming growth factor-beta1 genotype and susceptibility to chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax.* 2004; 59(2): 126-129.
  101. Königshoff M, Kneideinger N, Eickelberg O. TGF- beta signaling in COPD: deciphering genetic and cellular susceptibilities for future therapeutic regimen. *Swiss Med Wkly.* 2009; 139: 554-63.
  102. Maderna P, Yona S, Perretti M, Godson C. Modulation of phagocytosis of apoptotic neutrophils by supernatant from dexamethasone-treated macrophages and annexin-derived peptide Ac<sub>2-26</sub>. *J Immunol.* 2005; 174:3727-3733.
  103. Levy BD, Bonnans C, Silverman ES, Palmer LJ, Marigowda G, Israel E. Diminished lipoxin biosynthesis in severe asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005; 172: 824-830.
  104. Levy BD, Kohli P, Gotlinger K, Haworth O, Hong S, Kazani S, Israel E, Haley KJ, Serhan CN. Protectin D1 is generated in asthma and dampens airway inflammation and hyperresponsiveness. *J Immunol.* 2007; 178: 496-502.

105. Chao J, Wood JG, Gonzalez NC. Alveolar hypoxia, alveolar macrophages and systemic inflammation. *Respir Res.* 2009; 10:54.
106. Spencer LT, Paone G, Krein PM, Rouhani FN, Rivera- Nieves J, Brantly ML. Role of human neutrophil peptides in lung inflammation associated with alpha1-antitrypsin deficiency. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2004; 286: L514-L520.
107. Zhou S, Stark JM, Leikauf GD. Leukotriene b4 formation: human neutrophil-airway epithelial cell interactions. *J Appl Physiol.* 1995; 78(4): 1396-1403.
108. Culpitt SV, Rogers DF, Shah P, De Matos C, Russell RE, Donnelly LE, Barnes PJ. Impaired inhibition by dexamethasone of cytokine release by alveolar macrophages from patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003; 167(1): 24-31.
109. MacNee W. Oxidants/antioxidants and COPD. *Chest.* 2000; 117(5 Suppl 1): 303S-317S.
110. McLeod R, Mack DG, McLeod EG, Campbell EJ, Estes RG. Alveolar macrophage function and inflammatory stimuli in smokers with and without obstructive lung disease. *Am Rev Respir Dis.* 1985; 131(3): 377-384.
111. Vignola AM, Chanez P, Chiappara G, Merendino A, Pace E, Rizzo A, la Rocca AM, Bellia V, Bonsignore G, Bousquet J. Transforming growth factor-beta expression in mucosal biopsies in asthma and chronic bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997; 156: 591-599.
112. De Boer WI, van Schadewijk A, Sont JK, Sharma HS, Stolk J, Hiemstra PS, Van Krieken JHJM. Transforming growth factor B<sub>1</sub> and recruitment of macrophages and mast cells in airways in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998; 158: 1951-1957.
113. Jeffery PK. Remodeling in asthma and chronic obstructive lung disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001; 164:S28-S38.
114. Fuke S, Betsuyaku T, Nasuhara Y, Morikawa T, Katoh H, Nishimura M. Chemokines in bronchiolar epithelium in the development of chronic obstructive pulmonay disease. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2004; 31: 405-412.
115. Border WA, Noble NA. Transforming growth factor beta in tissue fibrosis. *N Engl J Med.* 1994; 331(19): 1286-1292.
116. Frears ER, Zhang Z, Blake DR, O'Connell JP, Winyard PG. Inactivation of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 by peroxynitrite. *FEBS Lett.* 1996; 381(1-2): 21-24.
117. Soler N, Ewig S, Torres A, Filella X, Gonzalez J, Zaubet A. Airway inflammation and bronchial microbial patterns in patients with stable

- chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J.* 1999; 14(5): 1015-1022.
118. Mokard D, Guery BP, Bouabdallah R et al. Deactivation of alveolar macrophages in septic neutropenics ARDS. *Chest.* 2003; 124: 644-652.
119. Muehlstedt SG, Lyte M, Rodriguez JL. Increased IL-10 production and HLA-DR supression in the lungs of injured patients precede the development of nosocomial pneumonia. *Shock.* 2002; 17:443-450.
120. Odeberg J, Sodeberg-Naucler C. Reduced expression of HLA class II molecules and interleukin-10 and transforming growth factor  $\beta$ 1-independent supression of T-cell proliferation in human cytomegalovirus-infected macrophage cultures. *J Virol.* 2004; 75: 5174-5181.
121. Zhang P, Martin M, Yang QB, Michalek SM, Katz J. Role of B7 costimulatory molecules in immune responses and T-helper cell differentiation in response to recombinant HagB from *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun.* 2004; 72: 637-644.
122. Abbas A., Lichtman AH, Pober J. Effector mechanisms of cellular immunity. En: *Cellular and Mollecular Immunology*. Philadelphia, WB Saunders, 2000; pp. 291-308.
123. Aruffo A, Stamenkovic I, Melnick M, Underhill CB, Seed B. CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. *Cell.* 1990; 61: 1303-1313.
124. Underhill CB, Nguyen HA, Shizari M, Culty M. CD44 positive macrophages take up hyaluronan during lung development. *Dev Biol.* 1993; 155: 324-336.
125. Hart SP, Dougherty GJ, Haslett C, Dransfield I. CD44 regulates phagocytosis of apoptotic neutrophil granulocytes, but not apoptotic lymphocytes, by human macrophages. *J Immunol.* 1997; 159: 919-925.
126. Noguera A, Sala E, Pons AR, Iglesias J, MacNee W, Agusti AGN. Expression of adhesion molecules during apoptosis of circulating neutrophils in chronic obstructive pulmonary disease. *Chest.* 2004; 125: 1837-1842.

## **VI. ANNEXOS**

## ALTRES ARTICLES JA PUBLICATS

**Expression of adhesion molecules during apoptosis of circulating neutrophils in COPD.** A. Noguera, E. Sala, A.R. Pons, J. Iglesias, W. Macnee, AGN Agustí. Chest 2004; 125: 1837-1842.

## BEQUES RELACIONADES AMB EL TEMA

Títol del projecte: **Papel del macrófago alveolar en la regulación de la susceptibilidad en la enfermedad pulmonar obstructiva crónica.**

Entitat finançadora: **CICYT SAF-2001-0302.**

Responsabilitat en el projecte: Investigadora col.laboradora.

Títol del projecte: **Papel de la respuesta inmune en la patogénesis de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica.**

Entitat finançadora: **FIS 02/986.**

Responsabilitat en el projecte: Investigadora col.laboradora.

Títol del projecte: **Mecanismos moleculares de la respuesta inflamatoria durante las agudizaciones de la EPOC.**

Entitat finançadora: **FIS 04/2146.**

Responsabilitat en el projecte: Investigadora col.laboradora.