

TESIS DOCTORAL

**PAPEL DEL LINFOCITO T EN LA PATOGÉNESIS DE LA
ENFERMEDAD PULMONAR OBSTRUCTIVA CRÓNICA**

Autor: Bernardino Barceló Martín

Director: Dr. Àlvar Agustí García-Navarro

Departamento de Biología Fundamental y Ciencias de la Salud

Universitat de les Illes Balears

2010

PAPEL DEL LINFOCITO T EN LA PATOGÉNESIS DE LA ENFERMEDAD PULMONAR OBSTRUCTIVA CRÓNICA

Tesis presentada por Bernardino Barceló Martín para optar al grado de Doctor.



Director:

Dr. Àlvar Agustí García-Navarro.

**Director de l'Institut Clínic del Tórax.
Hospital Clínic. Barcelona.**

El doctorando:

Bernardino Barceló Martín

**Servicio de Análisis Clínicos. Hospital
Universitari Son Dureta. Palma de
Mallorca.**



**Govern
de les Illes Balears**

Hospital Universitari Son Dureta



Ponente:

Prof. Andreu Palou Oliver

**Director del Laboratorio general de
Biología Molecular, Nutrición y
Biotecnología de la Universitat de les Illes
Balears.**



INDICE

AGRADECIMIENTOS.....	5
ABREVIATURAS.....	7
PRESENTACIÓN DE LA TESIS DOCTORAL.....	9
ENFERMEDADES RESPIRATORIAS DE ORIGEN INFLAMATORIO.....	11
ENFERMEDAD PULMONAR OBSTRUCTIVA CRÓNICA.....	13
<i>Células inflamatorias.....</i>	<i>16</i>
<i>Mecanismos de reclutamiento celular.....</i>	<i>18</i>
<i>Mediadores inflamatorios.....</i>	<i>19</i>
<i>Relación con la autoinmunidad.....</i>	<i>20</i>
LINFOCITOS T.....	23
<i>Ontogenia de los Linfocitos T.....</i>	<i>24</i>
<i>Activación de linfocitos T.....</i>	<i>27</i>
MECANISMOS EFECTORES DE LA INMUNIDAD CELULAR.....	31
Linfocitos T CD4+ efectores.....	33
<i>Subpoblaciones Th1 y Th2 de los linfocitos T CD4+.....</i>	<i>33</i>
<i>Desarrollo de las subpoblaciones Th1 y Th2.....</i>	<i>34</i>
<i>Respuestas inmunitarias mediadas por los linfocitos Th1.....</i>	<i>38</i>
<i>Respuestas inmunitarias mediadas por los linfocitos Th2.....</i>	<i>38</i>
<i>Subpoblación Th17 de los linfocitos T CD4+.....</i>	<i>40</i>
Linfocitos T CD8+ efectores: Linfocitos T citotóxicos.....	43
<i>Citotoxicidad mediada por los Linfocitos T citotóxicos.....</i>	<i>43</i>
<i>Reconocimiento del antígeno y activación de los LTC.....</i>	<i>44</i>
<i>Destrucción de las células diana por los LTC.....</i>	<i>45</i>

Linfocitos T de memoria.....	48
MECANISMOS REGULADORES DE LA INMUNIDAD CELULAR.....	51
<i>Tolerancia periférica en los linfocitos T.....</i>	<i>51</i>
<i>Linfocitos T reguladores.....</i>	<i>51</i>
<i>Linfocitos T$\gamma\delta$.....</i>	<i>55</i>
HIPÓTESIS DE LA TESIS DOCTORAL.....	59
OBJETIVOS GENERALES.....	61
OBJETIVOS ESPECÍFICOS DE LA TESIS DOCTORAL.....	63
ESTUDIO I.....	63
<i>Hipótesis.....</i>	<i>63</i>
<i>Objetivos.....</i>	<i>64</i>
ESTUDIO II.....	65
<i>Hipótesis.....</i>	<i>65</i>
<i>Objetivos.....</i>	<i>65</i>
ESTUDIO III.....	66
<i>Hipótesis.....</i>	<i>66</i>
<i>Objetivos.....</i>	<i>67</i>
ARTÍCULOS PUBLICADOS.....	69
ESTUDIO I.....	69
ESTUDIO II.....	77
ESTUDIO III.....	85
DISCUSIÓN.....	95
RESUMEN GENERAL DE LOS RESULTADOS.....	95
DISCUSIÓN PRINCIPALES RESULTADOS ESTUDIO I.....	97
DISCUSIÓN PRINCIPALES RESULTADOS ESTUDIO II.....	101

DISCUSIÓN PRINCIPALES RESULTADOS ESTUDIO III.....	105
CONCLUSIONES.....	111
BIBLIOGRAFÍA.....	113
ANEXO.....	125
OTRAS PUBLICACIONES RELACIONADAS.....	125
BECAS OBTENIDAS.....	125

AGRADECIMIENTOS

En este apartado quiero agradecer y dedicar esta Tesis Doctoral a aquellas personas que directamente han contribuido a la realización de la misma, a través de la aportación de su conocimiento y esfuerzo, y también a aquéllas que de una forma u otra dan sentido a mi vida, y por tanto, me han dado la confianza, la estabilidad y su ejemplo a nivel profesional y personal.

Al Dr. Àlvar Agustí, por creer en mí para poder realizar esta Tesis Doctoral. Por su capacidad de trabajo, de síntesis, de comunicación y por saber rodearse de personas inteligentes.

Al Dr. Jaume Pons, por ser mi gran compañero de viaje a lo largo de esta Tesis Doctoral. Por todas las horas que hemos compartido en la Unidad de Investigación y por inculcarme la emoción que siente por la Inmunología.

A la Dra. Aina Noguera, porque ella me dio la oportunidad de empezar a trabajar en la Unidad de Investigación del Hospital Son Dureta en el grupo de trabajo de EPOC siendo residente de Análisis Clínicos.

A Antonia, mi mujer. Por ser mi gran amor y mi apoyo, con la que además he tenido la suerte de compartir horas de trabajo durante la realización de esta tesis.

A nuestra hija Marta, porque la miro y todavía no me lo creo. Para que aprenda, ya desde pequeña, que fruto del trabajo y la motivación se pueden conseguir cosas importantes.

A mis padres y hermana, por inculcarme desde siempre la motivación de estudiar y superarme día tras día, pese a que a veces surjan adversidades.

Al Dr. Bartomeu Castanyer, por considerarlo mi maestro en facetas de la vida que van mucho más allá de las fronteras del laboratorio. Como tal, ha sido generoso en traspasarme sus conocimientos y enseñarme las herramientas con las que seguir preguntándome el por qué de las cosas.

Al Dr. Rafael Calafell, por considerarlo también mi maestro no sólo en el campo de los Análisis Clínicos, sino también en el personal. Él me dio la oportunidad de ver y aprender por primera vez como era un laboratorio de Análisis Clínicos.

Al Servicio de Análisis Clínicos del Hospital Son Dureta, al cual considero mi casa, y a todas las personas que trabajamos en él y que sienten el mismo orgullo que yo de pertenecer a este Servicio.

Al Servicio de Neumología del Hospital Son Dureta y a todos los pacientes que han participado voluntariamente de los diferentes estudios que componen esta Tesis, por su generosa contribución a la ciencia y por qué investigar con el fin de encontrar soluciones a su enfermedad ha sido el objetivo final de esta Tesis Doctoral.

ABREVIATURAS

EPOC: Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica

BAL: Lavado broncoalveolar

TCR: Receptor de células T

CPH: Complejo principal de histocompatibilidad

CPA: Célula presentadora de antígenos

Th: Linfocito T helper

Tc: Linfocito T citotóxico

Treg: Linfocito T regulador

LTC: Linfocito T citotóxico

TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa

TGF- β : factor de crecimiento transformante beta

INF γ : Interferón gamma

IL: Interleuquina

CTLA-4: Antígeno asociado a linfocitos T citotóxicos

GITR: Receptor del factor de necrosis tumoral inducido por glucocorticoides

PRESENTACIÓN DE LA TESIS DOCTORAL

Esta Tesis Doctoral se estructura según las directrices de la Normativa para presentación de Tesis Doctorales de la Universidad de las Islas Baleares. La Tesis Doctoral se centra en analizar si alteraciones de la respuesta inmune adquirida pueden jugar un papel patogénico importante en la respuesta inflamatoria que caracteriza a la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC).

Los estudios realizados en la presente Tesis Doctoral pertenecen a una misma línea de investigación desarrollada durante los últimos 5 años en la Unidad de Investigación del Hospital Son Dureta bajo la dirección del Dr. Àlvar Agustí. Los resultados obtenidos han aportado información relevante, y han sido recogidos en tres artículos originales publicados en revistas de amplia difusión internacional, con un índice de impacto global de 13.297. Aunque el núcleo central de esta Tesis Doctoral son los artículos II y III, en los cuales el doctorando es el autor principal, se presentan en orden cronológico para recalcar la importancia de los estudios iniciales en los cuales ya participó el doctorando, y que llevaron al diseño y realización de los estudios posteriores. Completan la memoria 2 publicaciones adicionales que hacen referencia al tema central de esta Tesis Doctoral.

La presente línea de trabajo continua en evolución y en el momento actual el doctorando está participando en un proyecto titulado “Efecto de los

corticoides inhalados sobre la inflamación inducida por el ejercicio en pacientes con EPOC” y que se está llevando a cabo en el Hospital Universitari Son Dureta.

ENFERMEDADES RESPIRATORIAS DE ORIGEN INFLAMATORIO

Conceptos generales

Ha sido recientemente cuando se ha reconocido que la inflamación es el hallazgo central de muchas enfermedades respiratorias, como el asma, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), la fibrosis quística, el distrés respiratorio del adulto o muchas enfermedades intersticiales difusas. Las características específicas de la respuesta inflamatoria y el sitio de la inflamación difieren entre estas enfermedades pero, todas ellas presentan reclutamiento y activación de diferentes células inflamatorias y cambios en las células estructurales del pulmón.

Estas enfermedades se caracterizan por una mayor expresión de múltiples proteínas que están implicadas en complejas cascadas inflamatorias. Estas proteínas incluyen citoquinas, quimoquinas, enzimas que producen mediadores inflamatorios, receptores de mediadores inflamatorios y moléculas de adhesión. El aumento en la expresión de estas proteínas inflamatorias es el resultado de una mayor transcripción de genes inflamatorios, genes que las células afectadas no expresan normalmente, pero que se expresan en los procesos inflamatorios de una forma específica para cada célula (1).

Muchos de estos genes inflamatorios están regulados por factores de transcripción pro-inflamatorios, incluyendo el factor nuclear kappa-B (NF- κ B) y la proteína activadora 1 (AP-1). Estos factores de transcripción orquestan,

amplifican y perpetúan la respuesta inflamatoria dando lugar a las bases moleculares de la inflamación crónica (2;3). Recientemente se ha destacado la importancia del estado de acetilación de las histonas nucleares en la regulación de la transcripción de genes inflamatorios y en el mecanismo de acción de algunos fármacos con propiedades antiinflamatorias (4).

Esta Tesis Doctoral se centra en el estudio de la inflamación observada en una importante enfermedad obstructiva de las vías aéreas, como es la EPOC, haciendo énfasis en los mecanismos pro-inflamatorios conducidos por las subpoblaciones de linfocitos T efectoros y en los mecanismos de control anti-inflamatorios controlados por los linfocitos T reguladores.

A continuación se recoge de forma breve los principales aspectos de la EPOC y de la fisiopatología linfocitaria.

ENFERMEDAD PULMONAR OBSTRUCTIVA CRÓNICA

La enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) es un problema de salud mayor debido a su importante morbimortalidad y al gran gasto sociosanitario que comporta. Según la Organización Mundial de la Salud, será la quinta enfermedad con mayor prevalencia y será la tercera causa mundial de mortalidad en el año 2020 (5). La prevalencia estimada de la EPOC en España es del 9.1% en la población de 40 a 70 años y constituye la quinta causa de muerte más común entre los varones, con una tasa anual de 60 muertes por 100.000 habitantes, y la séptima para las mujeres en 1991, con una tasa anual de 14 muertes por 100.000 habitantes (6).

El coste económico nacional de la EPOC se ha calculado en 160.000 millones de pesetas correspondiendo una parte muy importante a los costes indirectos. En el estudio IBERPOC (7) los costes directos de consumo de fármacos y asistencia sanitaria representan 39.373 millones de pesetas. La mayor parte del coste es debido a la asistencia hospitalaria (41%) seguido del coste farmacéutico (36.6%). El factor que más influye en el coste es la gravedad de la enfermedad de tal forma que los casos graves representan el 71% del coste de la enfermedad.

La iniciativa Global (GOLD) define la EPOC como una enfermedad prevenible y tratable con efectos extrapulmonares significativos, caracterizada por obstrucción crónica al flujo aéreo, que habitualmente es progresiva y se asocia a una respuesta inflamatoria anormal a la inhalación de gases o partículas, principalmente al humo del tabaco (8).

La EPOC no sólo se caracteriza por una reacción pulmonar inflamatoria exagerada frente al humo del tabaco, sino también por la presencia de inflamación sistémica (extrapulmonar). Esta inflamación sistémica tiene consecuencias importantes sobre otros órganos de la economía, especialmente sobre el músculo esquelético (pérdida de masa muscular y disfunción del tejido remanente). Todo ello influye negativamente sobre la capacidad de ejercicio del enfermo, su calidad de vida e incluso, su pronóstico (con independencia del grado de obstrucción al flujo aéreo presente). La investigación de las bases etiopatogénicas de estos efectos sistémicos de la EPOC debe permitir desarrollar en el futuro estrategias terapéuticas específicas capaces de mejorar la calidad de vida y el pronóstico de estos enfermos.

El conocimiento de la patogénesis del enfisema pulmonar ha evolucionado en la última mitad de siglo de forma interesante (9;10). Desde los tiempos de Laennec hasta casi la primera mitad del siglo XX, predominaban las explicaciones mecánicas del enfisema, sin considerarse el efecto del tabaco. A finales de los 60, Liebow (11) propone un modelo de atrofia vascular en el enfisema, y posteriormente surge la hipótesis del desbalance proteasas-antiproteasas. Esta hipótesis de la patogénesis del enfisema se basa en dos observaciones muy importantes: 1) Laurell y Ericsson (12) describen la asociación entre enfisema y déficit de alfa₁-antitripsina y 2) Gross y colaboradores (13) describen el primer modelo de enfisema inyectando una proteasa vegetal, la papaína, en los pulmones de animales de experimentación. La integración de esta hipótesis con las observaciones de la naturaleza

inflamatoria de la enfermedad puede sintetizarse en los siguientes puntos: 1) la exposición crónica al humo del tabaco recluta células inflamatorias a los espacios aéreos del pulmón; 2) éstas células inflamatorias liberan mediadores inflamatorios con capacidad elastolítica que degradan la matriz extracelular; 3) los mecanismos de reparación alveolar están alterados, lo que resulta en la destrucción de los espacios alveolares característicos del enfisema pulmonar.

La reacción inflamatoria al humo del tabaco aparece en todos los fumadores, sin embargo, sólo 1 de cada 4 fumadores desarrolla la enfermedad, por lo que deben existir otros factores adicionales que modulan y explican el desarrollo de la enfermedad. La mayor parte de estos factores adicionales son desconocidos, pero pueden incluir entre otros, factores propios del individuo (sexo, etnia, alteraciones en el desarrollo fetal pulmonar, presencia de hiperreactividad bronquial y alteraciones genéticas específicas como la deficiencia de la alfa₁-antitripsina en sujetos homocigotos) o ajenos a éste como son la polución ambiental, diferencias dietéticas, infecciones durante la infancia y la exposición durante largos periodos de tiempo al humo del tabaco en espacios cerrados (14;15).

A pesar de la evidencia de estos hechos y la enorme importancia de su incidencia y consumo de recursos, la investigación en los mecanismos celulares así como en nuevos tratamientos de la EPOC no se ha desarrollado de forma importante hasta las últimas dos décadas, probablemente debido a que no se comprendía la naturaleza inflamatoria de la enfermedad y, de hacerse, se interpretaba como similar a la observada en el asma. Del mismo modo, el hecho de que en una mayoría de estos pacientes el desarrollo de la

enfermedad es consecuencia del consumo prolongado de tabaco, hacía que esta enfermedad fuera concebida como “culpa” del paciente. Finalmente, la ausencia de un modelo animal que reproduzca los cambios característicos de la EPOC tras la exposición al humo del tabaco ha sido determinante en este retraso. De hecho, no ha sido hasta la reciente iniciativa GOLD que se ha reconocido la importancia de la asociación de la obstrucción crónica e irreversible al flujo aéreo característica de estos enfermos con el concepto de inflamación persistente en respuesta a una noxa inhalada en la definición de EPOC (16).

Células inflamatorias

La EPOC se caracteriza por una inflamación crónica de las vías aéreas, parénquima y lecho vascular pulmonar. Estudios histológicos muestran que el foco de inflamación más importante se localiza en los bronquiolos, que están obstruidos por presentar fibrosis e infiltración por macrófagos y linfocitos T, predominando los linfocitos T CD8+ (citotóxicos) (17;18). El enfisema pulmonar se caracteriza por una destrucción de los espacios alveolares como consecuencia de dicha inflamación. Hasta hace poco tiempo no ha sido aclarado el patrón celular predominante, debido principalmente a la dificultad en la toma de muestras de parénquima pulmonar en estos enfermos y que gran parte de éstos se han basado en estudios del lavado broncoalveolar.

Tradicionalmente se ha atribuido protagonismo principal al neutrófilo, que aparece a las pocas horas del consumo tabáquico y que persiste, junto con los macrófagos activados, produciendo una gran cantidad de mediadores de la

inflamación, así como proteasas y oxidantes responsables de la destrucción del parénquima pulmonar. Los neutrófilos aparecen en el lavado broncoalveolar y esputo de fumadores y pacientes con EPOC (19). Sin embargo, estudios realizados en parénquima pulmonar demostraron que son los macrófagos y los linfocitos T, y no los neutrófilos los que se correlacionan con una mayor destrucción pulmonar (20;21). Posteriormente se confirmó que la subpoblación de linfocitos CD8+ era la predominante, reproduciéndose este patrón a nivel del lecho vascular pulmonar así como vías aéreas centrales y periféricas (22;23). Para añadir más confusión, posteriormente se apuntó el papel de las células epiteliales como liberadoras de mediadores inflamatorios, como la IL-8 y el TNF-alfa y posiblemente responsables del inicio de la cascada inflamatoria. En un intento de englobar las distintas células inflamatorias encontradas a distintos niveles se ha propuesto un modelo que trata de integrar el papel de todas estas células (24): el humo del tabaco crearía una disrupción de la barrera epitelial con una reacción inflamatoria inicial compuesta principalmente por neutrófilos y macrófagos. Como consecuencia de la destrucción epitelial se produciría la exposición de péptidos derivados de la matriz intersticial (elastina, colágeno, proteoglicanos) con capacidad antigénica que serían reconocidos por los linfocitos T, que son activados y de esta forma se iniciaría su proliferación. Las células activadas pueden reclutar neutrófilos, macrófagos e incluso eosinófilos al lugar de la inflamación. Este modelo ha llevado a postular la participación de la autoinmunidad en la patogenia de la EPOC (25).

La aparición gradual de estos distintos tipos celulares podría sintetizarse de la siguiente manera, de acuerdo al conocimiento actual: 1) los

neutrófilos son reclutados casi instantáneamente tras la inhalación del tabaco; 2) los macrófagos se activan por el humo del tabaco acumulándose en el pulmón tras semanas o meses de exposición al tabaco; y 3) las células T se acumulan tras un tiempo más prolongado de exposición al tabaco, y se correlacionan con la severidad del enfisema. En contra de la tendencia generalizada, a pesar que la inflamación en la EPOC severa con enfisema avanzado está “quemada”, Hogg y cols. (26;27) correlacionaron la severidad del enfisema con una mayor infiltración por macrófagos, células T y neutrófilos en parénquimas pulmonares de pacientes sometidos a cirugía de reducción de volumen. Parece claro que la acumulación de estas células inflamatorias se túa y además se amplifica con el tiempo, incluso cuando el estímulo desencadenante, el tabaco, ha sido suprimido. Este mismo grupo ha hipotetizado que una infección latente por adenovirus puede ser responsable del fenómeno de amplificación.

Mecanismos de reclutamiento celular

Es probable que el reclutamiento de células inflamatorias al pulmón responda a varias causas. En primer lugar, el humo del tabaco puede atraer células inflamatorias directamente. La liberación de mediadores proinflamatorios por estas células amplifica este fenómeno inicial. En segundo lugar el humo del tabaco puede producir un fenotipo proinflamatorio en las células epiteliales de las vías aéreas, que también liberarían más mediadores quimiotácticos y atraería más células inflamatorias. En tercer lugar las exacerbaciones de la enfermedad, a menudo asociadas con infecciones traqueobronquiales, pueden exacerbar la inflamación ya presente. Y

finalmente, los fragmentos producto de la degradación de la matriz extracelular son quimiotácticos para los macrófagos y se ha hipotetizado que esto pudiera ser responsable de una inflamación crónica de bajo grado. Es posible que una combinación de estos factores, junto con el papel del estrés oxidativo y la posibilidad de una infección latente por adenovirus, inicie una cascada inflamatoria que se autoperpetúe en el tiempo, incluso tiempo después de haber desaparecido el estímulo que la inició.

Mediadores inflamatorios

Los mediadores inflamatorios implicados en la EPOC están poco definidos, y el conocimiento actual sugiere que múltiples vías de inflamación pueden estar activadas por diferentes mecanismos. Las concentraciones de leucotrieno B₄ (LTB₄), un potente quimiotáctico de neutrófilos están aumentadas en esputo de pacientes con EPOC (28). El factor de necrosis tisular alfa (TNF α) y la interleuquina 8 (IL-8) también están aumentados en esputo y lavado broncoalveolar (29). La activación de macrófagos en el pulmón de fumadores, que aparecen en cantidades hasta 10 veces mayores que en no fumadores y la activación de células epiteliales están implicados en la liberación de estas dos importantes citoquinas. Esta activación de células mononucleadas induce la expresión de moléculas de adhesión leucocitaria (ICAM-1) y E-selectinas (30) y todas ellas estarían implicadas en el reclutamiento de neutrófilos al pulmón.

Otras citocinas y marcadores han sido implicados. La IL-13, una citocina con perfil Th2 asociada con asma, ha sido recientemente implicada en

la patogénesis del enfisema en modelos animales (31). Este hallazgo apoyaría la hipótesis Holandesa del papel de la alergia y la hiperreactividad bronquial en la patogénesis del enfisema (32). El IFN γ , una citoquina con perfil Th1, es capaz de inducir la liberación de metaloproteinasas con destrucción de espacios alveolares y desarrollo de enfisema en el ratón transgénico (33). Otros trabajos han estudiado los mediadores a nivel tisular, encontrando mayor expresión de la proteína inflamatoria de los macrófagos (MIP-1 α) en macrófagos de biopsias bronquiales (34) y de factor de crecimiento transformante (TGF- β) en el epitelio alveolar y bronquial (35).

Relación con la autoinmunidad

Las enfermedades autoinmunitarias se han definido como un síndrome clínico causado por la activación de células T o B, en ausencia de infección subyacente u otra causa atribuible (36).

La respuesta inmunológica normal incluye la respuesta innata (natural) y la adquirida (adaptativa). La primera se compone por células fagocíticas (neutrófilos y macrófagos), células que liberan mediadores inflamatorios (mastocitos, eosinófilos) y células citolíticas (natural killer). La respuesta adquirida requiere la proliferación de células B y T tras la presentación de antígenos por células especializadas (macrófagos y células dendríticas).

Las enfermedades autoinmunitarias se caracterizan por la pérdida de tolerancia a autoantígenos, o bien por el desarrollo de una respuesta inmunológica adquirida hacia epítomos extraños que producen una reacción cruzada con autoantígenos.

Es interesante destacar que la EPOC comparte muchas características clínicas y fisiopatológicas con varias enfermedades autoinmunes como, por ejemplo, la artritis reumatoide (AR).

- a) Fumar es un factor de riesgo tanto para desarrollar EPOC como para la AR.
- b) Una vez iniciada la respuesta inflamatoria en la AR se autoperpetúa, y de alguna manera, esto puede ser similar a lo que ocurre en la EPOC, donde la inflamación de las vías respiratorias progresa incluso una vez que el paciente ha dejado de fumar.
- c) Tanto la AR como la EPOC se caracterizan por exacerbaciones de la enfermedad, si bien en la segunda éstas se “explican” por factores externos, como la infección o la polución. Los pacientes con EPOC a menudo presentan colonización bacteriana crónica del tracto respiratorio. En la AR se ha demostrado que la bacterias intestinales son una fuente de nuevos antígenos que contribuyen al mantenimiento del proceso inflamatorio. Por tanto, es posible que la colonización crónica de las vías respiratorias por bacterias puedan ejercer efectos similares en la EPOC. Las infecciones virales y el estrés oxidativo creado por partículas ambientales y el humo del tabaco podrían contribuir de la misma manera a la creación de epítomos nuevos o alterados. En definitiva, existen mecanismos potenciales que teóricamente pueden mantener y amplificar una respuesta inmunitaria adquirida en la EPOC.
- d) Son muy destacables las similitudes entre las células inflamatorias (neutrófilos, macrófagos y linfocitos T) y los mediadores inflamatorios

(factor de necrosis tumoral alfa, IL-6 e IL-8) implicados en la patogenia de la AR y la EPOC.

La visión actual del problema es que la inflamación crónica del pulmón es un factor patogénico primordial en la EPOC, ya que contribuye a la pérdida acelerada de función pulmonar que caracteriza a la enfermedad. Sin embargo, el tratamiento antiinflamatorio actualmente disponible (corticoides inhalados) no tiene un efecto consistente sobre la citada inflamación (37), por lo que se requieren nuevas medidas terapéuticas. Esto es particularmente importante si el proceso inflamatorio en los espacios respiratorios persiste después de abandonar el hábito tabáquico, como ya se ha comentado anteriormente.

Si la hipótesis de la EPOC como enfermedad autoinmunitaria se confirma, esto facilitaría el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas, principalmente encaminadas a la inmunomodulación. Esto podría detener la progresión de la enfermedad y prevenir los episodios de exacerbaciones, lo cual produciría una mejora importante en la calidad de vida de estos pacientes y quizá en su pronóstico, así como una significativa reducción del gasto sanitario.

Esta Tesis Doctoral se centra en el estudio de los linfocitos T alveolares, por sus propiedades de orquestadores de la respuesta inflamatoria en la EPOC.

LINFOCITOS T

Los linfocitos T son células con funciones efectoras (pro-inflamatorias) y reguladoras (anti-inflamatorias) que participan en la respuesta inflamatoria. Sobre su superficie, los linfocitos T expresan un receptor de células T (TCR), que reconoce péptidos en el surco del complejo principal de histocompatibilidad (CPH) de las células presentadoras de antígeno (CPA) y el complejo CD3, que inicia la trasducción intracelular de señales. Los linfocitos T se clasifican como $TCR_{\alpha\beta}$ y $TCR_{\gamma\delta}$ de acuerdo al TCR que expresan. Los primeros, representan aproximadamente el 95% de la población de los linfocitos T y pueden subdividirse en dos subpoblaciones principales: 1) linfocitos T $CD4+$, que en condiciones normales representan el 60-70% del total de la población de linfocitos $T_{\alpha\beta}$ y son células cooperadoras secretoras de citocinas, y 2) linfocitos T $CD8+$, que representan el 30-40% del total de la población de los linfocitos $T_{\alpha\beta}$ y son células citotóxicas. Por otro lado, los linfocitos $T_{\delta\gamma}$ representan el 5% aproximadamente del total de la población de linfocitos T. Sin embargo, éstos desempeñan una función importante en el mantenimiento de la homeostasis de las mucosas y en la reparación de los tejidos lesionados. Además, una pequeña subpoblación coexpresa el receptor $CD8$ y tiene un marcado efecto anti-inflamatorio ya que contribuye a suprimir la respuesta inmune.

Ontogenia de los Linfocitos T

Los precursores de los linfocitos T provienen de la médula ósea y maduran en el timo, para adquirir las características fenotípicas de linfocito T. En el timo, las células T precursoras deberán pasar por una serie de etapas de diferenciación hasta llegar a generar el número de clones celulares, cada uno de ellos con un TCR específico y único, capaces de reconocer un amplio espectro de proteínas antigénicas diferentes. Al final del proceso, el linfocito T podrá abandonar el timo sin ser aún una célula efectora, pero con todas las características, genotípicas y fenotípicas, para poder reconocer un determinado antígeno. La interacción de esta célula T en estado “virgen” con el antígeno, provocará su maduración hacia una célula T efectora, cooperadora o citotóxica, ahora capaz de realizar la función para la que se ha diferenciado.

El timo es el órgano exclusivo en la maduración de los linfocitos T y se desarrolla, durante la etapa embrionaria del individuo, a partir de la capa endodérmica del tercer saco faríngeo, y de la capa ectodérmica del tercer pliegue branquial. Durante el desarrollo prenatal, las células de la médula ósea que invaden el timo, para constituir los timocitos, seleccionan el repertorio de receptores antigénicos que estarán presentes en la etapa del adulto. El timo está constituido por numerosos lóbulos en cada uno de los cuales podemos observar un área cortical donde se localizan los primeros precursores que han emigrado desde la médula ósea, y una zona medular donde encontramos los últimos estadios de diferenciación tímica, y muchos de los linfocitos T, listos para ser exportados fuera del timo. El paso de la zona cortical a la medular define los diferentes estadios de diferenciación T. Además, muchos de los procesos de desarrollo y diferenciación de los linfocitos T, dependen del

microentorno tímico, constituido por elementos celulares del estroma tanto, de origen epitelial como hematopoyético.

Existen dos etapas esenciales en el proceso de diferenciación de las células T. En una primera fase, la célula precursora debe expresar correctamente el TCR, lo que implica (en el caso de los linfocitos $T_{\alpha\beta}$, el reordenamiento de los genes que constituyen las cadenas β y α , la inhibición del reordenamiento en el cromosoma homólogo (fenómeno denominado exclusión alélica), y la aparición del receptor en la superficie de los timocitos. Posteriormente, se hace necesaria una segunda fase para garantizar la correcta identificación del antígeno asociado a las moléculas de MHC (selección positiva), la entrada en funcionamiento de sistemas que le permitan prevenir la posible reactividad contra el propio organismo (selección negativa), y la asociación y la aparición de las moléculas CD4 y CD8 como correceptores del TCR.

Los primeros pasos del desarrollo tímico se caracterizan por cambios en la expresión de proteínas de membrana, y por el inicio del reordenamiento de los genes que constituyen las cadenas α y β del TCR. En esta primera fase, los precursores de la médula ósea presentes en el timo se caracterizan por expresar los antígenos de superficie CD44 (Pgp-1) y CD25 (cadena α del receptor de la IL-2), no expresar ni CD3 ni CD4, ni CD8, y por encontrarse los genes del TCR, en la configuración propia de la línea germinal. La diferenciación del linfocito T comienza con el reordenamiento de los genes de la cadena $TCR\beta$, mediado por las proteínas RAG-1 y RAG-2, al mismo tiempo que se observa en la superficie celular la pérdida de la expresión del CD44. El reordenamiento productivo de los genes V-D-J de la cadena $TCR\beta$ dispara los siguientes acontecimientos en el proceso de diferenciación:

1. La inducción de la expresión de los antígenos de superficie CD4 y CD8 (observándose timocitos TCR β +CD4+CD8+, células doble positivas).
2. El proceso de exclusión alélica.
3. Un fuerte crecimiento del tamaño del timo.
4. Un reordenamiento de los genes de la cadena TCR α .

Aunque en los timocitos maduros la cadena TCR β está asociada con la cadena TCR α , y ambas asociadas al CD3, durante el desarrollo tímico se han descrito receptores formados por dímeros de TCR β , asociados al CD3 (sin la cadena TCR $\alpha\beta$) y con la capacidad de transducir señales.

Las células CD4/8+, que expresan –aunque débilmente– el complejo TCR $\alpha\beta$ /CD3, constituyen la mayoría de los timocitos corticales. Este estadio se asocia con la expresión del antígeno CD1a, indetectable en etapas posteriores. La exclusión recíproca de los antígenos CD4 y CD8 marca el proceso siguiente de diferenciación donde se observa además un aumento en la expresión del complejo TCR/CD3 y la localización de estos timocitos maduros, CD3+CD4+ y CD3+CD8+, en la zona medular del timo.

Una vez que se expresa el TCR maduro, el linfocito T debe regular el reconocimiento del antígeno, presentado por su propio CPH, sin desencadenar una reacción autoinmune. Desde un punto de vista conceptual, la selección del repertorio de los diferentes TCR ha supuesto la superación de una difícil paradoja: para mantener la tolerancia frente a lo propio, las células con capacidad de reconocer lo propio deberían ser eliminadas durante la diferenciación, en un proceso conocido como selección negativa; sin embargo, para que el reconocimiento antigénico sea eficaz, el linfocito T debe reconocer el péptido extraño (antígeno procesado) asociado a su propio CPH, lo que

conduce a la activación y expansión clonal (selección positiva). Si las condiciones del reconocimiento de lo propio fuesen similares en ambos casos, todos los timocitos con un TCR capaz de reconocer el complejo CPH /antígeno, podrían ser eliminados y no se desarrollaría ningún linfocito T funcional.

Diferentes experimentos indican que, en los procesos de selección, juegan un papel esencial tanto las células que constituyen el timo como las interacciones que en él se producen. Además de las células hematopoyéticas que provienen de la médula ósea, el timo posee una arquitectura propia que se mantiene principalmente por la presencia de células epiteliales. La mayoría de los experimentos sugieren que es el epitelio tímico el responsable de la selección positiva, mientras que las células de origen hematopoyético median la selección negativa de los timocitos.

Es la especificidad del TCR por el complejo antígeno/MHC, presente en las células epiteliales, la que dicta tanto el modelo de selección positiva/negativa como la elección del subtipo de linfocito en el cual se desarrollará (CD4/CD8).

Activación de linfocitos T

La activación del linfocito T por un antígeno específico se produce tras un complejo proceso de interacciones celulares. Un péptido antigénico, unido a moléculas del CPH en CPA, es reconocido por linfocitos T que expresan el TCR específico para ese antígeno. Otras moléculas participan en esta respuesta. Estas moléculas, denominadas accesorias, favorecen la interacción entre células T y APCs. Así LFA-1 (CD11a/CD18) interacciona con ICAM-1 (CD54) o con ICAM-2 (CD102) o ICAM-3 (CD50); CD2 con LFA-3 (CD58); y CD4 con MHC de clase II o CD8 con MHC de clase I. Las moléculas

accesorias aumentan la estabilidad en la interacción entre las células T y APCs y promueve la activación del linfocito T al prolongar la transducción de señal.

El reconocimiento de antígeno, junto con la participación de las moléculas accesorias, desencadena una cascada de reacciones bioquímicas en el interior celular. Las moléculas accesorias que participan en la activación T son CD2, CD28 (38), CD43, CD45 (39), LFA-1, CD4 (40) y CD8 (41). Tras el reconocimiento de antígeno se genera una señal que es amplificada en el interior celular por una serie de reacciones bioquímicas, cuyo resultado final es la inducción de genes que intervienen en funciones efectoras del linfocito T activado.

Cuando el linfocito T ha sido estimulado a través del complejo TCR/CD3 se produce una rápida activación de proteínas con actividad tirosina quinasa o tirosina fosfatasa (42). Una de las proteínas que inicia la cascada de activación es la molécula accesoria CD45, a través de su actividad fosfatasa activa por defosforilación a dos proteínas quinasas de la familia de las Src denominadas p56^{lck} (Lck) y p59^{fyn} (Fyn). Tanto Lck, que interacciona con los correceptores CD4 y CD8 (43) como Fyn, asociada al receptor de la célula T (44), cuando se activan son capaces de fosforilar residuos de tirosina en las secuencias ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif) de las cadenas de CD3 (45). Las secuencias ITAM fosforiladas son sitio de unión, y a su vez de activación, de una proteína con actividad tirosina quinasa de la familia syk denominada Zap-70 (Zeta-associated protein) que se une a las cadenas ζ del TCR (46). Este conjunto de quinasas activadas fosforilan a múltiples sustratos, entre ellos PLC γ y MAPK, y se asocian a proteínas adaptadoras como PI3K. PI3K activada fosforila fosfolípidos de membrana,

generando segundos mensajeros que activan a PKC. PLC activada es reclutada en la membrana donde hidroliza el fosfolípido de membrana fosfatidil inositol 4,5 bifosfato (PIP₂). La hidrólisis de PIP₂ genera segundos mensajeros que amplifican la señal originaria producida por el TCR, el inositol 1,4,5 trifosfato (IP₃) y diacilglicerol (DAG). El DAG, que permanece en la membrana es responsable de la activación de PKC y otras muchas proteínas con actividad serina quinasa (47). IP₃, generado tras la hidrólisis de PIP₂, se une a los receptores de IP₃, que se encuentran tanto en la membrana plasmática como en la membrana del retículo endoplásmico. Estos receptores, también fosforilados por la quinasa Fyn tras la estimulación del TCR, son canales de iones calcio que están habitualmente cerrados y al unirse a IP₃ se abren, liberándose el Ca²⁺ al citoplasma. Este rápido incremento de calcio intracelular debe ser mantenido para que se produzcan la mayoría de las respuestas del linfocito T (48). El aumento de calcio actúa también como segundo mensajero, activa a múltiples quinasas y fosfatasas que dependen de calcio, como la calcineurina, para que fosforilen o defosforilen a diversas proteínas plasmáticas. Dentro de las múltiples proteínas que son fosforiladas por la PKC o por proteínas dependientes de calcio se encuentran diversos factores de transcripción nucleares, como NF-AT (nuclear factor of activated T cells), NF-κB (nuclear factor of activated B cells) o AP-1 (activated protein-1). Estos factores nucleares se unen al promotor de los genes implicados, haciéndolos más atractivos a la RNA polimerasa. Como respuesta, el núcleo comienza a transcribir un conjunto de genes que permitirán al linfocito T desarrollar sus funciones efectoras (49).

Alguno de estos genes codifican para proteínas que se inducen rápidamente tras activación, como CD69 o CD154. Estas proteínas son fundamentales en la señalización del estado funcional en que se encuentra la célula, como es el caso de CD69, o bien para transmitir la señal de activación a otras células, como CD154 que se une a la proteína de membrana CD40 del linfocito B generando señales necesarias para el cambio de isotipo de las Igs (50). Otra consecuencia importante de la activación del linfocito T es la inducción de la producción de citoquinas.

Además de la inducción prácticamente inmediata de estos genes, tras la activación del linfocito T se inicia la transcripción de toda una batería de genes que, de forma conjunta, ponen en marcha determinadas funciones efectoras. La proliferación celular al cabo de 2-3 días de los linfocitos T activados garantiza la expansión de los clones que han sido capaces de reconocer el antígeno exógeno, lo que ayuda a amplificar la respuesta inmune. Por otra lado, la activación de los linfocitos T citotóxicos, es crucial para la defensa frente a patógenos intracelulares.

MECANISMOS EFECTORES DE LA INMUNIDAD CELULAR

La inmunidad celular es la función efectora de los linfocitos T y actúa como mecanismo de defensa frente a los microorganismos que sobreviven y se replican dentro de los fagocitos y de células no fagocíticas. Históricamente se ha dividido la inmunidad adaptativa en inmunidad Humoral, que se puede transferir de forma adoptiva desde un donante inmunizado hasta un huésped virgen mediante anticuerpos en ausencia de células, e inmunidad celular, que se puede transferir adoptivamente sólo mediante linfocitos T viables. La fase efectora de la inmunidad humoral se activa por el reconocimiento del antígeno por anticuerpos secretados; por tanto, la inmunidad humoral neutraliza y elimina los microorganismos extracelulares y las toxinas que son accesibles a los anticuerpos, pero no es eficaz frente a los microorganismos del interior de las células infectadas. Por el contrario, en la inmunidad celular la fase efectora se inicia por el reconocimiento de los antígenos por los linfocitos T. Los linfocitos T reconocen antígenos proteínicos de microorganismos intracelulares que son presentados sobre las superficies de las células infectadas como péptidos unidos a las moléculas del CPH propio. Los defectos de la inmunidad celular dan lugar a un aumento de la susceptibilidad a la infección por virus y bacterias intracelulares. Las reacciones mediadas por linfocitos T también son importantes en el rechazo del aloinjerto, la inmunidad antitumoral y la autoinmunidad.

Las respuestas inmunitarias celulares suponen el desarrollo de linfocitos T efectores a partir de linfocitos vírgenes en los órganos linfáticos periféricos, la migración de estos linfocitos T efectores y de otros leucocitos hasta los focos de infección, y la activación de los leucocitos mediada por citocinas para que destruyan a los microorganismos o la destrucción directa de las células infectadas.

Aunque la inmunidad celular mediada por los linfocitos T es beneficiosa principalmente, la respuesta de los linfocitos T pueden causar algunas patologías en algunas circunstancias. Por ello, es fundamental que se mantenga una cuidadosa respuesta entre los linfocitos proinflamatorios y los protectores.

Linfocitos T CD4+ efectores

Subpoblaciones Th1 y Th2 de los linfocitos T CD4+

Los linfocitos T CD4+ se pueden diferenciar en subpoblaciones de linfocitos efectores que sintetizan diferentes conjuntos de citocinas y, por tanto, realizan diferentes funciones efectoras.

Las subpoblaciones mejor definidas de los linfocitos T efectores del linaje cooperador CD4+ son los linfocitos Th1 y Th2; el interferón γ (IFN γ) es la citocina característica de los linfocitos Th1, y la IL-4 y la IL-5 son las citocinas definitorias de los linfocitos Th2 (51). Actualmente se conoce que los linfocitos T individuales pueden expresar diferentes mezclas de citocinas, y puede haber muchas subpoblaciones con patrones heterogéneos de síntesis de citocinas, especialmente en los seres humanos. Sin embargo, las reacciones inmunitarias crónicas con frecuencia están dominadas por las subpoblaciones Th1 o Th2. Las proporciones relativas de estas subpoblaciones inducidas durante una respuesta inmunitaria son los principales determinantes de las funciones protectoras y de las consecuencias patológicas de la respuesta.

Las citocinas que sintetizan estos linfocitos T no sólo determinan sus funciones efectoras, sino que también participan en el desarrollo y la expansión de las subpoblaciones respectivas. Por ejemplo, el IFN γ secretado por los linfocitos Th1 favorece la diferenciación adicional de los linfocitos Th1 e inhibe la proliferación de los linfocitos Th2. Por el contrario, la IL-4 sintetizada por los linfocitos Th2 favorece la diferenciación de los linfocitos Th2, y la IL-10, también sintetizada por los linfocitos Th2 (así como por otras células), inhibe el desarrollo de los linfocitos Th1. Así cada subpoblación se amplifica a sí misma

y regula de forma cruzada a la subpoblación recíproca. Por este motivo, una vez que una respuesta inmunitaria se desarrolla a lo largo de una vía dada, se polariza cada vez más en esa dirección, y la polarización más extrema se ve en infecciones crónicas y en la exposición crónica a antígenos ambientales, cuando la estimulación inmunitaria es persistente. Los linfocitos Th1 y Th2 también se pueden distinguir por su expresión diferencial de moléculas de adhesión y receptores de quimiocinas y otras citocinas.

Desarrollo de las subpoblaciones Th1 y Th2

Las subpoblaciones Th1 y Th2 se desarrollan a partir de los mismos precursores, que son los linfocitos T CD4+ vírgenes, y el patrón de diferenciación está determinado por los estímulos presentes en las primeras fases de las respuestas inmunitarias. Los principales estímulos inductores de la especialización y la diferenciación son las citocinas, de modo que el INF- γ y la IL-12 son los principales inductores de los linfocitos Th1, y la IL-4 lo es de los linfocitos Th2.

La diferenciación de los linfocitos Th1 se produce en respuesta a microorganismos que infectan o activan los macrófagos y a los que activan a los linfocitos NK. La diferenciación de los linfocitos T CD4+ activados por el antígeno en efectores Th1 es estimulada por muchas bacterias intracelulares, como *Listeria* y micobacterias, y por algunos parásitos, como *Leishmania*, todos los cuales infectan a los macrófagos. También es estimulada por virus y por antígenos proteínicos administrados con adyuvantes potentes. Una característica común de todas estas infecciones y situaciones de inmunización es que provocan reacciones inmunitarias innatas que se asocian a la síntesis

de algunas citocinas como la IL-12, IL-18 e interferones de tipo 1. Algunos microorganismos se unen a los receptores de tipo Toll de los macrófagos y de las células para que secreten estas citocinas. Otros microorganismos pueden activar la secreción de las mismas indirectamente, por ejemplo, estimulando a los linfocitos NK para que sinteticen $\text{IFN}\gamma$, que a su vez actúa sobre los macrófagos para inducir la secreción de IL-12. El $\text{IFN}\gamma$ sintetizado por los linfocitos NK, así como por los propios linfocitos T que están respondiendo y tal vez también por algunos macrófagos y células dendríticas, es en sí mismo una potente citocina inductora de los linfocitos Th1. Los linfocitos T pueden potenciar adicionalmente la síntesis de citocinas por los macrófagos, en virtud de la unión del ligando CD40 (CD40L) de los linfocitos T al receptor CD40 de las células presentadoras de antígenos y estimulando la transcripción de los genes de las citocinas.

La base molecular de la diferenciación en linfocitos Th1 supone la interacción de señales procedentes del receptor de los linfocitos T, las citocinas $\text{IFN}\gamma$ y IL-12, y los factores de transcripción T-bet, STAT1 y STAT4.

Se considera que el factor de transcripción T-bet, un miembro de la familia T-box de factores de transcripción, es el principal regulador de la diferenciación de los linfocitos Th1 (52). Se induce la expresión de T-bet en los linfocitos T CD4^+ vírgenes cuando reconocen el antígeno y son expuestos al $\text{IFN}\gamma$. El $\text{IFN}\gamma$ activa el factor de transcripción STAT1, que a su vez estimula la expresión de T-bet. Después T-bet favorece la síntesis de $\text{IFN}\gamma$ mediante una combinación de activación directa de la transcripción del gen del $\text{IFN}\gamma$ e induciendo la reestructuración de la cromatina del locus del $\text{IFN}\gamma$. La capacidad del $\text{IFN}\gamma$ de

estimular la expresión de T-bet y la capacidad de T-bet de potenciar la transcripción de $\text{IFN}\gamma$ establecen un bucle de retroalimentación positiva que dirige la diferenciación de los linfocitos T hacia el fenotipo Th1. La IL-12 contribuye al compromiso al linaje Th1, uniéndose a receptores de los linfocitos T CD4^+ estimulados por el antígeno y activando el factor de transcripción STAT4, que estimula aún más la síntesis de $\text{IFN}\gamma$ (53).

La diferenciación Th2 se produce en respuesta a los helmintos y alérgenos, y supone la interacción de señales procedentes del receptor de los linfocitos T, la citocina IL-4 y los factores de transcripción GATA-3 y STAT6 (54). Los helmintos y los alérgenos producen estimulación crónica de los linfocitos T, con frecuencia si las respuestas inmunitarias innatas que son necesarias para la diferenciación a linfocitos Th1. Así los linfocitos Th2 pueden aparecer en respuestas a microorganismos y antígenos que producen una estimulación persistente o repetida de los linfocitos T con poca inflamación o activación de los macrófagos. La diferenciación de los linfocitos T estimulados por el antígeno en la subpoblación Th2 depende de la IL-4, que actúa activando el factor de transcripción STAT6, y STAT6, junto con las señales procedentes del TCR, induce la expresión de GATA-3. GATA-3 es un factor de transcripción que actúa como regulador principal de la diferenciación Th2 potenciando la expresión de los genes de la citocina de los linfocitos Th2 IL-4, IL-5 y IL-13, que están localizados en el mismo locus genético. GATA-3 actúa interactuando directamente con los promotores de estos genes, y también reestructurando la cromatina, que deja abierto el locus para que sea accesible a otros factores de transcripción. Esto es similar al mecanismo mediante el cual T-bet influye en la expresión del $\text{IFN}\gamma$. GATA-3 actúa para comprometer de forma estable a los

linfocitos en diferenciación hacia el fenotipo Th2, potenciando su propia expresión mediante un bucle de retroalimentación positiva. Además, GATA-3 bloquea la diferenciación Th1, inhibiendo la expresión de la cadena de transducción de señales del receptor de la IL-12. La participación obligatoria de la IL-4 en la diferenciación Th2 plantea una pregunta interesante: como los linfocitos Th2 diferenciados son la principal fuente de IL-4 durante las respuestas inmunitarias a antígenos proteínicos, ¿de dónde procede la IL-4 antes de que aparezcan los linfocitos Th2? Una probable explicación es que los linfocitos T CD4+ estimulados por el antígeno secretan pequeñas cantidades de IL-4 desde su activación inicial. Si el antígeno es persistente y está presente en concentraciones elevadas, la concentración de IL-4 aumenta gradualmente. Si el antígeno tampoco desencadena la inflamación con la consiguiente síntesis de IL-12, la consecuencia es una diferenciación creciente de los linfocitos T hasta subpoblaciones Th2. En algunas situaciones, la IL-4 sintetizada por los mastocitos y, posiblemente, por otras poblaciones celulares puede contribuir al desarrollo de los linfocitos Th2.

Estímulos diferentes a las citocinas también pueden influir en el patrón de diferenciación de los linfocitos T. En general, dosis elevadas de antígenos sin adyuvantes favorecen la diferenciación en linfocitos Th2. Algunos estudios indican que hay diferentes subpoblaciones de células dendríticas, que favorecen selectivamente la diferenciación en linfocitos Th1 o Th2. Además, la dotación genética del huésped es un determinante importante del patrón de diferenciación de los linfocitos T.

Respuestas inmunitarias mediadas por los linfocitos Th1

La principal función de los linfocitos Th1 es la defensa mediada por los fagocitos contra las infecciones, especialmente por microorganismos intracelulares (55). El IFN- γ sintetizado por los linfocitos Th1 estimula las actividades microbicidas de los fagocitos, favoreciendo de esta forma la destrucción intracelular de los microorganismos fagocitados. El IFN- γ también estimula la síntesis de anticuerpos IgG opsonizadores y fijadores del complemento, que favorecen la fagocitosis de los microorganismos. Muchas enfermedades autoinmunitarias específicas de órgano y reacciones inflamatorias como los granulomas se deben a una activación excesiva de los linfocitos Th1. Para activar la fase efectora de la inmunidad celular, los linfocitos T efectores deben entrar en contacto con los fagocitos o con las células infectadas que están presentando antígenos que iniciaron la respuesta. Para localizar los microorganismos en cualquier punto, los linfocitos T efectores que se expandieron en clones y que se diferenciaron en los órganos linfáticos, como los ganglios linfáticos, y que entraron en la circulación deben abandonar la vasculatura y entrar en el foco de la infección.

Respuestas inmunitarias mediadas por los linfocitos Th2

La principal función efectora de los linfocitos Th2 es favorecer las reacciones inmunitarias mediadas por IgE y eosinófilos/mastocitos, que son protectoras frente a infecciones por helmintos (56). Los helmintos son demasiado grandes para ser fagocitados y pueden ser más resistentes a las actividades microbicidas de los macrófagos que la mayoría de las bacterias y

los virus. Los linfocitos Th2 secretan IL-4, IL-5 y IL-13. La IL-4 y la IL-13 estimulan la síntesis de anticuerpos IgE específicos del helminto, opsonizan a los helmintos. La IL-5, puede activar directamente a los eosinófilos próximos a los helmintos. Los eosinófilos activados liberan el contenido de sus gránulos, incluyendo la proteína principal básica y la proteína principal catiónica, que son capaces de destruir incluso los tegumentos de los helmintos. Los mastocitos si expresan receptores de las IgE y pueden ser activados por los helmintos recubiertos de IgE, lo que da lugar a su degranulación. El contenido de los gránulos de los mastocitos incluye aminas vasoactivas, citocinas como el TNF y mediadores lipídicos, todos los cuales inducen inflamación local, que también tiene como objetivo destruir a los parásitos.

Los anticuerpos estimulados por las citocinas de los linfocitos Th2 no favorecen la fagocitosis ni activan el complemento de forma eficiente, aunque son capaces de neutralizar microorganismos y las toxinas. La IL-4 y la IL-13 también son capaces de activar los macrófagos para que expresen receptores de manosa y para que expresen enzimas que favorezcan la síntesis de colágeno y la fibrosis. Este proceso se ha denominado “activación alternativa de los macrófagos”, para distinguirlo de la activación inducida por el $IFN\gamma$, que genera potentes funciones microbicidas y que ha sido denominada “activación clásica de los macrófagos”. Los macrófagos que son activados por las citocinas de los linfocitos Th2 contribuyen a la formación de granulomas y la reestructuración hística en el contexto de las infecciones parasitarias crónicas y de las enfermedades alérgicas, respectivamente. Las citocinas sintetizadas por los linfocitos Th2 también participan en el bloqueo de la entrada y el favorecimiento de la expulsión de los microorganismos en los tejidos mucosos.

La IL-13 estimula la producción de moco, y la IL-4 puede estimular la peristalsis en el tubo digestivo. Por tanto, los linfocitos Th2 tienen una función importante en la “inmunidad de barrera” o defensa del huésped en las barreras con el entorno externo.

El alojamiento selectivo de los linfocitos Th2 en ciertos focos inflamatorios depende de citocinas particulares. Los linfocitos Th2 expresan receptores de quimiocinas (por ejemplo, CCR3, CCR4 y CCR8) que se unen a quimiocinas (por ejemplo, CCL11, CCL24, CCL7, CCL13, CCL17 y CCL22) que se expresan en concentraciones elevadas en los focos de infección por helmintos y en las reacciones alérgicas, particularmente en los tejidos mucosos.

Las respuestas inmunitarias mediadas por los linfocitos Th2 son la causa subyacente de las reacciones alérgicas, y pueden interferir con las respuestas inmunitarias protectoras mediadas por los linfocitos Th1 frente a las infecciones intracelulares.

Subpoblación Th17 de los linfocitos T CD4+

Estudios recientes han identificado una tercera subpoblación de linfocitos T CD4+ efectores diferenciados en ratones (57). Estos linfocitos se han denominado linfocitos Th17 porque la citocina característica que secretan es la IL-17. La expresión de IL-17 se ha asociado a la creciente lista de enfermedades autoinmunes e inflamatorias como la artritis reumatoide, el lupus, el asma y el rechazo de órganos (58-60)

Además, estos linfocitos no sintetizan ni IFN γ ni IL-4. De hecho, su diferenciación a partir de linfocitos T CD4+ vírgenes es inhibida por la

presencia de IFN γ o de IL-4, lo que indica que los linfocitos Th17 son una subpoblación única diferente de los linfocitos Th1 y Th2. La principal función de los linfocitos Th17 parece ser la inducción de reacciones inflamatorias, particularmente las reacciones ricas en neutrófilos. Por tanto, los linfocitos Th17 pueden ser mediadores importantes de la lesión hística en enfermedades inflamatorias del mecanismo inmunitario. Se está estudiando de forma activa si también tienen una función esencial en la defensa frente a los patógenos infecciosos y si hay una subpoblación similar en los seres humanos.

Los linfocitos Th17 se diferencian a partir de los linfocitos T CD4⁺ vírgenes mediante estimulación por el antígeno en presencia de la citocina TGF β , junto con la IL-6, IL-1 u otras citocinas pro-inflamatorias (61). Se desconoce el origen del TGF β en la diferenciación de los linfocitos Th17. Se ha propuesto que la IL-6 y otras citocinas inflamatorias puedan ser sintetizadas precozmente en los focos de lesión hística y puedan favorecer la posterior respuesta destructiva mediada por los linfocitos Th17 (62). Actualmente, se están identificando los factores de transcripción que participan en esta vía de diferenciación. La citocina IL-23, que está relacionada estrechamente con la citocina inductora de los linfocitos Th1 IL-12, favorece la supervivencia y el mantenimiento de los linfocitos Th17 diferenciados (63;64). Es interesante señalar que el TGF β estimula por sí solo el desarrollo de linfocitos T reguladores; así, esta citocina puede favorecer tanto respuestas pro-inflamatorias (Th17) como respuestas anti-inflamatorias (linfocitos T reguladores), dependiendo de qué otras citocinas estén presentes en el entorno (65).

La mejora del conocimiento de los factores que gobiernan el desarrollo de la línea de linfocitos Th17, permitirá abrir nuevas líneas de investigación que

conducirán al desarrollo de nuevos tratamientos para pacientes con enfermedades autoinmunes e inflamatorias. De hecho, ya se ha comprobado como la administración de un anticuerpo monoclonal usado antes o después de la generación de una encefalomiелitis autoinmune experimental puede prevenir el desarrollo de la enfermedad, además de confirmar el papel patogénico de la línea de los linfocitos Th17 (66)

Linfocitos T CD8+ efectores: Linfocitos T citotóxicos

Los linfocitos T CD8+ citotóxicos (LTC) son células efectoras que eliminan los microorganismos intracelulares, principalmente destruyendo las células infectadas (67). El desarrollo de una respuesta de LTC CD8+ frente a la infección avanza por pasos similares a los que se han descrito para las respuestas de los linfocitos T CD4+, incluyendo la estimulación primaria dependiente del antígeno de los linfocitos T CD8+ vírgenes en los ganglios linfáticos, la expansión clonal, la diferenciación y la migración de los LTC diferenciados hasta los tejidos.

Los LTC CD8+ han demostrado ser eficaces productores de citocinas también y pueden ser divididos en dos subtipos: Tc1 y Tc2 en función de que produzcan IFN γ o IL-4, IL-5 y IL-13, respectivamente (68).

Citotoxicidad mediada por los Linfocitos T citotóxicos

La destrucción celular por los LTC es específica del antígeno y dependiente del contacto. Los LTC destruyen dianas que expresan el mismo antígeno asociado a la clase I que desencadenó la proliferación y diferenciación de los linfocitos T CD8+ de los que derivan, y no destruyen a células no infectadas adyacentes que no expresan este antígeno. De hecho, incluso los propios LTC no se lesionan durante la destrucción de las células diana que expresan el antígeno. Esta especificidad de la función efectora garantiza que las células normales no sean destruidas por la reacción de los LTC contra las células infectadas (69).

Reconocimiento del antígeno y activación de los LTC

Los LTC se unen a las células diana, y reaccionan a ellas utilizando su receptor del antígeno, su correceptor (CD8) y las moléculas de adhesión, como la integrina antígeno asociado a la función leucocítica – 1 (LFA-1). Para que sean reconocidas en forma eficiente por los LTC, las células diana deben expresar moléculas del CPH de la clase I formando un complejo con un péptido (el complejo actúa como ligando para el receptor del linfocito T y el correceptor CD8) y la molécula de adhesión intercelular – 1 (ICAM-1, el principal ligando de LFA-1).

En el conjugado LTC-célula diana, los receptores del antígeno de los LTC reconocen a los péptidos asociados al CPH sobre la célula diana. Este reconocimiento incluye el agrupamiento de las proteínas de la membrana plasmática del linfocito T, incluyendo TCR, CD8 y LFA-1, y el agrupamiento de los ligandos de estas moléculas en la membrana de la célula diana, incluyendo el complejo peptídico / CPH e ICAM-1. Se forma una sinapsis inmunitaria entre las dos células y se generan señales bioquímicas que activan el LTC (70). Las señales bioquímicas son similares a las señales que participan en la activación de los linfocitos T cooperadores. Las citocinas y otras señales procedentes de las células dendríticas, que son necesarias para la diferenciación de los linfocitos T CD8+ vírgenes en LTC. Por tanto, una vez que los linfocitos T CD8+ específicos para un antígeno se han diferenciado en LTC completamente funcionales, pueden destruir cualquier célula nucleada que presente ese antígeno. Además del receptor de los linfocitos T, los LTC CD8+ expresan receptores que también se expresan en los linfocitos NK y que contribuyen

tanto a la regulación como a la activación de los LTC. Algunos de estos receptores pertenecen a la familia del receptor de inmunoglobulinas de los linfocitos citolíticos naturales (KIR), y que reconocen moléculas del CPH de la clase I sobre las células diana, aunque no son específicos de un complejo péptido - complejo principal de histocompatibilidad particular. Estos KIR traducen señales inhibitorias, que pueden actuar impidiendo que los LTC destruyan células normales y protegen a los LTC de la muerte celular inducida por la activación. Además, los LTC expresan el receptor NKG2D, que reconoce a las moléculas similares al CPH de la clase I MICA, MICB y ULBP, que se expresan en las células infectadas o neoplásicas. NKG2D puede actuar suministrando señales, que actúan junto con el reconocimiento del antígeno por el RLT, para potenciar la actividad lítica.

Destrucción de las células diana por los LTC

La muerte de la célula diana se produce durante las siguientes 2 a 6 horas y avanza incluso si el LTC se separa. El mecanismo principal de destrucción de la célula diana mediado por los LTC es la liberación de proteínas citotóxicas almacenadas dentro de gránulos citoplasmáticos hacia la célula diana, desencadenando de esta forma la apoptosis de la célula diana (71).

Como ya se ha mencionado, se forma rápidamente una sinapsis inmunitaria entre el LTC y la célula diana (70). Esta sinapsis se caracteriza por un anillo de aposición estrecha entre las membranas del LTC y la célula diana, mediada por la unión de LFA-1 a ICAM-1, y un hiato o espacio encerrado dentro del anillo. Dentro del anillo se pueden observar mediante microscopia con

inmunofluorescencia diferentes regiones de la membrana del LTC, incluyendo un parque de transmisiones de señales, que incluye el TCR, la proteína cinasa CO y Lck, un dominio secretor, que aparece como un espacio a un lado del parque de transmisión de señales. La activación del LTC induce la reorganización del citoesqueleto, de modo que el centro organizador de los microtúbulos del LTC se desplaza hacia la zona del citoplasma próxima al contacto con la célula diana. Los gránulos citoplasmáticos del LTC son transportados a lo largo de los microtúbulos y se concentran en la región de la sinapsis, y la membrana del gránulo se fusiona con la membrana plasmática en el dominio secretor. La fusión de las membranas da lugar a la exocitosis del contenido de los gránulos del LTC en el espacio confinado dentro del anillo sináptico, entre las membranas plasmáticas del LTC y de la célula diana.

Los gránulos de los LTC (y de los linfocitos NK) contienen varias moléculas que contribuyen a la apoptosis de las células diana (72). Estas moléculas incluyen las granzimas A, B y C, que son proteasas de serina que escinden proteínas después de los aspartatos (73); la perforina, una molécula perturbadora de la membrana homóloga a la proteína del complemento C9; y un proteoglicano sulfatado, serglicina, que tiene como función ensamblar un complejo que contiene granzimas y perforina. Es necesario que haya perforina y granzimas para la destrucción eficiente de las células diana por los LTC, y se sabe que la función principal de la perforina es facilitar la liberación de las granzimas en el citosol de la célula diana (74-76).

Una vez en el citoplasma, las granzimas esciden diversos sustratos que inician la muerte celular apoptótica. Algunas vías apoptóticas iniciadas por las granzimas implican a las caspasas (77).

Los LTC utilizan otro mecanismo de destrucción, que es mediado por interacciones de las moléculas de membrana de los LTC y de las células diana. Después de su activación, los LTC expresan una proteína de membrana, denominada ligando de Fas (FasL) o (CD95L), que se une al receptor de muerte celular Fas (CD95), que se expresa en muchos tipos celulares. Esta interacción también da lugar a la activación de las caspasas y a la apoptosis de las células diana.

Los LTC también elaboran citocinas como IFN γ y TNF, así como quimiocinas que funcionan reclutando y/o activando actividades microbicidas de células efectoras como macrófagos y neutrófilos (78).

Además, los gránulos de los LTC contienen una enzima proteolítica denominada catepsina B, que se libera hacia la superficie de los LTC después de la exocitosis de los gránulos, donde degrada las moléculas de perforina errantes que llegan a la proximidad de la membrana del LTC.

Después de asestar el “golpe mortal”, el LTC se libera de su célula diana, y este proceso se puede facilitar por disminuciones de la afinidad de las moléculas accesorias por sus ligandos.

Linfocitos T de memoria

Las respuestas inmunitarias mediadas por linfocitos T frente a un antígeno habitualmente dan lugar a la generación de linfocitos T de memoria específicos para ese antígeno, que pueden persistir durante años, incluso durante toda la vida. Estos linfocitos T de memoria son responsables de unas respuestas más rápidas y amplificadas cuando entran en contacto de nuevo con el mismo antígeno. Los linfocitos de memoria son heterogéneos y pueden derivar de los linfocitos T CD4+ o CD8+ en varias fases de su diferenciación a partir de los precursores vírgenes (79). Por ejemplo, algunos linfocitos T de memoria CD4+ pueden derivar de precursores antes del compromiso en el fenotipo Th1 o Th2, y cuando son activados por la nueva exposición al antígeno tienen la capacidad de seguir diferenciándose hacia una u otra subpoblación. Otros linfocitos T de memoria pueden proceder de precursores de linfocitos Th1 o Th2 completamente diferenciados y conservan sus perfiles de citocinas respectivos después de su reactivación. También puede haber linfocitos T CD8+ de memoria que mantienen algunas de las características fenotípicas de los LTC efectoras diferenciados.

Los linfocitos T de memoria CD4+ y CD8+ se pueden subdividir además en dos poblaciones generales, de acuerdo con sus propiedades de alojamiento preferencial y sus funciones efectoras (80). Los linfocitos T de memoria centrales expresan CCR7 y selectina L y se alojan en los ganglios linfáticos. Tienen una escasa capacidad de realizar funciones efectoras cuando encuentran el antígeno, aunque experimentan respuestas proliferativas rápidas y generan muchos linfocitos efectoras después de la provocación con el

antígeno (81). Por otro lado, los linfocitos T de memoria efectores no expresan CCR7 ni selectina L, y se alojan en los tejidos periféricos, especialmente las mucosas. Después de la estimulación antigénica, los linfocitos T de memoria efectores sintetizan citocinas efectoras, como $IFN\gamma$, aunque no proliferan mucho. Por tanto, esta subpoblación efectora está equilibrada para una respuesta inicial rápida ante la exposición repetida a un microorganismo, pero la erradicación completa puede depender de los grandes números de efectores que se generan a partir de los linfocitos T de memoria centrales (82).

El mantenimiento de los linfocitos T de memoria depende de las citocinas que están presentes de forma constitutiva en los tejidos, y que favorecen una actividad proliferativa de bajo nivel. Una de estas citocinas es la IL-7, que es necesaria para la supervivencia y el mantenimiento de los linfocitos T de memoria, tanto CD4+ como CD8+, a partir de linfocitos activados por el antígeno(83;84). Como es predecible, los linfocitos T de memoria, expresan concentraciones elevadas del receptor de la IL-7. El mantenimiento de los linfocitos T de memoria CD8+ también puede precisar IL-15 (85). En respuesta a la IL-17 y/o la IL-15, los linfocitos T de memoria experimentan una proliferación de bajo nivel, que mantiene las poblaciones de los linfocitos T de memoria durante períodos de tiempo prolongados. Esta proliferación homeostática de los linfocitos T de memoria no precisa antígenos peptídicos presentados sobre moléculas del CPH.

MECANISMOS REGULADORES DE LA INMUNIDAD CELULAR

Tolerancia periférica en los linfocitos T

Muchos y sofisticados mecanismos existen para mantener la homeostasis inmune, para prevenir procesos autoinmunes y para moderar respuestas inflamatorias inducidas por patógenos e insultos ambientales.

La tolerancia periférica es el mecanismo mediante el cual los linfocitos T maduros que reconocen antígenos propios en tejidos periféricos se hacen incapaces de responder posteriormente a estos antígenos. Los mecanismos de la tolerancia periférica son responsables de la tolerancia de los linfocitos T a antígenos propios específicos de tejido que no son abundantes en el timo.

La tolerancia periférica se debe a anergia, eliminación de los linfocitos T mediante muerte celular apoptótica o supresión de los linfocitos T autoreactivos por los linfocitos T reguladores. Se desconoce si la tolerancia a diferentes antígenos propios la mantiene uno u otro mecanismo o si todos estos mecanismos actúan de forma concertada para evitar una autoinmunidad peligrosa.

Linfocitos T reguladores

Los linfocitos T reguladores (Treg) son un subconjunto de linfocitos T CD4+ que desempeñan un papel fundamental en el control de la respuesta inmunitaria. Entre sus funciones se encuentran: la prevención de enfermedades

autoinmunes, como la diabetes tipo 1, limitan las enfermedades inflamatorias crónicas, como el asma y la enfermedad inflamatoria intestinal, constituyen el mecanismo principal de tolerancia periférica, limitan la inmunidad antitumoral y además, estas células podrían aprovecharse para mejorar la tolerancia de trasplantes.

En los últimos años se han realizado grandes avances en identificar y comprender las moléculas y mecanismos que las células Treg utilizan para ejercer sus funciones. La mayoría de estos linfocitos Treg CD4⁺ expresa concentraciones elevadas de la cadena α del receptor de la interleucina-2 (IL-2) (CD25), pero no otros marcadores de activación. Los linfocitos Treg se generan principalmente por el reconocimiento de antígenos propios en el timo, aunque también aparecen en los órganos linfáticos periféricos. La generación y la supervivencia de los linfocitos T reguladores dependen de las citocinas TGF β e IL-2 y de la coestimulación por la vía de B7:CD28. No está claro qué función tienen exactamente estas señales en el desarrollo de los linfocitos reguladores. Tampoco se sabe qué estímulos determinan si un linfocito T se va a convertir en un linfocito efector o de memoria o en un linfocito regulador. Un factor de transcripción denominado FoxP3, que es miembro de la familia *forkhead* de factores de transcripción, es crítico para el desarrollo, mantenimiento y la función de la mayoría de los linfocitos Treg. La importancia de los linfocitos reguladores en el mantenimiento de la autotolerancia queda ilustrada por muchas observaciones en animales de experimentación y en seres humanos.

- Si se extraen todos los linfocitos CD25⁺ de los linfocitos T CD4⁺ de un ratón normal y son transferidos a un ratón singénico deficiente en linfocitos, el receptor presenta enfermedad autoinmunitaria multiorgánica

que afecta a tiroides, el colon, el estómago y otros órganos. Si los linfocitos T CD4+CD25+ procedentes del ratón normal son transferidos junto a los linfocitos CD25-, se impide la inducción de la enfermedad. La interpretación de este experimento es que en el ratón normal hay linfocitos T capaces de reaccionar frente a antígenos propios, y que están bajo control por los linfocitos reguladores que se han desarrollado en respuesta al reconocimiento de los antígenos propios. Cuando los linfocitos T CD25- son transferidos a un receptor que no tiene otros linfocitos, no se les puede controlar, lo que produce autoinmunidad. La cotransferencia de linfocitos Treg CD25+ impide la autoinmunidad.

- Los ratones con mutaciones del gen FoxP3, o los ratones en los que se ha inactivado este gen, presentan una enfermedad autoinmunitaria multisistémica asociada a la falta de linfocitos Treg CD25+. Una enfermedad autoinmunitaria infrecuente en seres humanos denominada IPEX (alteración de la regulación inmunitaria, poliendocrinopatía, enteropatía y síndrome ligado al cromosoma X) también se asocia a deficiencia de los linfocitos Treg y ahora se sabe que está producida por mutaciones del gen FOXP3.
- Los ratones en los que se inactiva el gen de la IL-2 o de las cadenas α o β del receptor de la IL-2 presentan autoinmunidad, que se manifiesta por enfermedad inflamatoria intestinal, anemia hemolítica autoinmunitaria y múltiples autoanticuerpos (incluyendo anticuerpos antieritrocíticos y anti-ADN). Estos ratones carecen de los linfocitos Treg CD25+, y su enfermedad se puede corregir inyectando linfocitos T CD4+CD25+ normales en los ratones con inactivación génica del IL-2R.

Los linfocitos Treg reconocen antígenos propios, y son generados por el reconocimiento de los antígenos propios, aunque no está definida la gama de la especificidad y la diversidad de sus receptores en los individuos normales.

El conocimiento de los mecanismos de las células Treg es fundamental no sólo por el conocimiento que aporta sobre el control del proceso de la tolerancia periférica sino porque puede servir para identificar potenciales dianas terapéuticas.

Un mecanismo mediante el cual estos linfocitos controlan las respuestas inmunitarias es mediante la secreción de citocinas inmunosupresoras como la IL-10, que inhiben la función de los macrófagos y las células dendríticas. En muchos modelos experimentales la función de los linfocitos Treg también parece depender de la citocina factor transformador del crecimiento – β (TGF β), que inhibe las respuestas de macrófagos y linfocitos. Por tanto, los linfocitos T reguladores que secretan estas citocinas inhibitorias pueden bloquear la activación de las células efectoras de otros linfocitos T. Se han propuesto otros mecanismos de inhibición; algunos experimentos in vitro indican que los linfocitos Treg actúan estableciendo contacto directamente con las CPA o respondiendo a los linfocitos T, pero no está claro como ejercen la supresión. Aunque se ha puesto énfasis en los linfocitos T CD4⁺ CD25⁺ que expresan FoxP3, se han descrito otras muchas poblaciones que son capaces de suprimir las respuestas inmunitarias, aunque la importancia de estas poblaciones no está bien establecida. Se están haciendo muchos intentos para identificar defectos del desarrollo o la función de los linfocitos Treg en las enfermedades

autoinmunitarias, como la diabetes tipo 1 y la esclerosis múltiple, en seres humanos. Todavía no se sabe si estos defectos son factores importantes en la patogenia de las enfermedades autoinmunitarias. Hay un gran potencial para generar linfocitos reguladores y utilizarlos para controlar respuestas inmunitarias anormales, y se están realizando muchos intentos para obtener estas estrategias terapéuticas.

Linfocitos T $\gamma\delta$

El TCR $\gamma\delta$ es un segundo tipo de heterodímero diferente, unido por puentes disulfuro, que se expresa en un pequeño grupo de linfocitos que no expresan T $\alpha\beta$ asociado a proteínas CD3 y ζ . Las cadenas γ y δ del TCR están formadas por regiones extracelulares V y C similares a las de las Ig, regiones conectoras o bisagra cortas, segmentos transmembranarios hidrófobos y colas citoplasmáticas cortas, semejantes a las cadenas α y β . Las regiones bisagra contienen cisteínas que intervienen en los puentes disulfuro que hay entre las cadenas. El heterodímero $\gamma\delta$ se asocia a las proteínas CD3 y ζ de la misma forma que lo hacen los heterodímeros $\alpha\beta$ del TCR. La mayoría de los linfocitos T $\gamma\delta$ no expresa CD4 ni CD8. Se han adscrito diversas actividades biológicas a los linfocitos T $\gamma\delta$ que también son características de los linfocitos T $\alpha\beta$, tales como la secreción de citocinas y la lisis de células diana.

Los linfocitos T $\gamma\delta$ son un linaje distinto al de los linfocitos T restringidos por el CPH que expresan $\alpha\beta$, que son más numerosos. Los porcentajes de linfocitos T $\gamma\delta$ varían mucho en diferentes tejidos y especies, pero en conjunto menos de un 5% de todos los linfocitos expresa esta forma de

TCR. Se pueden desarrollar diferentes subconjuntos de linfocitos $T\gamma\delta$ en distintos momentos de la ontogenia, pueden contener diferentes regiones V y pueden poblar diversos tejidos. Por ejemplo, en el ratón, muchos de los linfocitos $T\gamma\delta$ cutáneos se desarrollan en la vida neonatal y expresan un TCR particular que prácticamente no muestra variabilidad en la región V, mientras que muchos de los linfocitos $T\gamma\delta$ de la vagina, el útero y la lengua aparecen más tarde y expresan otro TCR con una región V diferente. No se sabe si estos subconjuntos realizan funciones diferentes, pero las regiones V distintas hacen pensar que estos subconjuntos pueden ser específicos frente a distintos ligandos. Una característica intrigante de los linfocitos $T\gamma\delta$ es su abundancia en los tejidos epiteliales de ciertas especies. Por ejemplo, más del 50% de los linfocitos de la mucosa del intestino delgado de los ratones y los pollos, denominados linfocitos intraepiteliales, son linfocitos T que expresan $\gamma\delta$. En la piel del ratón, la mayoría de los linfocitos T intraepidérmicos expresa el receptor $\gamma\delta$. Las poblaciones celulares equivalentes no son tan abundantes en los seres humanos; sólo alrededor del 10% de los linfocitos T intraepiteliales intestinales expresan el receptor $\gamma\delta$.

Los linfocitos $\gamma\delta$, junto con los linfocitos T NK, los linfocitos B (B1 y MZ), pueden representar un puente importante entre la inmunidad innata y la adaptativa, actuando como linfocitos que potencian la primera línea de defensa contra diversos patógenos. Los linfocitos $\gamma\delta$ no reconocen antígenos peptídicos asociados al CPH ni están restringidos por el CPH. Algunas colonias de linfocitos $T\gamma\delta$ reconocen moléculas fosforiladas pequeñas, alquilaminas o lípidos, que pueden ser presentados por moléculas similares al CPH de la clase I (no clásicas) y que se encuentran habitualmente en micobacterias y otros

microbios. Otros linfocitos $T\gamma\delta$ reconocen antígenos proteínicos o no proteínicos que no precisan procesamiento ni ningún tipo de CPA para su presentación. Muchos linfocitos $T\gamma\delta$ son activados por las proteínas microbianas del shock térmico. La diversidad limitada de los TCR $\gamma\delta$ de muchos tejidos indica que los ligandos de estos receptores son invariables y conservados. Una hipótesis de trabajo sobre la especificidad de los linfocitos $T\gamma\delta$ es que pueden reconocer antígenos que se encuentran con frecuencia en las fronteras epiteliales entre el huésped y el medio externo. Por tanto, pueden iniciar respuestas inmunitarias frente a un pequeño número de microbios frecuentes en estos lugares, antes del reclutamiento de linfocitos $T\alpha\beta$ específicos frente a antígenos. Sin embargo, los ratones que carecen de linfocitos $\gamma\delta$, creados mediante una anulación dirigida del gen del TCR γ o δ , presentan una inmunodeficiencia escasa o nula y sólo un ligero aumento a la sensibilidad a infecciones por algunas bacterias intracelulares.

Tabla 1. Principales subpoblaciones de linfocitos

	Fenotipo	Funciones inmunitarias
Linfocito T virgen $\alpha\beta$	CD3+CD45RA+ TCR $\alpha\beta$ +	Inmunidad adaptativa celular, reconocimiento antigénico restringido por el CPH I/II
TEM	CD3+CD45RO+ CD62L-CCR7-	High peripheral precursor frequency Respuesta efectora rápida,
TCM	CD3+CD45RO+ CD62L+CCR7+	High precursor frequency en órganos linfáticos. Rápida proliferación.
Th1	CD3+CD4+ (Tbet+)	Inmunidad mediada por células, activación de macrófagos, producen IFN γ , TNF
Th2	CD3+CD4+ (GATA3+)	Cooperan con los linfocitos B, inflamación, procesos alérgicos, producen IL-4, IL-5 y IL-13
TH17	CD3+CD4+ (ROR γ 1+)	Hiperinflamación, defensa del huésped producen IL-17, IL17F, TNF
Treg	CD3+CD4+CD25+ (FOXP3+)	Supresión contacto dependiente, producen IL-10, TGF β
Treg tipo 1	CD3+CD4+	Regulación inmune, alta producción de IL-10
Linfocito T citotóxico	CD3+CD8+ (Eomes+Tbet+)	Inmunidad mediada por células, citotoxicidad antígeno-específica, producen IFN γ , TNF, perforina, granzimas
NKT	CD3+CD56+	Múltiples funciones en la respuesta inmune, producen IFN γ /TNF o IL-4/IL-13
Linfocitos T $\gamma\delta$	CD3+TCR $\gamma\delta$ + CD4- CD8-	Componentes de la inmunidad de barreras (mucosas, epitelios), alguna Citotoxicidad, producen IFN γ , TNF
Linfocito B virgen	CD19+IgM+IgD+	Inmunidad adaptativa humoral, anticuerpos naturales, CPA
Linfocitos B memoria	CD19+CD27+ IgM+	BCR de alta afinidad, rápida proliferación y diferenciación
Switched memory	CD19+CD27+IgM-	BCR de alta afinidad, rápida respuesta, anticuerpos con funciones específicas efectoras
Células plasmáticas	CD38+CD138+	Producción de anticuerpos constitutivamente de alta afinidad
Células NK	CD3-D56+CD94+	Citotoxicidad innata, DAC, producen IFN γ , TNF, perforina, granzima
Células NKCD 56bright	CD56bright CD16+/-	Más producción de citocinas, menos citotoxicidad
Células NKCD 56DIM	CD 56DIMCD16+	Más citotoxicidad, menos producción de citocinas

HIPÓTESIS DE LA TESIS DOCTORAL

La hipótesis de esta Tesis Doctoral es que alteraciones de la respuesta inmune adquirida pueden jugar un papel patogénico importante en la respuesta inflamatoria que caracteriza a la EPOC.

Esta hipótesis se basa en las siguientes observaciones, discutidas previamente.

- 1) Presencia de linfocitos activados en el órgano diana (pulmón), lo que sugiere la participación de la respuesta inmune adquirida en la patogénesis de la enfermedad.
- 2) Aparición de la enfermedad únicamente en un porcentaje de fumadores y en aquéllos con una predisposición familiar, lo que sugiere un componente genético de susceptibilidad.
- 3) Persistencia de la inflamación al cesar el estímulo que lo inició (tabaquismo), lo que indica la existencia de algún mecanismo de auto perpetuación de la enfermedad como ocurre en otras enfermedades autoinmunes.

OBJETIVOS GENERALES

Para evaluar la hipótesis planteada se han estudiado diversos aspectos de la respuesta inmune celular en pacientes con EPOC (por definición susceptibles al tabaco), sujetos fumadores con función pulmonar normal (no susceptibles) y controles sanos no fumadores (no sometidos a los efectos del tabaco *per se*).

Ello ha llevado a la publicación de tres trabajos en dos importantes revistas científicas con un alto factor de impacto: European Respiratory Journal (Eur Respir J, FI: 5.349) y Clinical and Experimental Immunology (Clin Exp Immunol, FI: 2.599), siendo el factor de Impacto acumulado de los tres trabajos de: 13.297). En el primer estudio se investigaron las diferentes subpoblaciones de linfocitos T circulantes y pulmonares (TCR- $\alpha\beta$ y TCR- $\gamma\delta$); en el segundo trabajo se estudiaron el patrón intracelular de expresión de citoquinas Th1/Tc1 y Th2/Tc2 en los linfocitos T (CD4+ y CD8+) de pacientes con EPOC, de sangre periférica y lavado broncoalveolar; y en el tercer trabajo se investigaron los marcadores de maduración (CD45RA, CD45R0) y activación (CD28) en linfocitos T CD4+ y CD8+, así como la distribución de linfocitos T reguladores CD4+CD25+ en pacientes con EPOC, sujetos fumadores y no fumadores

A continuación se presentan las hipótesis y objetivos de los tres estudios indicados y cuyos resultados constituyen el núcleo fundamental de la presente Tesis Doctoral.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS DE LA TESIS DOCTORAL

ESTUDIO I

Distribución de las subpoblaciones de linfocitos T circulantes y pulmonares en pacientes con EPOC.

Hipótesis

Estudios anteriores han informado del incremento del número de linfocitos T en el parénquima pulmonar y en el tejido bronquial de pacientes con EPOC, predominantemente CD8⁺ (así como un cociente CD4⁺:CD8⁺ disminuido) (86-88). Sin embargo, se conoce poco el papel de los linfocitos T $\gamma\delta$ en la EPOC. Debido a que esta subpoblación de linfocitos ejerce una importante función en la reparación del tejido epitelial (89), es posible que anomalías en su regulación puedan contribuir a la patogénesis de la enfermedad. Además, se desconoce si anomalías en la distribución de linfocitos T pueden representar un evento inflamatorio local o pueden representar un evento inflamatorio sistémico (90). Finalmente, considerando que el cociente de linfocitos T CD4⁺:CD8⁺ parece estar genéticamente determinado (91), sería plausible que los pulmones de los sujetos fumadores con un cociente CD4⁺:CD8⁺ intrínsecamente disminuidos podrían ser más susceptibles a los efectos dañinos del tabaco.

Objetivos

Comparar el porcentaje de las diferentes subpoblaciones de linfocitos T circulantes y pulmonares ($TCR_{\alpha\beta}$ y $TCR_{\gamma\delta}$) que están implicados en el proceso inflamatorio que subyace en la EPOC respecto a los porcentajes en los sujetos fumadores y sujetos no fumadores con la función respiratoria conservada.

ESTUDIO II

Patrón de expresión de citoquinas intracelulares de linfocitos T en pacientes con EPOC

Hipótesis

Estudios anteriores han intentado caracterizar el patrón de producción de citoquinas por los linfocitos T en la EPOC pero los resultados son contradictorios. Algunos de ellos, han informado que el patrón de respuesta en pacientes con EPOC es de tipo Th2/Tc2, predominantemente (92-94), mientras que otros han encontrado un patrón de tipo Th1/Tc1 (95-97). Las razones de dichas diferencias pueden ser debidas al distinto origen de las muestras utilizadas (sangre, tejido bronquial, alveolar), las diferentes subpoblaciones de linfocitos T estudiados (CD4 +, CD8 +) o el limitado número de citoquinas estudiadas en algunos trabajos.

Aunque este estudio es descriptivo, una descripción detallada del patrón de expresión de citoquinas por los linfocitos T en pacientes con EPOC, es esencial para comprender los mecanismos moleculares que conducen a una respuesta inflamatoria anormal que caracteriza la enfermedad.

Objetivo

Definir el patrón intracelular de expresión de citoquinas Th1/Tc1 y Th2/Tc2 en los linfocitos T de pacientes con EPOC, analizando en ambas subpoblaciones (CD4+ and CD8+) y aislados de sangre periférica y lavado broncoalveolar (BAL).

ESTUDIO III

Caracterización fenotípica de linfocitos T y respuesta anómala de la subpoblación de linfocitos T reguladores en pacientes con EPOC.

Hipótesis

El concepto de que la EPOC pueda tener un componente de autoinmunidad ha sido objeto de estudios recientes (98-100). Esta hipótesis está avalada por diferentes líneas de evidencia, particularmente por el hecho que la respuesta inflamatoria que caracteriza la EPOC persiste después del cese del hábito tabáquico (101-104), lo cual sugiere un proceso de auto-perpetuación (105;106) similar al que ocurre en las enfermedades autoinmunes (107-109). Además, la hipótesis se sustenta en recientes datos que muestran la presencia de linfocitos T CD4+ oligoclonales en los pulmones de pacientes con enfisema severo (110); la posibilidad de inducir enfisema autoinmune en modelos experimentales animales[15]; y la muy reciente demostración de anticuerpos circulantes anti-elastina en pacientes con enfisema (111).

Una pequeña subpoblación de linfocitos T CD4+CD25+, también conocidos como células T reguladores (Treg), y que ejercen efectos antiinflamatorios e inmunomodulares ha sido identificado recientemente (112;113). Anormalidades en la regulación de los Tregs han sido descritas en algunas enfermedades crónicas inflamatorias y autoinmunes, incluyendo arterosclerosis y artritis reumatoide (114-117), pero su implicación en la EPOC es desconocida.

Objetivos

- 1) Investigar los marcadores de maduración (CD45RA, CD45R0) y activación (CD28) en linfocitos T CD4+ y CD8+, ya que ambos tipos celulares pueden jugar un papel principal en la patogénesis de la EPOC.
- 2) Investigar la presencia de diferencias en la distribución de linfocitos CD4+CD25+ Treg en fumadores con y sin EPOC, así como en no fumadores.

ARTÍCULOS PUBLICADOS

ESTUDIO I

Blunted gamma delta T-lymphocyte response in chronic obstructive pulmonary disease.

Eur Respir J. 2005 Mar; 25(3):441-6.

Pons J, Sauleda J, Ferrer JM, **Barceló B**, Fuster A, Regueiro V, Julià MR, Agustí AG.



Blunted $\gamma\delta$ T-lymphocyte response in chronic obstructive pulmonary disease

J. Pons^{*,#}, J. Sauleda[†], J.M. Ferrer[#], B. Barceló⁺, A. Fuster[#], V. Regueiro^{*}, M.R. Julià[#] and A.G.N. Agustí^{*,†}

ABSTRACT: Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is characterised by an excessive inflammatory response to inhaled particles, mostly tobacco smoking. Although inflammation is present in all smokers, only a percentage of them develop COPD. T-lymphocytes are important effector and regulatory cells that participate actively in the inflammatory response of COPD. They comprise the T-cell receptor (TCR)- $\alpha\beta$ (CD4⁺ and CD8⁺) and TCR- $\gamma\delta$ T-lymphocytes. The latter represent a small percentage of the total T-cell population, but play a key role in tissue repair and mucosal homeostasis.

To investigate TCR- $\alpha\beta$ (CD4⁺ and CD8⁺) and TCR- $\gamma\delta$ T-lymphocytes in COPD, the present authors determined, by flow cytometry, the distribution of both subpopulations in peripheral blood and bronchoalveolar lavage (BAL) samples obtained from patients with COPD, smokers with normal lung function and never-smokers.

The present study found that: 1) the distribution of CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes in blood and BAL was similar in all three groups; 2) compared with nonsmokers, $\gamma\delta$ T-lymphocytes were significantly increased in smokers with preserved lung function; and 3) this response was blunted in patients with COPD.

These results highlight a novel, potentially relevant, pathogenic mechanism in chronic obstructive pulmonary disease.

KEYWORDS: Flow cytometry, lung inflammation, mucosal homeostasis, tissue repair

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is characterised by a marked inflammatory response of the airways and lung parenchyma to inhaled particles, mostly tobacco smoking [1]. Inflammation is usually present in the lungs of smokers, but, for reasons that are still poorly understood, only a percentage of them develop airflow limitation [2].

T-lymphocytes are key inflammatory effector and regulatory cells that participate in the inflammatory response of COPD [3]. On their cell surface, T-lymphocytes express the T cell receptor (TCR), which recognises peptides in the groove of the major histocompatibility complex of antigen-presenting cells, and the CD3 complex, which initiates intracellular signal transduction pathways [4]. T-cells are classified as TCR- $\alpha\beta$ and TCR- $\gamma\delta$ according to the TCR expressed. The former comprise ~95% of the T-cell population and can be subdivided in two main subpopulations including: 1) CD4⁺ T-lymphocytes, which, under normal conditions comprise 60–70% of the total TCR- $\alpha\beta$ population and are cytokine-secreting helper cells, and 2) CD8⁺ T-lymphocytes, which represent 30–40% of it and are cytotoxic

killer cells. In contrast, TCR- $\gamma\delta$ lymphocytes account for only ~5% of the total T-cell subpopulation. However, they play a key role in mucosal homeostasis and the reparative response to tissue damage [5]. Furthermore, those $\gamma\delta$ T-cells that coexpress the CD8 receptor have marked anti-inflammatory effects and contribute to suppress the cell-mediated immune response [6].

Previous studies have reported increased numbers of T-lymphocytes in the lung parenchyma and bronchial tissue of patients with COPD, predominantly CD8⁺ (thus with a low CD4⁺:CD8⁺ ratio) [7–9]. In contrast, much less is known about the role of $\gamma\delta$ T-lymphocytes in COPD. However, given their important role in epithelial repair [10], it is possible that abnormalities in their regulation can contribute to the pathogenesis of the disease. Further, whether abnormalities in T-lymphocyte distribution represent a local inflammatory event or reflect a systemic abnormality is unclear [11], but it is worth noting that the CD4⁺:CD8⁺ ratio of circulating lymphocytes appears to be genetically determined [12]. Thus, it is possible that the lungs

AFFILIATIONS

*Unidad de Investigación, #Inmunología, †Neumología, and *Análisis Clínicos, Hospital Universitario Son Dureta, Institut Universitari d'Investigació en Ciències de la Salut (IUNICS), Palma de Mallorca, Spain.

CORRESPONDENCE

A.G.N. Agustí
Servei de Pneumologia
Hospital Universitari Son Dureta
Andrea Doria 55
07014- Palma de Mallorca
Spain
Fax: 34 971175228
E-mail: aagusti@hsd.es

Received:

June 10 2004

Accepted after revision:

November 28 2004

of smokers with intrinsically low CD4⁺:CD8⁺ ratios are more susceptible to the damaging effects of smoking. COSTABEL *et al.* [13] previously investigated this question in bronchoalveolar lavage (BAL) and peripheral blood samples of smokers (with and without chronic mucous production) and nonsmokers. Unfortunately, however, COPD smokers were not studied.

To better characterise the percentage of the different T-lymphocyte subpopulations in the inflammatory process that underlies COPD, the present study sought to compare the distribution of circulating and pulmonary TCR- $\alpha\beta$ and TCR- $\gamma\delta$ T-lymphocytes in COPD patients, smokers with normal lung function and nonsmokers.

METHODS

Population and ethics

All participants required bronchoscopy for the clinical evaluation of a solitary pulmonary nodule or haemoptysis, and gave their written consent after being fully informed of the nature, characteristics, risks and potential benefits of the study, which was previously approved by the local ethics committee, Hospital Son Dureta, Palma de Mallorca, Spain. COPD patients were clinically stable and had not had an exacerbation during the last 3 months. All of them were being treated with inhaled bronchodilators. Six patients also received inhaled steroids, but none was on oral steroid therapy. Subjects with atopic diseases, allergic rhinitis and asthma were excluded. To avoid any potential effect of acute smoking, active smokers refrained from smoking 12 h before bronchoscopy. Exhaled carbon monoxide concentration was <10 parts per million in all subjects.

Lung function

Forced spirometry (Gold standard; Warren E. Collins, Braintree, MA, USA) was obtained in all participants [14]. Spirometric reference values were those of a Mediterranean population [15].

Bronchoalveolar lavage fluid and blood samples

Bronchoscopy was performed with a flexible fiberoptic bronchoscope (Pentax 15v; Pentax, Tokyo, Japan). Under topical lidocaine, BAL was performed by instilling eight 25-mL aliquots of sterile saline solution in one pulmonary segment of a lower lobe without any lung nodules. The liquid recovered was filtered, washed twice in PBS and resuspended at 10^6 cells·mL⁻¹ in RPMI-1640 medium at 4°C. Blood samples were collected before bronchoscopy by peripheral venipuncture.

Flow cytometry

BAL and blood samples were incubated with a combination of anti-CD4 fluorescein isothiocyanate (FITC), anti-CD8 Phycoerythrin (PE) and anti-CD3 Phycoerythrin-Cyanin 5 (PC5) or anti-CD8 FITC, anti-TCR- $\gamma\delta$ PE and anti-CD3 PC5 conjugated monoclonal antibodies (Coulter Immunotech, Izasa, Spain) for 15 min at room temperature in the dark. Then, 2 mL of lysing solution (Becton Dickinson, Madrid, Spain) was added, and cells were washed and resuspended in PBS. The analysis was carried out in an Epics XL flow cytometer using the Expo32 software (Coulter Immunotech). The percentage of CD4⁺, CD8⁺, $\gamma\delta$ and $\gamma\delta$ CD8⁺ was referred

to as the total amount of T-lymphocytes (CD3⁺ cells) gating on a side *versus* the CD3 dot plot.

Statistical analysis

One-way ANOVA with Bonferroni contrasts was used to compare differences between groups. A p-value <0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

Clinical and functional findings

Table 1 shows the main clinical and functional characteristics of the three groups studied. COPD patients were slightly older than the other two groups. The smoking history of patients with COPD and smokers with normal lung function was similar. Patients with COPD showed moderate airflow obstruction, whereas spirometry was normal in the other two groups.

Circulating and pulmonary $\alpha\beta$ T-lymphocytes

In blood, the percentage of CD4⁺ (60.0 ± 4.7 , 57.1 ± 2.7 and $60.2 \pm 3.1\%$; fig. 1a) or CD8⁺ T-lymphocytes (35.6 ± 4.6 , 35.2 ± 2.6 and $34.6 \pm 3.0\%$; fig. 1b) was similar in COPD patients, smokers with normal lung function and never smokers, respectively. In BAL, the present authors observed a trend towards lower levels of CD4⁺ T-cells in smokers (with or without COPD; 50.6 ± 3.5 and 50.7 ± 4.3 , respectively) than in nonsmokers ($65.2 \pm 4.9\%$; fig. 1c), and a corresponding trend towards higher CD8⁺ T-cell values in COPD patients and smokers with normal lung function (42.5 ± 2.9 and $41.2 \pm 4.6\%$, respectively) than in nonsmokers ($30.9 \pm 4.7\%$; fig. 1d). However, none of these differences reached statistical significance.

Circulating and pulmonary $\gamma\delta$ T-lymphocytes

The percentage of circulating $\gamma\delta$ T-lymphocytes was higher in smokers with normal lung function ($5.0 \pm 0.8\%$) than in nonsmokers ($3.2 \pm 0.8\%$) or COPD patients ($2.4 \pm 0.4\%$, $p < 0.05$; fig. 2a). In contrast, double positive $\gamma\delta$ CD8⁺ were not different ($p = 0.2$) between groups (fig. 2b). In BAL, smokers with normal lung function also showed a significant upregulation of $\gamma\delta$ T-lymphocytes compared with nonsmokers (8.2 ± 1.0 *versus* $1.4 \pm 0.3\%$, $p < 0.001$; fig. 2c). Interestingly, this response was blunted in COPD patients ($3.6 \pm 0.6\%$, $p < 0.001$). The $\gamma\delta$ CD8⁺ double positive subpopulation was also higher in

TABLE 1 Clinical and functional data of the subjects

	Never-smokers	Smokers [#]	COPD
Subjects n	10	20	20
Age yrs	57.8 ± 6.3	58.0 ± 1.9	$66.4 \pm 1.6^*$
Smoking history	0	41.1 ± 3.2	52.1 ± 4.7
pack-yrs			
FEV1 % pred	95.8 ± 5.1	91.3 ± 2.5	$55.4 \pm 3.0^+$
FEV1/FVC %	81.8 ± 2.5	77.0 ± 1.7	$52.5 \pm 2.1^+$

Data are presented as n and mean \pm SD. COPD: chronic obstructive pulmonary disease; FEV1: forced expiratory volume in one second; FVC: forced vital capacity. #: with normal lung function; *: $p < 0.05$ COPD *versus* smokers with normal lung function; +: $p < 0.0001$ COPD *versus* smokers with normal lung function and nonsmokers.

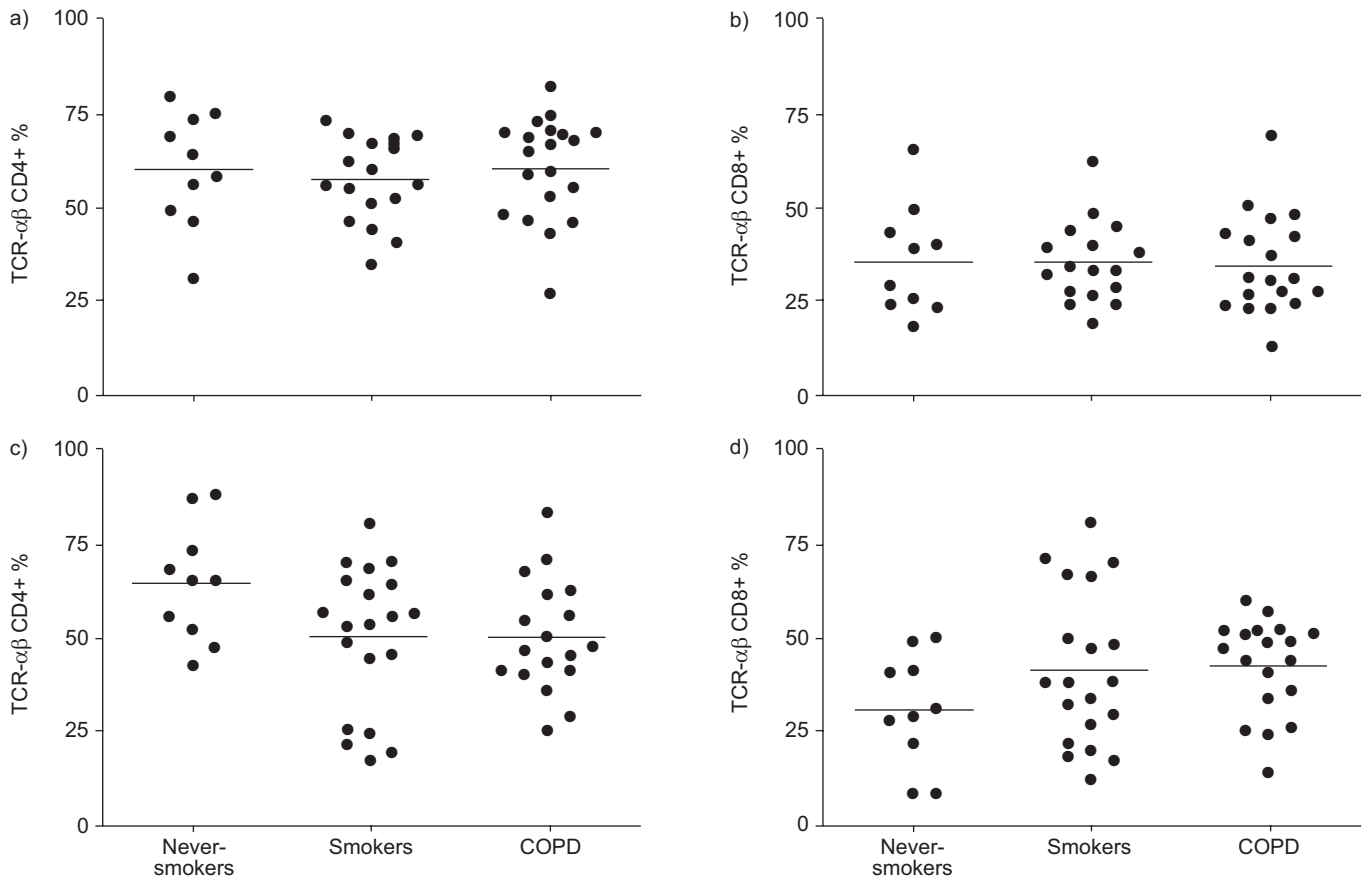


FIGURE 1. Percentage of T-cell receptor (TCR)- $\alpha\beta$ CD4+ and CD8+ T-lymphocytes in peripheral blood (a and b) and bronchoalveolar lavage samples (c and d) in never-smokers, smokers with normal lung function and chronic obstructive pulmonary disease (COPD) patients. Horizontal bars represent the mean value. Differences between groups did not reach statistical significance.

smokers with normal lung function ($3.6 \pm 0.8\%$) than in COPD patients ($0.4 \pm 0.1\%$, $p < 0.001$) or nonsmokers ($0.5 \pm 0.2\%$, $p < 0.01$; fig. 2d). These results were unchanged if COPD patients receiving treatment with inhaled steroids ($n=6$) were excluded from the analysis (data not shown).

Figure 3a shows the percentage of pulmonary $\gamma\delta$ T-cells in patients with COPD and in smokers with normal lung function, grouped according to their smoking status (current *versus* ex-smokers). Current smokers with normal lung function showed a significant upregulation of $\gamma\delta$ T-cells when compared with ex-smokers with normal lung function (10.5 ± 0.9 *versus* 5.4 ± 1.6 , respectively; $p < 0.01$). This suggests that active smoking induces a physiological response characterised by upregulation of pulmonary $\gamma\delta$ T-lymphocytes. Interestingly, this response was blunted in current smokers with COPD ($3.2 \pm 1.2\%$, $p < 0.001$). Similar results were found when the $\gamma\delta$ CD8+ subpopulation was evaluated (fig. 3b), their percentage being higher in current smokers with normal lung function ($5.3 \pm 1.1\%$) than in ex-smokers with normal lung function (1.3 ± 0.4 , $p < 0.001$) or current smokers with COPD (0.5 ± 0.2 , $p < 0.001$).

DISCUSSION

The present study investigated potential abnormalities in the distribution of different subpopulations of T-lymphocytes in

peripheral blood and BAL samples in patients with COPD, as compared with smokers with normal lung function and never-smokers. The current authors did not find any significant differences in the distribution of $\alpha\beta$ T-lymphocytes (CD4+ or CD8+) between groups, either in peripheral blood or BAL samples (fig. 1). In contrast, a very significant upregulation of $\gamma\delta$ T-lymphocytes in smokers with preserved lung function (both in peripheral blood and, particularly, in BAL samples) was observed (fig. 2). The fact that this response was remarkably diminished in smokers with COPD, given the important role of $\gamma\delta$ T-lymphocytes in tissue repair and inflammation control, identifies a novel, potentially relevant mechanism of the disease.

$\alpha\beta$ T-lymphocytes

Previous studies have reported increased percentages of CD8+ T-lymphocytes in peripheral [8] and central airways [9], as well as in the lung parenchyma and pulmonary vasculature [7] of COPD patients. In BAL, the present authors did not find significant differences in the distribution of CD8+ T-lymphocytes between COPD patients, smokers with normal lung function and never smokers, albeit smokers (with and without COPD) showed a tendency towards higher CD8+ values (fig. 1d). Differences with respect to previous studies [7–9] may relate to different sampling sites. For instance, it is well known that the concentration of neutrophils is increased in

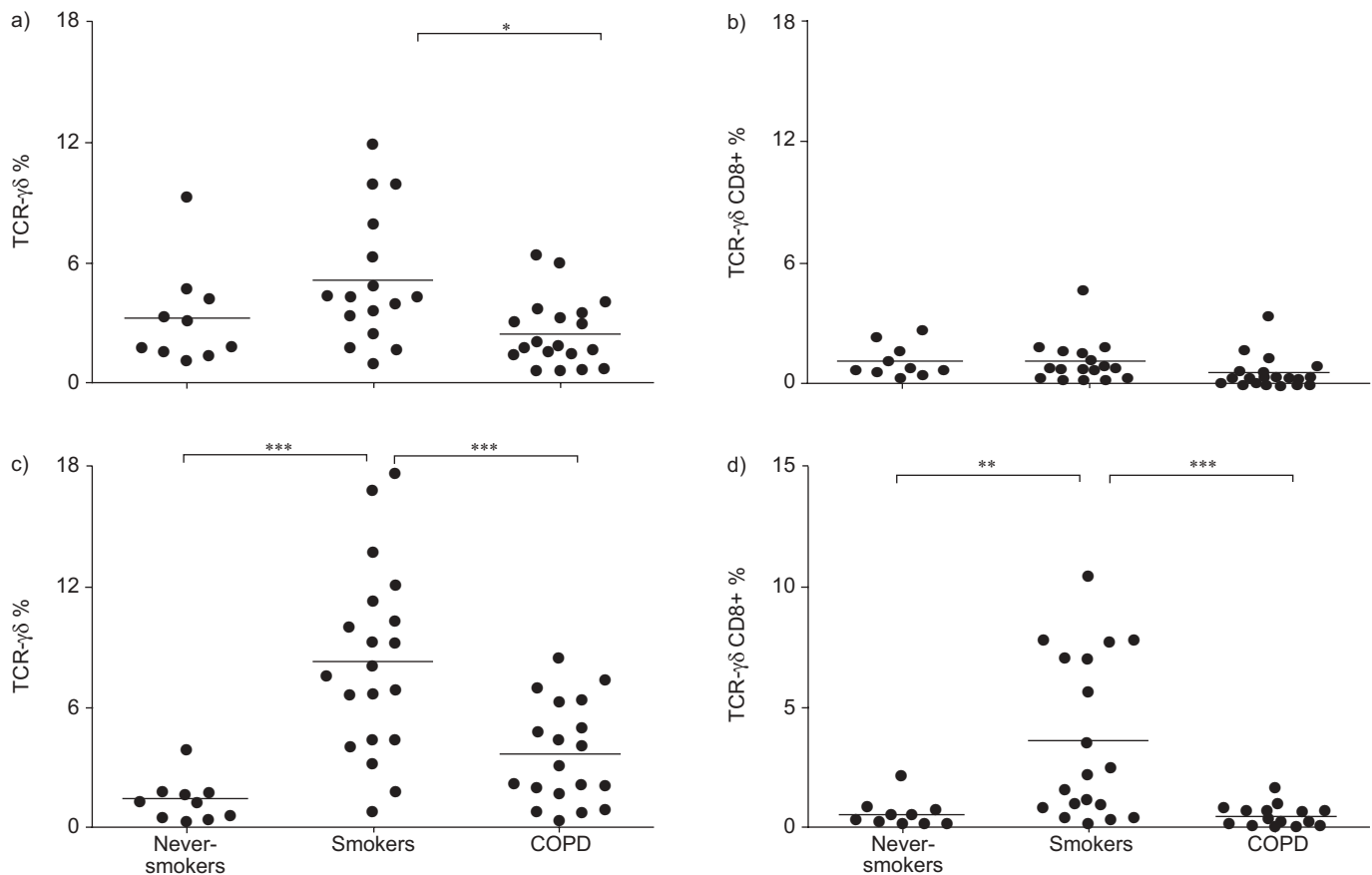


FIGURE 2. Percentage of T-cell receptor (TCR)- $\gamma\delta$ and $\gamma\delta$ CD8+ T-lymphocytes in peripheral blood (a and b) and bronchoalveolar lavage samples (c and d) in never-smokers, smokers with normal lung function and chronic obstructive pulmonary disease (COPD) patients. Horizontal bars represent the mean value. *: p < 0.05; **: p < 0.01; ***: p < 0.001. Where not indicated, differences between groups were not statistically significant.

BAL samples of patients with COPD, whilst they are found only rarely in tissue samples [16].

Only a few studies have investigated the distribution of CD4+ and CD8+ T-lymphocytes in the peripheral blood of COPD patients. DE JONG *et al.* [17] found no differences between smokers with or without COPD. More recently, KIM *et al.* [18] also found similar percentages of CD8+ T-cells in COPD patients and healthy smokers. The presented results agree with these two previous studies (figs 1a and c), suggesting that the origin of the abnormal T-lymphocyte infiltration seen in the lungs of patients with COPD is a local rather than a systemic event.

$\gamma\delta$ T-lymphocytes

$\gamma\delta$ T-lymphocytes play an important role in tissue repair and mucosal homeostasis [5]. Little is known about their potential role in COPD, except that they are an important component of tissue injury and remodelling [19]. A previous study by RICHMOND *et al.* [20] reported increased $\gamma\delta$ T-cell numbers in the bronchial glands of smokers compared with nonsmokers. Likewise MAJO *et al.* [21] found an increased percentage of $\gamma\delta$ T-lymphocytes in the lung parenchyma of smokers. Finally, EKBERG-JANSSON *et al.* [22] evaluated $\gamma\delta$ T-cells in peripheral blood and BAL samples, and also found a trend towards

higher levels of $\gamma\delta$ T-cells in smokers with normal lung function. The present study confirms that, compared with never-smokers, smokers with normal lung function show a prominent upregulation of $\gamma\delta$ T-lymphocytes in peripheral blood and, particularly, in BAL. It also shows that this occurs only in active smokers (figs 3a and b). Given the relevance of this T-lymphocyte subpopulation in tissue homeostasis, this observation is compatible with a physiological response aimed at protecting or repairing the lungs from the injury caused by current tobacco smoking. The specific molecular mechanisms leading to this upregulation of $\gamma\delta$ T-lymphocytes in smokers are unknown. The current authors speculate that a direct stimulatory effect of some component(s) of smoke and/or the presence of the so-called "danger signals" produced by the damaged lung parenchyma may contribute to it.

In contrast, the present study shows for the first time that COPD patients are unable to mount such a response (figs 2 and 3). This can have two important pathogenic implications. First, it can jeopardise their capacity to repair the lung parenchyma, as illustrated in $\gamma\delta$ T-lymphocytes knock-out mice that exhibit markedly delayed wound repair and re-epithelisation due to the deficient production of keratinocyte growth factors and other cytokines [10, 23, 24]. Secondly, it may facilitate the perpetuation of the inflammatory response [25, 26]. This is

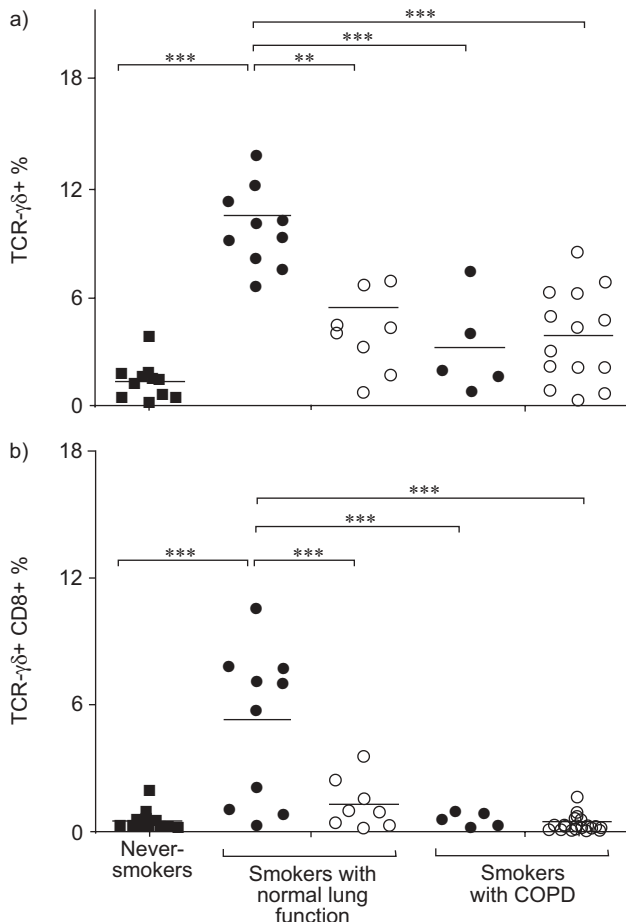


FIGURE 3. Percentage of T-cell receptor (TCR)- $\gamma\delta$ (a) and - $\gamma\delta$ CD8+ (b) T-cells in bronchoalveolar lavage fluid samples in never-smokers, current (●) and ex-smokers (○) with normal lung function or chronic obstructive pulmonary disease (COPD) patients. Horizontal bars represent the mean value. **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$. Where not indicated, differences between groups were not statistically significant.

particularly relevant for $\gamma\delta$ CD8+ positive T-cells which, at variance with $\gamma\delta$ CD8- cells, can suppress the tissue damage mediated by effector T-cells [6].

Two potential limitations of the current study deserve some discussion. First, patients with COPD were slightly older than the other two groups (table 1). Previous studies have suggested that the number of circulating $\gamma\delta$ T-lymphocytes decreases with age [27, 28]. No information is available on the effects of ageing on $\gamma\delta$ T-lymphocytes in the lungs. Therefore, the fact that patients with COPD were slightly older cannot be ignored and this may have influenced their results (fig. 2). However, it is believed that this factor is irrelevant for the comparison of never-smokers and smokers with normal lung function (fig. 2) because these two groups were well matched for age (table 1). Secondly, patients with COPD received pharmacological therapy, including steroids and bronchodilators. As discussed earlier, the former did not appear to influence the number of $\gamma\delta$ T-lymphocytes in these patients. In contrast, the potential effects of bronchodilators on these cells

cannot be assessed because all patients in the study were receiving them and, to the best of the authors' knowledge, there is no information available in the literature regarding this specific point.

In summary, the present study found that current smokers with preserved lung function showed a prominent upregulation of $\gamma\delta$ and $\gamma\delta$ CD8+ T-lymphocytes in bronchoalveolar lavage fluid, and that this response was blunted in smokers who had developed chronic obstructive pulmonary disease. Whether this constitutes a previously unreported pathogenic factor that facilitates the development of chronic obstructive pulmonary disease among certain smokers or, alternatively, whether it is a consequence of the disease process that contributes towards amplification of the inflammatory response caused by smoking and/or this prevents effective tissue repair, although these theories cannot be ascertained from the presented results. However, in both instances, the results of the present study pinpoint a novel, potentially relevant mechanism of disease that deserves further investigation.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported, in part, by Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS 02/0986 and Red Respiratoria 03/11C), Sociedad Española de Patología del Aparato Respiratorio, Govern Balear and Associació Balear per l'estudi de Malalties Respiratòries. The authors would like to thank C. Santos for her technical assistance.

REFERENCES

- 1 Jeffery PK. Structural and inflammatory changes in COPD: a comparison with asthma. *Thorax* 1998; 53: 129–136.
- 2 Fletcher C, Peto R. The natural history of chronic airflow obstruction. *BMJ* 1997; 1: 1645–1648.
- 3 Barnes PJ. Chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2000; 343: 269–280.
- 4 Janeway CA. The T cell receptor as a multicomponent signalling machine: CD4/CD8 coreceptors and CD45 in T cell activation. *Annu Rev Immunol* 1992; 10: 645–674.
- 5 Jameson J, Witherden D, Havran WL. T-cell effector mechanisms: gammadelta and CD1d-restricted subsets. *Curr Opin Immunol* 2003; 15: 349–353.
- 6 Harrison LC, Dempsey-Collier M, Kramer DR, Takahashi K. Aerosol insulin induces regulatory CD8 gamma delta T cells that prevent murine insulin-dependent diabetes. *J Exp Med* 1996; 184: 2167–2174.
- 7 Saetta M, Baraldo S, Corbino L, et al. CD8+ve cells in the lungs of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160: 711–717.
- 8 Saetta M, Di Stefano A, Turato G, et al. CD8+ T-lymphocytes in peripheral airways of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157: 822–826.
- 9 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.
- 10 Jameson J, Ugarte K, Chen N, et al. A role for skin gammadelta T cells in wound repair. *Science* 2002; 296: 747–749.

- 11 Agusti AGN, Noguera A, Sauleda J, Sala E, Pons J, Busquets X. Systemic effects of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2003; 21: 347–360.
- 12 Amadori A, Zamarchi R, De Silvestro G, et al. Genetic control of the CD4/CD8 T-cell ratio in humans. *Nat Med* 1995; 1: 1279–1283.
- 13 Costabel U, Maier K, Teschler H, Wang YM. Local immune components in chronic obstructive pulmonary disease. *Respiration* 1992; 59: 17–19.
- 14 American Thoracic Society Official Statement. Standardization of Spirometry, 1994 Update. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152: 1107–1136.
- 15 Roca J, Sanchis J, Agustí-Vidal A, Segarra F, Navajas D, Rodríguez-Roisin R. Spirometric reference values for a mediterranean population. *Bull Eur Physiopathol Respir* 1986; 22: 217–224.
- 16 Saetta M, Turato G, Maestrelli P, Mapp CE, Fabbri LM. Cellular and structural bases of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163: 1304–1309.
- 17 De Jong JW, Belt-Gritter B, Koeter GH, Postma DS. Peripheral blood lymphocyte cell subsets in subjects with chronic obstructive pulmonary disease: association with smoking, IgE and lung function. *Respir Med* 1997; 91: 67–76.
- 18 Kim WD, Kim WS, Koh Y, et al. Abnormal peripheral blood T-lymphocyte subsets in a subgroup of patients with COPD. *Chest* 2002; 122: 437–444.
- 19 Rennard SI. Inflammation and repair processes in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160: Suppl. 5, S12–S16.
- 20 Richmond I, Pritchard GE, Aschcroft T, Corris PA, Walters EH. Distribution of gamma delta T-cells in the bronchial tree of smokers and non-smokers. *J Clin Pathol* 1993; 46: 926–930.
- 21 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.
- 22 Ekberg-Jansson A, Andersson B, Avra E, Nilsson O, Lofdahl CG. The expression of lymphocyte surface antigens in bronchial biopsies, bronchoalveolar lavage cells and blood cells in healthy smoking and never-smoking men, 60 years old. *Respir Med* 2000; 94: 264–272.
- 23 Chen Y, Chou K, Fuchs E, Havran WL, Boismenu R. Protection of the intestinal mucosa by intraepithelial gamma delta T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 14338–14343.
- 24 King DP, Hyde DM, Jackson KA, et al. Cutting edge: protective response to pulmonary injury requires gamma delta T lymphocytes. *J Immunol* 1999; 162: 5033–5036.
- 25 Lahn M, Kanehiro A, Takeda K, et al. Negative regulation of airway responsiveness that is dependent on gamma-delta T cells and independent of alphabeta T cells. *Nat Med* 1999; 5: 1150–1156.
- 26 Born WK, Lahn M, Takeda K, Kanehiro A, O'Brien RL, Gelfand EW. Role of gammadelta T cells in protecting normal airway function. *Respir Res* 2000; 1: 151–158.
- 27 Colonna-Romano G, Potestio M, Aquino A, Candore G, Lio D, Caruso C. Gamma/delta T lymphocytes are affected in the elderly. *Exp Gerontol* 2002; 37: 205–211.
- 28 Schauer U, Dippel E, Gieler U, et al. T cell receptor gamma delta bearing cells are decreased in the peripheral blood of patients with atopic diseases. *Clin Exp Immunol* 1991; 86: 440–443.

ESTUDIO II

Intracellular cytokine profile of T lymphocytes in patients with chronic obstructive pulmonary disease.

Clin Exp Immunol. 2006 Sep; 145 (3):474-9.

Barceló B, Pons J, Fuster A, Sauleda J, Noguera A, Ferrer JM, Agustí AG.

Intracellular cytokine profile of T lymphocytes in patients with chronic obstructive pulmonary disease

B. Barceló,* J. Pons,^{†‡} A. Fuster,[§]
J. Sauleda,[§] A. Noguera,* J. M. Ferrer[‡]
and A. G. N. Agustí^{§¶}

**Serveis d'Anàlisi Clínics*, [†]*Unitat d'Investigació*,
[‡]*Immunologia*, [§]*Pneumologia* and [¶]*Fundació*
Caubet-Cimera, Hospital Universitari Son Dureta,
Institut Universitari d'Investigació en Ciències de
la Salut (IUNICS), Palma de Mallorca, Spain

Accepted for publication 28 June 2006

Correspondence: Alvar G. N. Agustí, Servei de
Pneumologia, Hospital Universitari Son Dureta,
Andrea Doria 55, 07014-Palma de Mallorca,
Spain.

E-mail: aagusti@hsd.es

Introduction

Tobacco smoking induces an inflammatory response of the airways and lung parenchyma in all smokers. However, for reasons that are not fully understood, only some of them develop chronic airflow obstruction [1]. It is therefore likely that the nature, intensity and/or localization of this inflammatory response may differ in those smokers who manage to preserve lung function despite their habit, compared to those who develop chronic obstructive pulmonary disease (COPD) [2].

Several inflammatory cells, including macrophages, neutrophils and lymphocytes, participate actively in the inflammatory response that characterizes COPD [3]. Among them T lymphocytes, and the array of cytokines they produce, play

Summary

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is characterized by an excessive inflammatory response to inhaled particles, mainly tobacco smoking. T lymphocytes are important regulatory cells that secrete several cytokines and participate actively in this inflammatory response. According to the pattern of cytokines secreted, the immune response is classified as cytotoxic or type 1 [interferon (IFN)- γ , interleukin (IL)-2-dependent] and humoral or type 2 (IL-4-, IL-5-, IL-10- and IL-13-dependent). This paper sought to compare the intracellular profile of cytokine expression determined by flow cytometry in T lymphocytes harvested from bronchoalveolar lavage (BAL) and peripheral blood in patients with COPD, smokers with normal lung function and never smokers. We found that BAL T lymphocytes from COPD patients had a higher percentage of positive stained cells for most of the cytokines analysed when compared to never smokers or smokers with normal lung function. Differences reached statistical significance for IL-4, IL-10 and IL-13, particularly in CD8⁺ T cells. Furthermore, the expression of most of these cytokines was related inversely to the degree of airflow obstruction present suggesting local activation and/or selective homing of T lymphocytes to the lungs in COPD patients. These observations were not reproduced in circulating T lymphocytes. These results suggest that BAL T lymphocytes in patients with COPD produce more cytokines than in controls and tend to show a type 2 pattern of intracellular cytokine expression, particularly a Tc-2 profile. This is related inversely to the degree of airflow obstruction present.

Keywords: bronchitis, emphysema, flow cytometry, lung inflammation

a key role in orchestrating the type of immune response mounted, which can be classified as cytotoxic or humoral. The former involves the production of mainly interferon (IFN)- γ and interleukin (IL)-2 by either CD4⁺ T helper (Th1) or CD8⁺ T cytotoxic (Tc1) lymphocytes; the latter is associated with the production of IL-4, IL-5, IL-10 and IL-13 (Th2 or Tc2, respectively) [4].

Several previous studies have already attempted to characterize the pattern of lymphocyte cytokine production in COPD, but results are conflicting. Some reported that patients with COPD show a predominant Th2/Tc2 phenotype [5–7], whereas others found a Th1/Tc1 pattern [8–10]. Differences are probably related to the different tissues sampled (blood, bronchi, alveoli), the different T cell subpopulations studied (CD4⁺, CD8⁺) and/or the fact that these

studies focused on a limited number of cytokines. We sought to overcome these limitations and to define the pattern of intracellular cytokine expression of T lymphocytes more precisely in patients with COPD by analysing both CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes isolated simultaneously from peripheral blood and bronchoalveolar lavage (BAL) fluid, and by determining the pattern of expression of a wide variety of Th1/Tc1 and Th2/Tc2 cytokines. Although this is a descriptive study, a detailed characterization of the pattern of lymphocyte cytokine expression in COPD is essential for a better understanding of the molecular mechanisms that drive the abnormal inflammatory response that characterizes this devastating disease.

Materials and methods

Population and ethics

We studied smokers (with and without COPD) and never smokers (Table 1). All participants were recruited consecutively from the endoscopy unit of our institution from those requiring a bronchoscopy for clinical reasons (solitary pulmonary nodule or haemoptysis). All patients gave their written consent after being fully informed of the nature, characteristics, risks and potential benefits of the study, which was approved previously by the Ethics Committee of our institution. COPD patients were clinically stable and had not had an episode of exacerbation during the last 3 months. Six patients were being treated with inhaled steroids, but none was receiving oral steroid therapy. We excluded individuals with other chronic lung diseases (asthma, bronchiectasis and interstitial lung diseases), atopy, cardiac, hepatic or renal failure. To avoid any potential effect of acute smoking, active smokers refrained from smoking 12 h before bronchoscopy. Exhaled carbon monoxide concentration determined before sampling was lower than 10 parts per million (p.p.m.) in all subjects.

Lung function

Forced spirometry (GS; Warren E. Collins, Braintree, MA, USA) was obtained in all participants [11]. Spirometric reference values were those of a Mediterranean population [12].

BAL and blood sampling

Bronchoscopy was performed with a flexible fiberoptic bronchoscope (Pentax 15v, Tokyo, Japan). Under topical lidocaine, BAL was performed by instilling eight 25 ml aliquots of sterile saline solution in one pulmonary segment of the middle lobe or lingula not containing any nodule [13]. The liquid recovered was filtered, washed twice in phosphate-buffered saline (PBS) and resuspended in RPMI-1640 medium at 4°C. Heparinized blood samples were collected before bronchoscopy by peripheral venipuncture. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated by density gradient centrifugation (Ficoll Hypaque). PBMC cells were washed twice and resuspended at 10⁶ per millilitre in RPMI-1640 medium.

We excluded the presence of airway bacterial infection by using a sterile protected specimen brush (PSB) (Mill-Rose, Lab Inn, OH, USA) performed before BAL [14]. The culture of PBS samples yielded less than 10³ colony-forming units (CFU)/ml in all participants.

Stimulation, staining and flow cytometry analysis of T lymphocytes

PBMC and BAL cells were stimulated with or without (negative controls) phorbol myristate acetate (PMA; 25 ng/ml) and ionomycin (1 µg/ml) in the presence of Brefeldin A (10 µg/ml) for 5 h at 37°C in a 5% CO₂ humidified atmosphere.

After stimulation, cells were harvested, stained with anti-CD8 and anti-CD3 monoclonal antibodies (Coulter Immunotech, Isaza, Madrid, Spain), fixed, permeabilized and intracellularly stained with anti-IL-2, IL-4, IL-10, IL-13, tumour necrosis factor (TNF)-α (all from Pharmingen Becton Dickinson, Madrid, Spain) and IFN-γ (Coulter Immunotech) phycoerythrin (PE)-conjugated monoclonal antibodies. The analysis was carried out in an Epics XL flow cytometer (Coulter Immunotech) using Expo32 software (Coulter Immunotech). T lymphocytes were gated on a side *versus* CD3⁺ dot plot. We analysed CD8⁺ T lymphocytes as CD3⁺CD8⁺ and CD4⁺ T lymphocytes as CD3⁺CD8⁻ T cells. Positive staining was established above the background level of cells stained with isotype-matched PE-conjugated monoclonal antibodies and non-stimulated samples (Fig. 1).

Table 1. Clinical and functional data of the subjects included in the study.

	Never smokers (n = 7)	Smokers with normal lung function (n = 16)	COPD patients (n = 14)
Age (years)	57 ± 5	61 ± 2	64 ± 2
Smoking history (pack- years)	0	38 ± 4	45 ± 4
FEV ₁ (% ref)	97 ± 6	93 ± 3	57 ± 2†
FEV ₁ /FVC (%)	77 ± 2	74 ± 1	55 ± 2†

†*P* < 0.01 [chronic obstructive pulmonary disease (COPD) *versus* with normal lung function and never smokers]. FEV₁ = forced expiratory volume in 1 s.

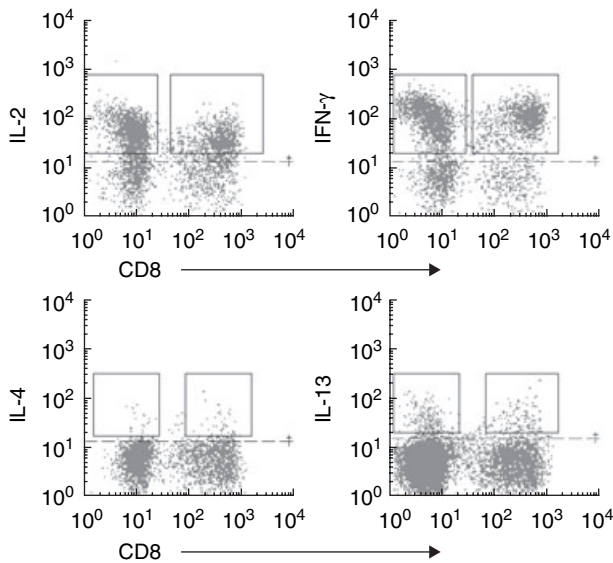


Fig. 1. Flow cytometry analysis of bronchoalveolar lavage fluid (BALF) T lymphocytes staining positive for intracellular interleukin (IL)-2, interferon (IFN)- γ , IL-4 and IL-13 cytokines. CD4⁺ T (CD3⁺CD8⁻) and CD8⁺ (CD3⁺CD8⁺) lymphocytes were previously gated on a side *versus* CD3 positive dot plot. Positive staining was established above the background level (dotted line) of cells stained with isotype-matched phycoerythrin-conjugated monoclonal antibodies and non-stimulated samples.

Statistical analysis

Results are shown as mean \pm standard error of the mean (s.e.m.). Mann–Whitney, Kruskal–Wallis and Dunn's multiple comparison tests were used to compare groups as appropriate. Correlations between variables of interest were explored by the Pearson correlation test. A *P*-value lower than 0.05 was considered significant.

Results

Clinical and functional findings

Table 1 shows the main clinical and functional characteristics of the three groups studied. COPD patients were slightly older than the other two groups, but differences were not

statistically significant. The smoking history of patients with COPD and smokers with normal lung function was similar. Patients with COPD showed moderate airflow obstruction (GOLD stage II) whereas, by definition, spirometry was normal in the other two groups.

Pattern of intracellular cytokine expression in BAL T lymphocytes

Table 2 shows the absolute and differential cell counts in BAL. As reported previously [15], BAL recovery was reduced in COPD; in contrast, total cell count was higher in COPD and in smokers with normal lung function. The distribution of CD4⁺ and CD8⁺ T cells in BAL samples was not different between groups (Table 3), as described previously [16].

Figure 2 presents the percentage of BAL CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes (panels a and b, respectively) with positive intracellular staining for the different cytokines studied in patients with COPD (dark columns), smokers with normal lung function (grey columns) and never smokers (white columns). Patients with COPD showed a tendency towards higher positive staining for basically all cytokines studied. In CD4⁺ T lymphocytes (a), differences reached statistical significance for IL-13 and IFN- γ , whereas in CD8⁺ T lymphocytes (b) differences were statistically significant for IL-2, IL-4, IL-10 and IL-13. Results were not different in patients receiving (or not) treatment with inhaled steroids (data not shown). Interestingly, the percentage of CD4⁺ T cells staining positive for IL-10 and IL-13, and CD8⁺ T cells staining positive for IL-4, IL-10 and IL-13 showed a significant negative correlation with forced expiratory volume in 1 s (FEV₁) values (Fig. 3). In contrast, type I cytokines (IL-2 and IFN- γ) were not correlated with lung function (data not shown).

Pattern of intracellular cytokine expression in circulating T lymphocytes

The distribution of CD4⁺ and CD8⁺ T cells in peripheral blood samples was not different between groups, although patients with COPD showed a tendency towards higher CD8⁺ values (Table 3). Figure 4 presents the results obtained in circulating CD4⁺ (a) and CD8⁺ T lymphocytes (b). In contrast to the observations made in BAL fluid, in peripheral

Table 2. Absolute and differential cell counts in bronchoalveolar lavage fluid.

	Never smokers (<i>n</i> = 7)	Smokers with normal lung function (<i>n</i> = 16)	COPD (<i>n</i> = 14)
Total cell count ($\times 10^3$ /ml)	65.6 \pm 17.6	271 \pm 58*	182 \pm 33
Macrophages (%)	92 \pm 1	92 \pm 2	85 \pm 3
Lymphocytes (%)	7 \pm 1	7 \pm 2	9 \pm 2
Neutrophils (%)	1 \pm 0.4	1 \pm 0.2	3 \pm 2
BAL recovery (ml)	105 \pm 7	94 \pm 4†	70 \pm 7**

P* < 0.05 *versus* never smokers; *P* < 0.01 *versus* never smokers; †*P* < 0.01 *versus* chronic obstructive pulmonary disease (COPD).

Table 3. Percentage of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes in blood and BAL samples.

	Smokers with normal		
	Never smokers (n = 7)	lung function (n = 16)	COPD (n = 14)
CD4 ⁺ (%)			
Blood	71 ± 3.7	72 ± 2.2	64 ± 3.6
BAL	62 ± 5.4	59 ± 3.3	51 ± 3.7
CD8 ⁺ (%)			
Blood	28 ± 3.7	27 ± 2.1	34 ± 3.6
BAL	36 ± 5.3	38 ± 3.2	45 ± 3.8

COPD: chronic obstructive pulmonary disease.

blood differences between groups were mainly absent, both in CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes. Only in the case of TNF- α did we observe an unexpected lower staining in circulating CD8⁺ T lymphocytes of smokers with normal lung function compared to never smokers or patients with COPD.

Discussion

The main results of our study indicate that: (1) BAL T lymphocytes in patients with COPD produced more cytokines than controls (Fig. 2). This was not the case in circulating T lymphocytes (Fig. 3), suggesting local activation and/or selective homing of T lymphocytes to the lungs; (2) the pattern of cytokine production tended to follow a Tc2 profile, as shown by the higher percentage of CD8⁺ T cells staining positive for IL-4, IL-10 and, particularly, IL-13 (Fig. 2); and (3) several type 2 cytokines were correlated inversely with the degree of airflow obstruction (Fig. 3). Overall, these results suggest that the profile of cytokines expressed in pulmonary T lymphocytes follows a type 2 pattern, mainly a Tc2, and that this is related to the severity of the disease.

It is now well established that T lymphocytes participate actively in the inflammatory response of the airways and lung parenchyma that characterizes COPD [1,3,17,18]. Several previous studies have attempted to characterize the profile of cytokine production in these patients, but results were conflicting. Mattoli *et al.* reported that, compared to never smokers or smokers with normal lung function, CD8⁺ T cell clones harvested from patients with COPD present a Tc2 phenotype [5]. These findings were confirmed later by Miotto *et al.* [6] and Zhu *et al.* [7] in bronchial tissue. In contrast, Majori *et al.* found that peripheral CD4⁺ T lymphocytes developed a Th1 phenotype in patients with COPD compared to smokers with normal lung function and never smokers [8] and, in keeping with these findings, more recently Di Stefano *et al.* published that lymphocytes in bronchial tissue of patients with mild to moderate stable COPD showed a Th1/Tc1 pattern [9], although Th-2 cytokines (such as IL-4 or IL-5) were never determined. Furthermore, a Tc2 phenotype has also been associated with interstitial fibrosis and declining lung function in patients with systemic sclerosis [19]. Finally, in a recent paper

Grumelli *et al.* suggested a Th1 pattern of BAL T lymphocytes based on IFN- γ production and chemokine receptor expression [10]. In contrast to these previous investigations, which measured only a reduced number of cytokines, we screened cytokine production by both CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes comprehensively, not only in those harvested from BAL but also in those isolated from the circulating pool. Our results show that the percentage of cytokine-producing BAL T lymphocytes was higher in patients with COPD than in controls for many cytokines (Fig. 2), suggesting a highly effector state of these cells in the lungs of these patients. Interestingly, this was absent in circulating T lymphocytes (Fig. 4), suggesting that lung lymphocytes are activated locally or recruited selectively to the lungs. We also found that BAL CD8⁺ T lymphocytes in patients with COPD

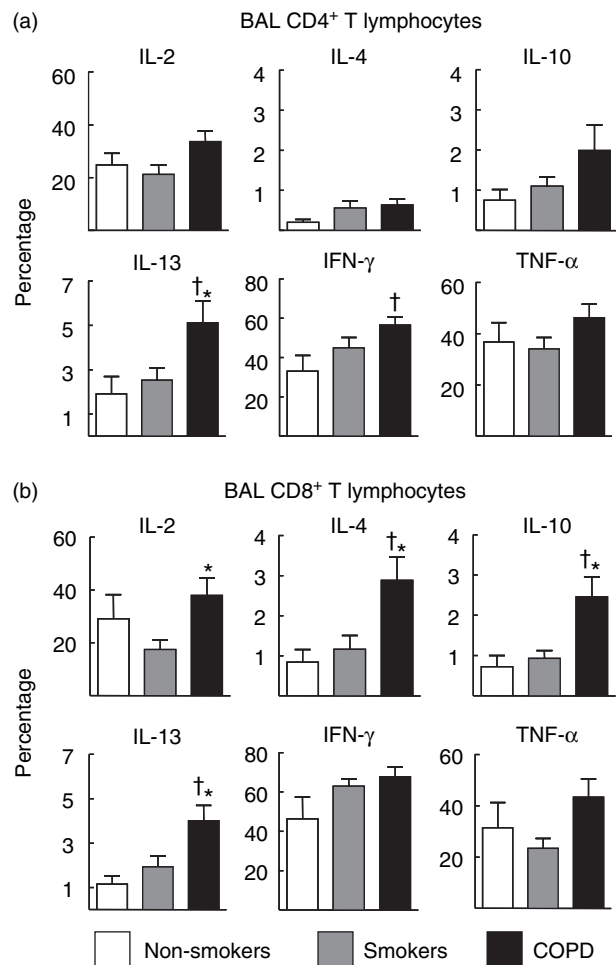


Fig. 2. Percentage (mean \pm s.e.m.) of bronchoalveolar lavage (BAL) CD4⁺ (a) and CD8⁺ T lymphocytes (b) with positive intracellular staining for the different cytokines studied in patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) (dark columns), smokers with normal lung function (grey columns) and never smokers (white columns). †P < 0.05 COPD versus non-smokers; *P < 0.05 COPD versus smokers with normal lung function.

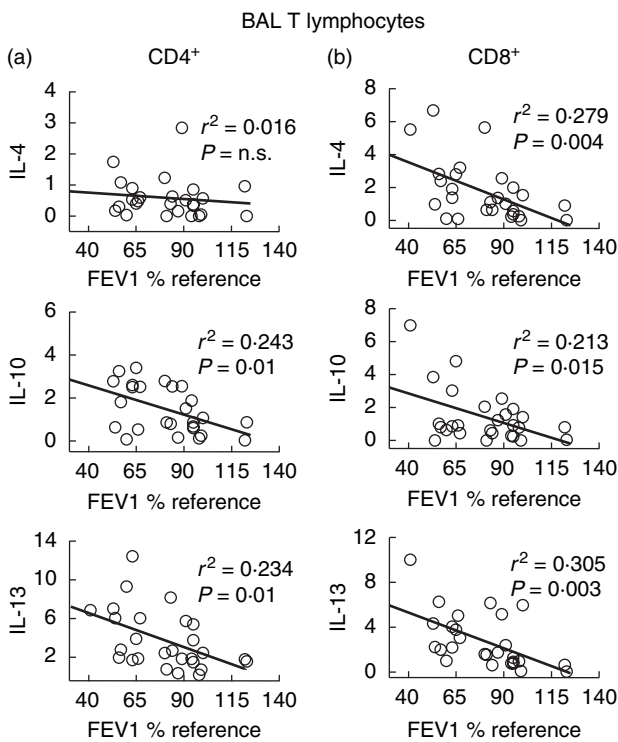


Fig. 3. Correlation analysis between the percentage of CD4⁺ (a) and CD8⁺ (b) bronchoalveolar lavage (BAL) T lymphocytes with positive intracellular staining for type 2 cytokines [interleukin (IL)-4, IL-10 and IL-13] and the degree of airflow obstruction [forced expiratory volume in 1 s (FEV₁), % reference] in smokers [with and without chronic obstructive pulmonary disease (COPD)].

follow a mainly Tc2 pattern because the production of IL-4, IL-10 and IL-13 was higher than in the other two groups (Fig. 2b). This pattern was less well defined in CD4⁺ T lymphocytes, which showed a higher production of IL-13 and IFN- γ (Fig. 2a). However, CD4⁺ T cells staining positive for IFN- γ reached statistical significance only when compared to never smokers (Fig. 2a), an observation that may indicate a direct effect of tobacco smoke on the production of this cytokine. Thus, these observations pinpoint towards a mainly Tc2 pattern of response in COPD. In support of this contention is the fact that circulating levels of IL-6 are known to be increased in COPD patients [20], and IL-6 polarizes mainly T cells towards a type 2 immune response [21,22]. A possible explanation of these results is that stimulation of the innate immune system induces the production, among others, of IL-6 in COPD patients, which would commit T cells to produce a type 2 cytokine profile, this pattern being a consequence rather than a cause of the disease.

Mechanistically speaking, two other aspects of our study deserve comment. First, several type 2 cytokines (IL-4, IL-10 and IL-13) showed a significant negative correlation with the degree of airflow obstruction (Fig. 3). Secondly, among the different cytokines screened, IL-13 was the one showing the highest up-regulation in COPD (both in CD4⁺

and CD8⁺ BAL T lymphocytes (Fig. 2a,b). It is known that over-expression of IL-13 in transgenic mice causes emphysema, mucus metaplasia and inflammation [23], all well-known pathological changes of COPD [1,3,17,18]. These observations therefore support a role for type 2 cytokines in general and IL-13 in particular in the pathogenesis of the disease. For instance, the higher percentage of CD8⁺ T cells staining positive for type 2 cytokines could render them more resistant to apoptosis [24], thus increasing their life span and destructive capability in the lungs.

In summary, our study provides a comprehensive description of the activation pattern of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes in BAL and peripheral blood of patients with COPD. We found that differences were significant in the BAL compartment (much less so in peripheral blood), and that the cytokine profile tends to follow a type 2 pattern, mainly a

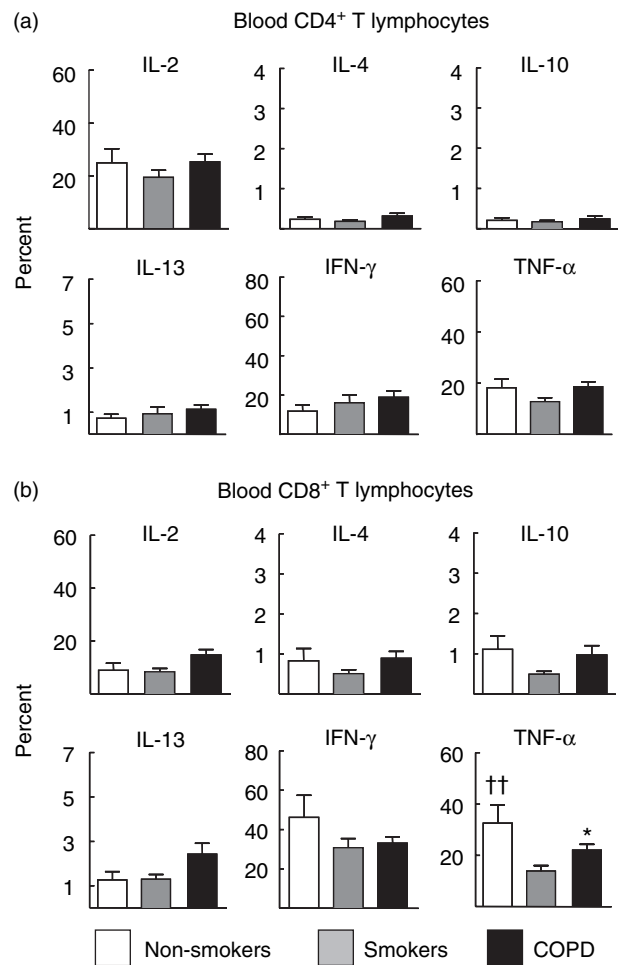


Fig. 4. Percentage (mean \pm s.e.m.) of circulating CD4⁺ (a) and CD8⁺ T lymphocytes (b) with positive intracellular staining for the different cytokines studied in patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) (dark columns), smokers with normal lung function (grey columns) and never smokers (white columns). $\dagger\dagger P < 0.01$ non-smokers versus smokers with normal lung function; $*P < 0.05$ COPD versus smokers with normal lung function.

Tc2 one. Finally, this appears to be related to the severity of the disease, as determined by the degree of airflow obstruction.

Acknowledgements

This study was supported, in part, by Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS PI02/0986, FIS PI05/1059 and Red Respira-RTIC 03/11C), SEPAR, Govern Balear and ABE-MAR. The authors thank Carmen Santos and Francisca Bauza for their technical assistance.

References

- Hogg JC. Pathophysiology of airflow limitation in chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet* 2004; **364**:709–21.
- Agusti A, MacNee W, Donaldson K, Cosio M. Hypothesis: does COPD have an autoimmune component? *Thorax* 2003; **58**:832–4.
- Hogg JC, Chu F, Utokaparch S *et al.* The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2004; **350**:2645–53.
- Neurath MF, Finotto S, Glimcher LH. The role of Th1/Th2 polarization in mucosal immunity. *Nat Med* 2002; **8**:567–73.
- Mattoli S, Kleimberg J, Stacey MA, Bellini A, Sun G, Marini M. The role of CD8+ Th2 lymphocytes in the development of smoking-related lung damage. *Biochem Biophys Res Comms* 1997; **239**:146–9.
- Miotto D, Ruggieri MP, Boschetto P *et al.* Interleukin-13 and -4 expression in the central airways of smokers with chronic bronchitis. *Eur Respir J* 2003; **22**:602–8.
- Zhu J, Majumdar S, Qiu Y *et al.* Interleukin-4 and interleukin-5 gene expression and inflammation in the mucus-secreting glands and subepithelial tissue of smokers with chronic bronchitis. Lack of relationship with CD8(+) cells. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; **164**:2220–8.
- Majori M, Corradi M, Caminati A, Cacciani G, Bertacco S, Pesci A. Predominant TH1 cytokine pattern in peripheral blood from subjects with chronic obstructive pulmonary disease. *J Allergy Clin Immunol* 1999; **103**:458–62.
- Di Stefano A, Caramori G, Capelli A *et al.* STAT4 activation in smokers and patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2004; **24**:78–85.
- Grumelli S, Corry DB, Song LZ *et al.* An immune basis for lung parenchymal destruction in chronic obstructive pulmonary disease and emphysema. *Plos Med* 2004; **1**:75–83.
- American Thoracic Society Official Statement. Standardization of spirometry. 1994 update. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; **152**:1107–36.
- Roca J, Sanchis J, Agustí-Vidal A *et al.* Spirometric reference values for a Mediterranean population. *Bull Eur Physiopathol Respir* 1986; **22**:217–24.
- Rennard SI, Aalbers R, Bleecker E *et al.* Bronchoalveolar lavage: performance, sampling procedure, processing and assessment. *Eur Respir J Suppl* 1998; **26**:13S–15S.
- Wimberley NW, Bass JB Jr, Boyd BW, Kirkpatrick MB, Serio RA, Pollock HM. Use of a bronchoscopic protected catheter brush for the diagnosis of pulmonary infections. *Chest* 1982; **81**:556–62.
- Lofdahl JM, Cederlund K, Nathell L, Eklund A, Skold CM. Bronchoalveolar lavage in COPD: fluid recovery correlates with the degree of emphysema. *Eur Respir J* 2005; **25**:275–81.
- Pons J, Sauleda J, Ferrer JM *et al.* Blunted $\{\gamma\}\{\delta\}$ T-lymphocyte response in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2005; **25**:441–6.
- Barnes PJ. Small Airways in COPD. *N Engl J Med* 2004; **350**:2635–7.
- Barnes PJ. Chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2000; **343**:269–80.
- Atamas SP, Yurovsky VV, Wise R *et al.* Production of type 2 cytokines by CD8+ lung cells is associated with greater decline in pulmonary function in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 1999; **42**:1168–78.
- Gan WQ, Man SF, Senthilselvan A, Sin DD. Association between chronic obstructive pulmonary disease and systemic inflammation. a systematic review and a meta-analysis. *Thorax* 2004; **59**:574–80.
- Rincon M, Anguita J, Nakamura T, Fikrig E, Flavell RA. Interleukin (IL)-6 directs the differentiation of IL-4-producing CD4+ T cells. *J Exp Med* 1997; **185**:461–9.
- Dodge IL, Carr MW, Cernadas M, Brenner MB. IL-6 production by pulmonary dendritic cells impedes Th1 immune responses. *J Immunol* 2003; **170**:4457–64.
- Zheng T, Zhu Z, Wang Z *et al.* Inducible targeting of IL-13 to the adult lung causes matrix metalloproteinase- and cathepsin-dependent emphysema. *J Clin Invest* 2000; **106**:1081–93.
- Vukmanovic-Stejic M, Vyas B, Gorak-Stolinska P, Noble A, Kemeny DM. Human Tc1 and Tc2/Tc0 CD8 T-cell clones display distinct cell surface and functional phenotypes. *Blood* 2000; **95**:231–40.

ESTUDIO III

Phenotypic characterisation of T-lymphocytes in COPD: abnormal CD4+CD25+ regulatory T-lymphocyte response to tobacco smoking.

Eur Respir J. 2008 Mar;31(3):555-62.

Barceló B, Pons J, Ferrer JM, Sauleda J, Fuster A, Agustí AG.



Phenotypic characterisation of T-lymphocytes in COPD: abnormal CD4+CD25+ regulatory T-lymphocyte response to tobacco smoking

B. Barceló^{*,#}, J. Pons^{#,†}, J.M. Ferrer^{#,†}, J. Sauleda^{#,+,§},
A. Fuster⁺ and A.G.N. Agusti^{#,+,§}

ABSTRACT: Tobacco smoking induces an inflammatory response in the lungs of all smokers but, for reasons that are still poorly understood, only a proportion of them develop chronic obstructive pulmonary disease (COPD). Recent evidence indicates that this inflammatory response persists after smoking cessation, suggesting some type of auto-perpetuation mechanism similar to that described in autoimmune disorders. T-lymphocytes (CD4+ and CD8+) have been implicated in the pathogenesis of both COPD and several autoimmune processes. A subtype of regulatory CD4+ T-cells expressing CD25 (Tregs) plays a critical role in the maintenance of peripheral tolerance and the prevention of autoimmunity, but their potential role in COPD has not been explored. The present study sought to evaluate maturation (CD45RA/CD45R0) and activation markers (CD28) of T-lymphocytes and to explore potential Treg abnormalities in COPD.

Flow cytometry was used to characterise T-lymphocytes obtained from blood and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) in 23 patients with moderate COPD, 29 smokers with normal lung function and seven never-smokers.

The main findings were that in BALF: patients with COPD showed higher CD8+CD45RA+ and lower CD8+CD45R0+ than smokers with normal lung function; and compared with never-smokers, smokers with preserved lung function showed a prominent upregulation of Tregs that was absent in patients with COPD.

These observations indicate a final maturation-activation state of CD8+ T-lymphocytes in chronic obstructive pulmonary disease and, for the first time, identify a blunted regulatory T-cell response to tobacco smoking in these patients, further supporting a potential involvement of the acquired immune response in the pathogenesis of the disease.

KEYWORDS: Flow cytometry, lung inflammation, mucosal homeostasis, tissue repair

Tobacco smoking is the main risk factor for chronic obstructive pulmonary disease (COPD) [1]. It causes an inflammatory response in all smokers but, for reasons that are still poorly understood, only a proportion of them develop COPD [2, 3]. It is likely that the intensity and/or type of inflammation elicited by smoking differs between smokers who manage to preserve lung function despite their habit and those who eventually develop COPD.

Several cell lines, including macrophages, neutrophils and lymphocytes, participate in the inflammatory response that characterises COPD

[4]. In order to understand why only some smokers develop the disease, it is imperative to describe the phenotypic characteristics of these different cell types in patients with COPD compared with those determined in smokers with normal lung function and never-smokers. Following this research strategy, the current authors' group has recently reported qualitative and quantitative differences in alveolar macrophages [5] and $\gamma\delta$ T-lymphocytes [6] in smokers with and without COPD and never-smokers. However, little is known about cytotoxic and memory T-cells.

Conversely, the concept that COPD might have an autoimmune component has gained increased

AFFILIATIONS

Depts of *Clinical Analysis, and
†Immunology, and
‡Pneumology, Hospital Universitari
Son Dureta, Palma de Mallorca, and
§Fundació Caubet-CIMERA, and
#Ciber Enfermedades Respiratorias,
Mallorca, Spain.

CORRESPONDENCE

A.G.N. Agusti
Servei de Pneumologia
Hospital Universitari Son Dureta
Andrea Doria 55
07014-Palma de Mallorca
Spain
Fax: 34 971175228
E-mail: aagusti@hsd.es

Received:

January 28 2007

Accepted after revision:

November 21 2007

SUPPORT STATEMENT

This work was supported by Fondo de Investigación Sanitaria (FIS 02/0986 and Red Respira-RTIC 03/11C; Spain), Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica (SEPAR; Spain), Govern Balear (Illes Balears, Spain) and Associació Balear per l'Estudi de les Malalties Respiratòries (ABEMAR; Illes Balears, Spain).

STATEMENT OF INTEREST

None declared.

For editorial comments see page 486.

attention over the past few years [7–9]. This hypothesis is supported by several lines of evidence, particularly the fact that the inflammatory response previously alluded to persists after smoking cessation [4, 10–12], suggesting a self-perpetuating mechanism [9, 13] similar to those occurring in autoimmune diseases [7–9]. The hypothesis is further supported by recent data showing the presence of CD4+ T-lymphocyte oligoclonality in the lungs of patients with severe emphysema [14]; the possibility of inducing autoimmune emphysema in experimental animals [15]; and the very recent demonstration of circulating antibodies against elastin in patients with emphysema [16].

A small subpopulation of CD4+CD25+ T-lymphocytes, also known as regulatory T-cells (Tregs), with significant anti-inflammatory and immunomodulatory effects, has been identified recently [17, 18]. Abnormalities in Treg regulation have been described in many chronic inflammatory and autoimmune disorders, including atherosclerosis and rheumatoid arthritis [17–20], but their involvement in COPD is unclear.

The present study sought to provide further evidence for the involvement of an acquired immune response in the pathogenesis of COPD by investigating: 1) maturation (CD45RA, CD45R0) and activation (CD28) markers of CD4+ and CD8+ T-lymphocytes (both cell types are believed to play a key role in the pathogenesis of COPD [3]); and 2) the presence of potential differences in the distribution of CD4+CD25+ Tregs in smokers with and without COPD, as well as in never-smokers.

METHODS

Population and ethics

The present study involved 23 patients with COPD (Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease stage II–III), 29 smokers with normal lung function and seven never-smokers. All participants required bronchoscopy for the clinical evaluation of a solitary pulmonary nodule or haemoptysis, and all of them gave informed consent after being made fully aware of the nature and objectives of the study, which had been previously approved by the Ethics Committee of the present authors' institution (Comitè Ètic d'Investigació Clínica, Illes Balears, Spain).

COPD patients were clinically stable and had not had an exacerbation episode during the previous 3 months. All of them were being treated with long-acting inhaled bronchodilators and six patients also received inhaled steroids, but none was undergoing oral steroid therapy. Subjects with atopic diseases, allergic rhinitis and asthma were excluded. To avoid any potential effect of acute smoking, active smokers refrained from smoking 12 h before bronchoscopy. Exhaled carbon monoxide concentration was measured before the procedure and was <10 ppm in all subjects.

Lung function

Forced spirometry (GS; Warren E. Collins, Braintree, MA, USA) was obtained in all participants according to international guidelines [21]. Spirometric reference values were those of a Mediterranean population [22].

Bronchoalveolar lavage fluid and blood samples

Bronchoalveolar lavage was performed as previously reported in the current authors' laboratory [5, 6]. Briefly, bronchoscopy

was performed with a flexible fiberoptic bronchoscope (Pentax 15v; Pentax, Tokyo, Japan) under topical lidocaine. Eight 25-mL aliquots of sterile saline solution were instilled in one pulmonary segment of a lower lobe without any lung nodule. The liquid recovered was filtered, washed twice in PBS and resuspended at 10^6 cells·mL⁻¹ in RPMI-1640 medium at 4°C. Blood samples were collected before bronchoscopy by peripheral venipuncture. Both bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and peripheral blood samples were processed immediately after attainment.

Flow cytometry analysis

In order to characterise T-cells, blood and BALF samples were incubated with combinations of CD3, CD4, CD8, CD45RA, CD45R0 (Pharmingen, Becton Dickinson, Madrid, Spain), CD28, CD25, CD27 (Coulter Immunotech, Izasa, Spain), CD62L and glucocorticoid-induced tumour necrosis factor receptor (GITR; eBioscience, Bionova, Madrid, Spain) monoclonal antibodies for 20 min at room temperature in the dark. Subsequently, 2 mL of lysing solution was added and cells were washed and resuspended in PBS.

For intracellular detection of cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen (CTLA)4, cells were fixed, permeabilised and stained with anti-CTLA4 (Coulter Immunotech) using the Intrastain Fixation and Permeabilization Kit (Dako, Glostrup, Denmark), according to the manufacturer's instructions.

Intracellular detection of Foxp3 was carried out using the anti-human Foxp3 (clone PCH101; eBioscience, Bionova) monoclonal antibody according to the manufacturer's instructions.

Fluorescence-activated cell sorting analyses were performed on an Epics XL flow cytometer using the Expo32 software (Coulter Immunotech).

Statistical analysis

Results are shown as mean \pm SEM. One-way ANOVA with *post hoc* Bonferroni contrasts was used to assess the statistical significance of differences between the three groups of subjects. An unpaired t-test was used to evaluate differences between BALF and blood sample parameters. A p-value <0.05 was considered significant.

RESULTS

General findings

Table 1 shows the main clinical and functional characteristics of participants. Age was similar in the three groups. The smoking history of patients with COPD was slightly higher than that of smokers with normal lung function. Patients with COPD showed moderate airflow obstruction, whereas spirometry was normal in the other two groups.

Table 2 shows the absolute and differential cell counts in BALF. BALF recovery was reduced in COPD; in contrast, total cell count was higher in COPD and in smokers with normal lung function.

Phenotypic characterisation of CD4+ and CD8+ T-lymphocytes in blood and BALF

In peripheral blood, the percentage of naïve (CD45RA+) and memory (CD45R0+) CD4+ and CD8+ T-lymphocytes was not significantly different between groups (table 3).

TABLE 1 Clinical and functional data of all participants

	Never-smokers	Smokers with normal lung function	COPD patients
Subjects	7	29	23
Age yrs	56±6.7	60±1.7	65±1.8
Male/female	6/1	27/3	22/1
Smoking history pack-yrs	0	37±3.3	46±3.1*
FEV ₁ % pred	97±6	92±2.3	58±2.4**
FEV ₁ /FVC %	77±2	75±0.9	55±1.9**

Data are presented as n or mean ± SEM. COPD: chronic obstructive pulmonary disease; FEV₁: forced expiratory volume in one second; % pred: % predicted; FVC: forced vital capacity. *: p<0.05 for COPD patients versus smokers with normal lung function; **: p<0.01 for COPD patients versus smokers with normal lung function and never-smokers.

Compared with blood measurements, the percentage of memory (CD45R0+) CD4+ and CD8+ T-cells was significantly increased in BALF in all three groups. Conversely, naïve (CD45RA+) CD4+ and CD8+ T-lymphocytes were found in a higher proportion in blood than in BALF (table 3).

In BALF, the percentage of naïve and memory CD4+ T-cells was similar in all groups (table 3). In contrast, CD8+ T-lymphocytes showed significant differences between groups, with COPD patients showing higher CD8+ CD45RA+ and lower CD45R0+ percentages than smokers with normal lung function (p<0.001 and p<0.05, respectively).

Table 4 presents the expression of the co-stimulatory molecule CD28 in CD4+ and CD8+ T-lymphocytes, both in blood and BALF. In blood, values were not different between groups, neither for CD4+ nor CD8+ T-cells. In contrast, in BALF, irrespective of the presence of COPD, CD8+ T-cells from smokers have a lower percentage of CD8+ T-cells expressing CD28 than never-smokers (table 4).

CD4+CD25+ Tregs

Figure 1 presents the percentage of CD4+CD25+ in blood and BALF in the three groups of subjects studied. No significant differences in peripheral blood samples were found between groups. In contrast, it was observed that compared with never-smokers, smokers with preserved lung function showed a prominent upregulation of Tregs in BALF. Interestingly, this response was absent in smokers with COPD. It was also found

that CD4+CD25+ were higher in BALF than in peripheral blood in the three groups of individuals studied (fig. 1).

Tregs were identified as CD4+ T-lymphocytes expressing bright CD25 (fig. 2), as well as other surface and intracytoplasmatic markers that characterise these cells. Therefore, CD4+CD25+ cells expressed higher levels of CTLA4/CD152, GITR, CD62L and CD27 than CD4+CD25- T-cells (fig. 3). They also expressed the memory surface marker CD45R0 and were negative for the activator marker CD69 (data not shown).

A characteristic of CD4+CD25+ T-cells is the production of interleukin (IL)-10, so intracellular IL-10 was explored in stimulated T-cells. It was found that a higher percentage of CD4+CD25+ T-cells stained positive for IL-10 than did CD4+CD25- (4.4±0.23% versus 0.1±0.06%; p<0.001).

Foxp3 is a forkhead transcription factor that is needed for the differentiation of Tregs and is a hallmark of CD4+CD25+ Tregs [23]. This led to the evaluation of the expression of intracellular Foxp3 in CD4+CD25+ T-cells. It was found that CD4+CD25+ T-cells, both in blood and BALF, expressed intracellular Foxp3 (fig. 4).

DISCUSSION

The present study sought first to characterise the maturation-activation phenotype of T-lymphocytes in patients with COPD, and secondly, to explore potential abnormalities in CD4+CD25+ Tregs. Its main findings were that in BALF: 1) patients with COPD showed higher CD8+CD45RA+ (p<0.001) and

TABLE 2 Absolute and differential cell counts in bronchoalveolar lavage fluid (BALF)

	Never-smokers	Smokers with normal lung function	COPD patients
Subjects	7	29	23
Total cell count × 10 ³ .mL ⁻¹	63.8±15.3	283±49*	186±28
Macrophages %	93±1	93±2	86±2
Lymphocytes %	6±1	6±1	10±2
Neutrophils %	1±0.3	1±0.2	4±2
BALF recovery mL	104±6	95±3 [#]	69±5**

Data are presented as n or mean ± SEM. COPD: chronic obstructive pulmonary disease. *: p<0.05 versus never-smokers; **: p<0.01 versus never-smokers; #: p<0.01 versus COPD patients.

TABLE 3 Proportion of CD4+ and CD8+ naïve (CD45RA) or memory (CD45R0) T-cells in blood and bronchoalveolar lavage fluid (BALF)

	Never-smokers	Smokers with normal lung function	COPD patients	p-value
CD4+CD45RA+ %				
Blood	24.0±3.9	24.7±3.0	21.9±2.2	NS
BALF	1.2±0.4	1.8±0.4	1.4±0.2	NS
p-value	0.0004	0.0001	0.0001	
CD4+CD45R0+ %				
Blood	57.6±5.0	60.2±3.6	61.6±3.1	NS
BALF	95.8±0.7	91.7±1.7	93.1±1.2	NS
p-value	0.0001	0.0001	0.0001	
CD8+CD45RA+ %				
Blood	31.4±6.5	39.4±3.4	41.4±5.3	NS
BALF	5.4±1.6	2.9±0.6	10.2±1.5	<0.001 [#]
p-value	0.014	0.0001	0.0001	
CD8+CD45R0+ %				
Blood	40.2±5.9	39.3±3.1	36.2±4.3	NS
BALF	83.2±4.1	82.1±2.8	71.3±2.9	<0.05 [#]
p-value	0.0017	0.0001	0.0001	

Data are presented as mean ± SEM, unless otherwise stated. Percentage of CD4+CD45RA+/45R0+ or CD8+CD45RA+/45R0+ refers to the total amount of CD4 or CD8 T-cells, respectively. COPD: chronic obstructive pulmonary disease; NS: nonsignificant. #: for COPD patients versus smokers.

lower CD8+CD45R0+ ($p < 0.005$) than smokers with normal lung function (table 2); and 2) compared with never-smokers, smokers with preserved lung function showed a prominent upregulation of Tregs that was absent in patients with COPD (fig. 1). In addition, the present study provided two further observations of interest: the proportion of CD8+CD28+ was lower in smokers than in never-smokers, irrespective of the presence or absence of COPD; and in peripheral blood there were no significant differences between groups in any of the different markers studied, whereas their distribution varied markedly between blood and BALF. This suggests an active but physiological (it also occurred in never-smokers) compartmentalisation process of T-lymphocyte traffic.

Many previous studies have shown that T-lymphocytes accumulate in the lungs of patients with COPD [4, 7, 24–26]

but, to the current authors' knowledge, only one has attempted to characterise the maturation-activation phenotype of T-lymphocytes in patients with COPD [14]. SULLIVAN *et al.* [14] reported a higher percentage of CD4+ and CD8+ T-cells expressing CD45R0 and a lower proportion expressing CD28 in the lung of patients with emphysema, as compared with in their own blood. This observation, which fully agrees with the present results (tables 3 and 4), indicates that the majority of these cells are mature/activated T-cells. However, whereas SULLIVAN *et al.* [14] suggested that this was indicative of activated effector memory T-cells being actively recruited into the lungs of patients with emphysema, the current authors' interpretation of this same finding is different because, at variance with the previous investigation, control subjects were also studied. By doing so, the present study found that the higher proportion of CD4+CD45R0+ and CD8+CD45R0+

TABLE 4 Expression of the co-stimulatory molecule CD28 in CD4+ and CD8+ T-lymphocytes in blood and bronchoalveolar lavage fluid (BALF)

	Never-smokers	Smokers with normal lung function	COPD patients	p-value
CD4+CD28+ %				
Blood	95.6±1.7	98.4±0.7	97.3±0.9	NS
BALF	58.0±11.2	75.0±6.9	71.1±5.3	0.08
p-value	0.007	0.006	0.0001	
CD8+CD28+ %				
Blood	52.5±4.6	55.2±8.6	58.9±4.7	NS
BALF	57.6±6.3	26.6±7.3	29.1±4.7	0.0078 [#]
p-value	NS	0.026	0.0002	

Data are presented as mean ± SEM, unless otherwise stated. Percentages of CD4+CD28+ or CD8+CD28+ refer to the total amount of CD4 or CD8 T-cells respectively. COPD: chronic obstructive pulmonary disease; NS: nonsignificant. #: for never-smokers versus smokers, with or without COPD.

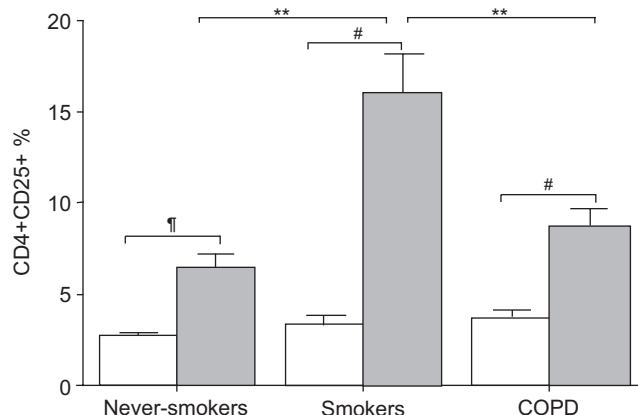


FIGURE 1. Percentage of CD4+CD25+ referred to the total amount of CD4+ T-lymphocytes on peripheral blood (□) and bronchoalveolar lavage fluid (■) samples of never-smokers, smokers with normal lung function and chronic obstructive pulmonary disease (COPD) patients. **: $p < 0.01$; #: $p < 0.0001$; †: $p = 0.0004$.

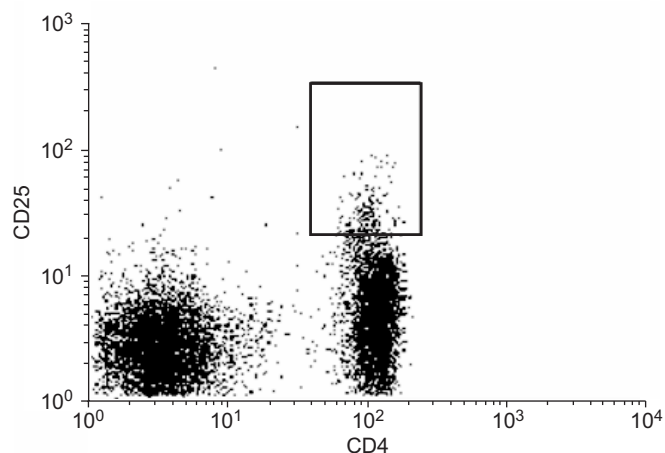


FIGURE 2. Regulatory T-cells were identified as CD4+CD25+bright (boxed area). Lymphocytes were gated on a forward versus side scatter dot plot. Percentages of CD4+CD25+ T-cells refer to the total amount of CD4+ T-cells.

T-cells (as well as the lower percentage of CD4+CD28+ or CD8+CD28+) reported in COPD also occurred in smokers with normal lung function and even in never-smokers (tables 3 and 4). Therefore, these changes cannot be directly linked to the pathogenesis of COPD and probably represent the physiological homing of mature T-cells in the lungs as compared with the general pool of circulating T-lymphocytes. Furthermore, the inclusion of controls allowed the present study to compare BALF data between groups and to unravel some interesting differences. First, it was observed that patients with COPD showed higher CD8+CD45RA+ and lower CD8+CD45R0+ levels than smokers with normal lung function (table 3). The normal maturation-activation process of T-lymphocytes involves the sequential expression of CD45RA (naïve T-cells), CD45R0 (mature T-cells) and, again, CD45RA (effector/cytotoxic T-cells) [27]. Therefore, the observation of a higher proportion of CD8+CD45RA+ T-lymphocytes in patients with COPD may indicate a final maturation-activation state of these cells (CD8+ cells expressing CD45RA and perforin) with a correspondingly higher potential for tissue injury [27]. However, the exact phenotype of these lymphocytes should be addressed in order to confirm the data. In contrast, the current authors observed that the percentage of CD4+ T-lymphocytes expressing the maturation markers CD45RA or CD45R0 in BALF was not significantly different between groups (table 3), suggesting a different role for these T-cells in the pathogenesis of the disease, such as the modulation of the immune response by CD4+CD25+ Tregs discussed hereafter.

Tregs constitute a small subpopulation of CD4+ T-lymphocytes expressing CD25, which have been recently identified as key immunomodulators in many chronic inflammatory and autoimmune disorders, including atherosclerosis and rheumatoid arthritis [17–20]. To the current authors' knowledge, the potential involvement of Tregs in COPD has not been explored before. This may be relevant because the involvement of an acquired immune response has been recently postulated as part of the pathogenesis of the disease [4, 7, 8, 14, 15]. Tregs maintain the homeostasis of the immune system, avoiding the

activation of undesirable responses to self- and nonself-antigens. After activation, Tregs suppress proliferation of CD4+ and CD8+ T-cells through cell contact-dependent mechanisms and secretion of cytokines, mostly IL-10. The present study found that those smokers who manage to preserve their lung function despite their habit showed a prominent upregulation of Tregs in BALF compared with never-smokers, whereas this response was blunted in smokers who had developed COPD (fig. 1). Given the array of immunoregulatory functions of Tregs [17–20], their upregulation in smokers with normal lung function may be interpreted as an attempt to regulate and minimise the inflammatory response elicited by tobacco smoking, whereas the failure of this mechanism in patients with COPD may contribute to the enhancement and/or dysregulation of such an inflammatory response, thus contributing to the pathogenesis of the disease. This pattern of response is, in fact, very similar to that of $\gamma\delta$ T-lymphocytes, another subpopulation of T-lymphocytes involved in tissue repair recently described by the current authors' group [6], and is in keeping with a recent report published while the present study was under review [16]. In any case, the abnormal response of Tregs in patients with COPD described here provides further support to the hypothesis that autoimmunity may play an important pathogenic role in COPD.

The present study provided two other observations of interest. First, smoking reduced the expression of the co-stimulatory molecule CD28 in CD8+ T-lymphocytes in BALF (but not in blood) and this occurred irrespectively of the presence or absence of COPD (table 4). This observation agrees with a report by EKBERG-JANSSON *et al.* [28], who also found lower expression of CD28 on CD8+ T-lymphocytes in BALF from smokers with normal lung function compared with never-smokers [28]. Given that the maturation process of T-lymphocytes involves the downregulation of CD28 [27], these observations suggest that mature CD8+ T-lymphocytes are being actively recruited into the lungs as a response to tobacco smoking that is not specifically linked to the pathogenesis of COPD. Secondly, no significant differences

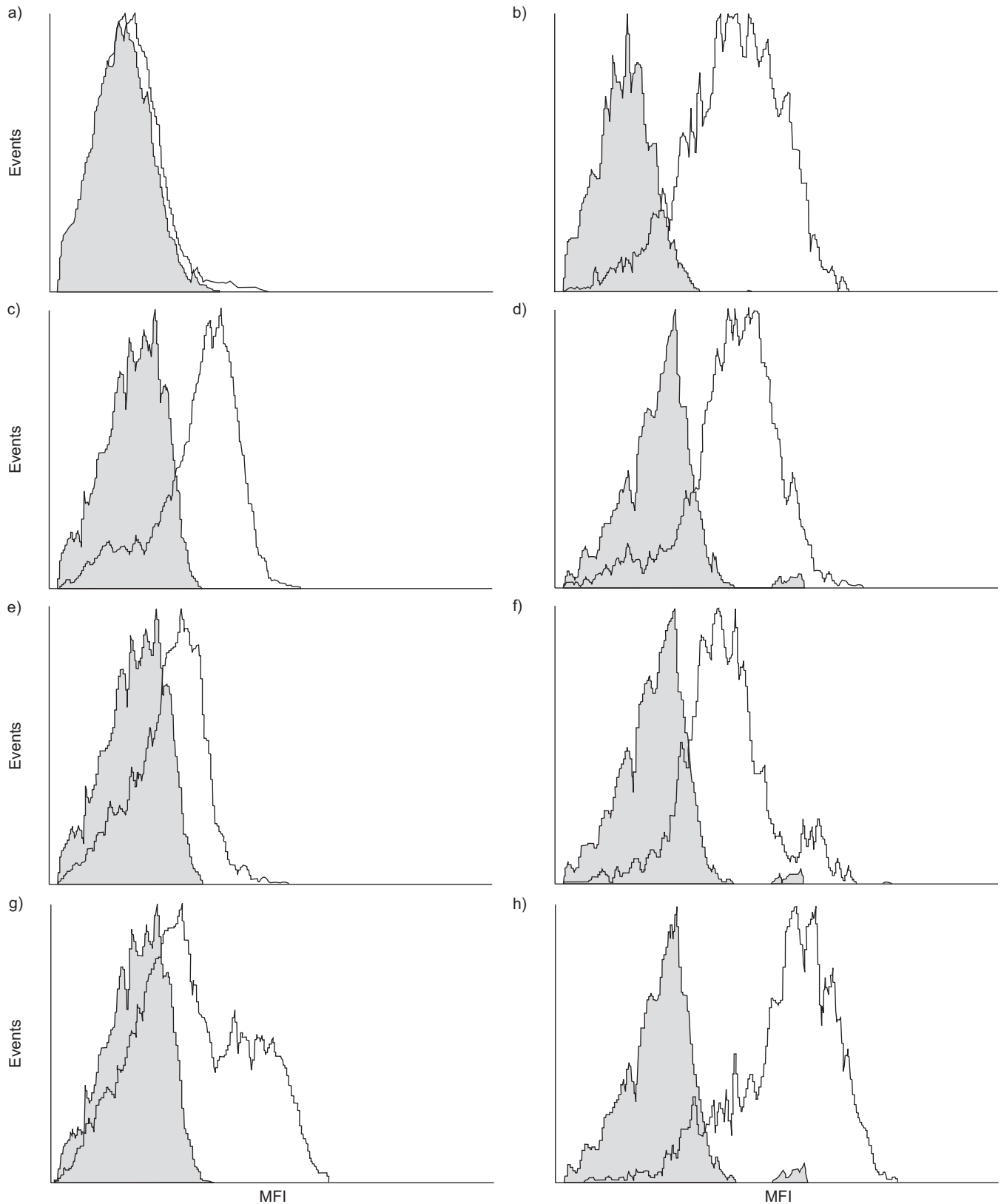


FIGURE 3. Flow cytometry analysis of cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen (CTLA4) (a, b), glucocorticoid-induced tumour necrosis factor receptor (GITR; c, d), CD62L (e, f) and CD27 (g, h) expression. Representative histograms (\square) of the mean fluorescence intensity (MFI) of cytoplasmic CTLA4 and surface GITR, CD62L and CD27 on bronchoalveolar lavage fluid (BALF) CD4+CD25- (a, c, e and g) and on BALF CD4+CD25+ (b, d, f and h) T-cells. Mean \pm SEM of MFI values: a) 7.6 ± 0.7 ; b) 39 ± 3.1 ; c) 13 ± 5.2 ; d) 33 ± 7.3 ; e) 8.8 ± 2.3 ; f) 30 ± 4.4 ; g) 20.7 ± 6 ; h) 92 ± 18 . \blacksquare : expression background level of cells stained with isotype-matched monoclonal antibodies.

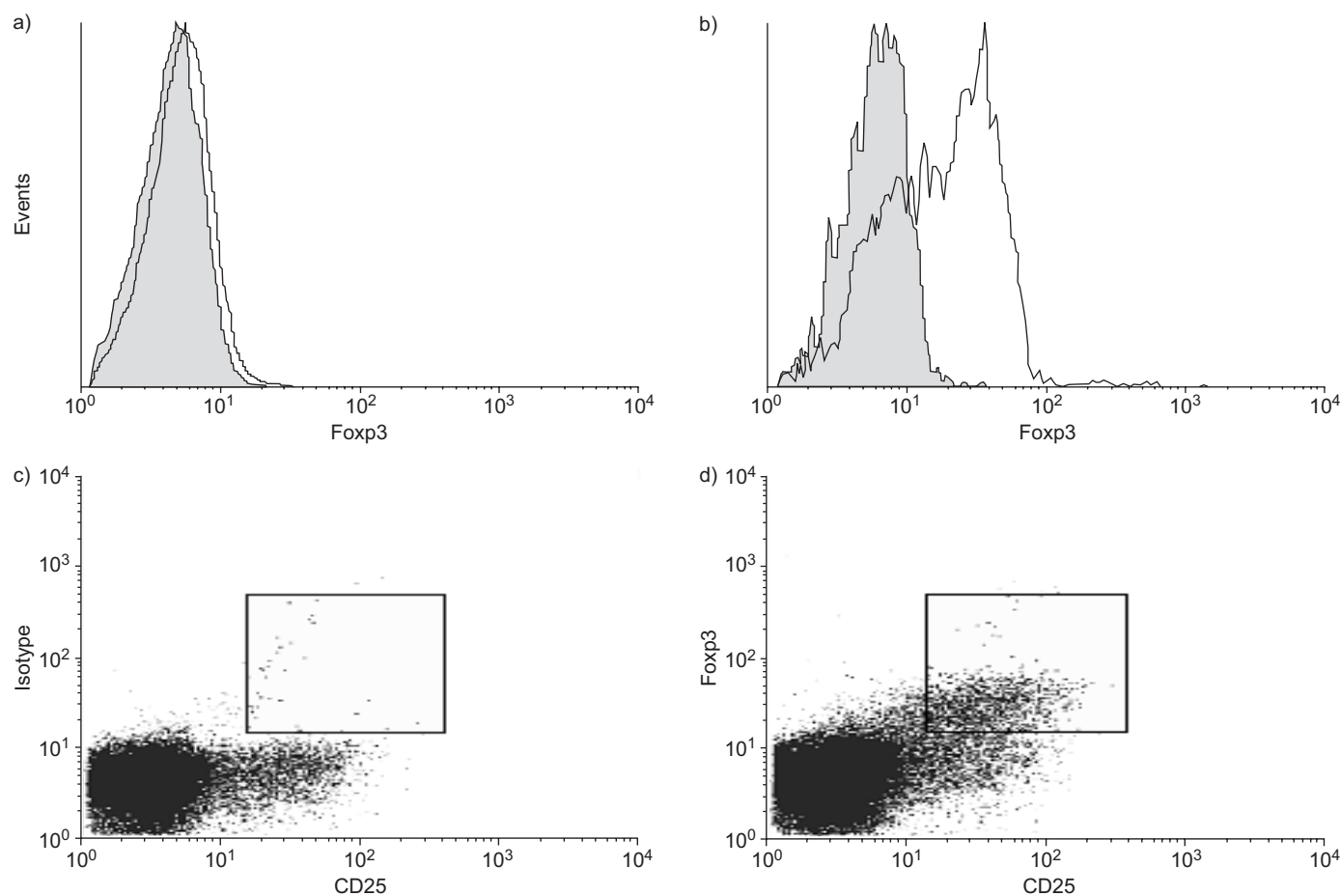


FIGURE 4. Flow cytometry analysis of Foxp3 (clone PCH101). Expression of cytoplasmic Foxp3 was evaluated on a) bronchoalveolar lavage fluid CD4+CD25- (□) and b) CD4+CD25+ T-cells (□). The mean \pm SEM values of Foxp3 expression were a) 5.8 ± 0.85 and b) 19 ± 6.5 . ■: expression background level of cells stained with isotype-matched monoclonal antibodies. Representative dot plots of CD25 and c) immunoglobulin G isotype control (boxed area) and d) Foxp3 expression (boxed area) on CD4+ T-lymphocytes. Percentages, referred to the total amount of CD4+ T-cells, had values c) 0.09% and d) 2.06%.

were found between groups in any of the different markers studied in peripheral blood, whereas marked compartmentalisation was observed when blood and BALF samples were compared (tables 3 and 4). These observations agree with previous studies [29–31] and suggest that differences observed in BALF (previously discussed) are due to specific recruitment and/or local activation in the lungs.

The present study has some limitations that deserve comment. First, BALF and blood samples were studied. Therefore, it is possible that T-lymphocytes isolated from other lung compartments (bronchial mucosa, interstitium) may show different phenotypic characteristics. Secondly, the population of CD8+CD45RA+ T-lymphocytes isolated in BALF was not fully characterised in order to demonstrate that they represent the final stage of their maturation process. This should be done in future studies. Thirdly, six patients received inhaled steroids. For this reason, the results obtained in patients receiving or not receiving inhaled steroids were compared, and no significant differences were found. Fourthly, COPD patients had a longer history of cigarette smoking than smokers without COPD. Therefore, an effect of smoking cannot be excluded. However,

the absolute difference in smoking exposure between the two groups (9 pack-yrs) was relatively small.

In summary, the present study is the first to characterise the maturation-activation phenotype of T-lymphocytes in patients with chronic obstructive pulmonary disease in comparison to that of smokers with normal lung function and never-smokers. It was found that patients with chronic obstructive pulmonary disease showed increased percentages of CD8+CD45RA+ T-lymphocytes, which is consistent with a final maturation-activation state of these cells with a correspondingly higher potential for tissue injury. Also, the present study is the first to investigate potential abnormalities in CD4+CD25+ regulatory T-cells in these patients. It was found that the normal response of regulatory T-cells to tobacco smoking is blunted in patients with chronic obstructive pulmonary disease, further supporting a potential involvement of the acquired immune response in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank the participants of the study for their willingness to contribute to medical research, as well as

F. Bauzá, A. Noguera, M. Bosch and C. Rendón (all Hospital Universitari Son Dureta, Palma de Mallorca, Spain) for their help during the study.

REFERENCES

- Celli BR, MacNee W, Agusti AG, *et al.* Standards for the diagnosis and treatment of patients with COPD: a summary of the ATS/ERS position paper. *Eur Respir J* 2004; 23: 932–946.
- Fletcher C, Peto R. The natural history of chronic airflow obstruction. *BMJ* 1977; 1: 1645–1648.
- Hogg JC. Pathophysiology of airflow limitation in chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet* 2004; 364: 709–721.
- Hogg JC, Chu F, Utokaparch S, *et al.* The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2004; 350: 2645–2653.
- Pons AR, Noguera A, Blanquer D, Sauleda J, Pons J, Agusti AGN. Phenotypic characterisation of alveolar macrophages and peripheral blood monocytes in COPD. *Eur Respir J* 2005; 25: 647–652.
- Pons J, Sauleda J, Ferrer JM, *et al.* Blunted $\gamma\delta$ T-lymphocyte response in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2005; 25: 441–446.
- 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.
- Agusti A, MacNee W, Donaldson K, Cosio M. Hypothesis: does COPD have an autoimmune component? *Thorax* 2003; 58: 832–834.
- Barnes PJ, Cosio MG. Characterization of T lymphocytes in chronic obstructive pulmonary disease. *PLoS Med* 2004; 1: e20.
- Turato G, Di Stefano A, Maestrelli P, *et al.* Effect of smoking cessation on airway inflammation in chronic bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152: 1262–1267.
- Willemse BW, ten Hacken NHT, Rutgers B, Lesman-Leegte IGAT, Postma DS, Timens W. Effect of 1-year smoking cessation on airway inflammation in COPD and asymptomatic smokers. *Eur Respir J* 2005; 26: 835–845.
- Retamales I, Elliot MW, Meshi B, *et al.* Amplification of inflammation in emphysema and its association with latent adenoviral infection. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164: 469–473.
- Grumelli S, Corry DB, Song LZ, *et al.* An immune basis for lung parenchymal destruction in chronic obstructive pulmonary disease and emphysema. *PLoS Med* 2004; 1: e8.
- Sullivan AK, Simonian PL, Falta MT, *et al.* Oligoclonal CD4+ T cells in the lungs of patients with severe emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172: 590–596.
- Taraseviciene-Stewart L, Scerbavicius R, Choe KH, *et al.* An animal model of autoimmune emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 171: 734–742.
- Lee SH, Goswami S, Grudo A, *et al.* Antielastin autoimmunity in tobacco smoking-induced emphysema. *Nat Med* 2007; 13: 567–569.
- Bluestone JA, Tang Q. How do CD4+CD25+ regulatory T cells control autoimmunity? *Curr Opin Immunol* 2005; 17: 638–642.
- Jiang H, Chess L. Regulation of immune responses by T cells. *N Engl J Med* 2006; 354: 1166–1176.
- Mottonen M, Heikkinen J, Mustonen L, Isomaki P, Luukkainen R, Lassila O. CD4+ CD25+ T cells with the phenotypic and functional characteristics of regulatory T cells are enriched in the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol* 2005; 140: 360–367.
- Ait-Oufella H, Salomon BL, Potteaux S, *et al.* Natural regulatory T cells control the development of atherosclerosis in mice. *Nat Med* 2006; 12: 178–180.
- Standardization of spirometry, 1994 update. American Thoracic Society. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152: 1107–1136.
- Roca J, Sanchis J, Agustí-Vidal A, *et al.* Spirometric reference values for a Mediterranean population. *Bull Eur Physiopathol Respir* 1986; 22: 217–224.
- Ahmadzadeh M, Rosenberg SA. IL-2 administration increases CD4+ CD25^{hi} Foxp3+ regulatory T cells in cancer patients. *Blood* 2006; 107: 2409–2414.
- Finkelstein R, Fraser RS, Ghezzi H, Cosio MG. Alveolar inflammation and its relation to emphysema in smokers. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152: 1666–1672.
- Saetta M, Di Stefano A, Turato G, *et al.* 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, Baraldo S, Corbino L, *et al.* CD8+ve cells in the lungs of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160: 711–717.
- Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol* 2004; 22: 745–763.
- Ekberg-Jansson A, Andersson B, Arva E, Nilsson O, Lofdahl CG. The expression of lymphocyte surface antigens in bronchial biopsies, bronchoalveolar lavage cells and blood cells in healthy smoking and never-smoking men, 60 years old. *Respir Med* 2000; 94: 264–272.
- Costabel U, Bross KJ, Reuter C, Rühle K, Matthys H. Alterations in immunoregulatory T-cell subsets in cigarette smokers. A phenotypic analysis of bronchoalveolar and blood lymphocytes. *Chest* 1986; 89: 39–44.
- Ekberg-Jansson A, Arva E, Nilsson O, Lofdahl CG, Andersson B. A comparison of the expression of lymphocyte activation markers in blood, bronchial biopsies and bronchoalveolar lavage: evidence for an enrichment of activated T lymphocytes in the bronchoalveolar space. *Respir Med* 1999; 93: 563–570.
- Korn S, Wiewrodt R, Walz YC, *et al.* Characterization of the interstitial lung and peripheral blood T cell receptor repertoire in cigarette smokers. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2005; 32: 142–148.

DISCUSIÓN

Resumen general de los resultados

Los resultados presentados en esta Tesis Doctoral aportan nuevos conocimientos sobre los procesos inflamatorios que caracterizan la EPOC.

En relación a los procesos fisiopatológicos que conducen a una amplificación y perpetuación de la respuesta inflamatoria con la consiguiente destrucción de tejidos, los estudios I, II y III, nos han permitido demostrar que los linfocitos T del lavado broncoalveolar (BAL) en pacientes con EPOC producen más citoquinas que los linfocitos T de los controles. Es sabido que las citoquinas están implicadas en la progresión de la enfermedad mediante el reclutamiento de neutrófilos, macrófagos, más linfocitos T y B, metaplasia de las células globet, hiperplasia de las células epiteliales y finalmente, enfisema. Más aún, el perfil de las citoquinas expresadas por los linfocitos T pulmonares es de tipo 2, principalmente Tc2. Además, dicho patrón de citoquinas se correlaciona con el grado de obstrucción al flujo aéreo y por consiguiente, con la severidad de la enfermedad. Concretamente, esta correlación se observa con las citoquinas IL-4, IL-10 y sobretodo con la IL-13. Además la IL-13, es la citoquina que muestra un aumento más alto en los linfocitos T CD4+ y CD8+ del BAL de los pacientes con EPOC.

Finalmente, pudimos comprobar como los pacientes con EPOC presentan en el BAL porcentajes mayores de linfocitos CD8+CD45RA+, células altamente citotóxicas y menores de CD8+CD45RO+ que los fumadores con función

pulmonar normal. Es sabido, que estas células producen proteínas citotóxicas del tipo perforina y granzimas que producen la muerte de las células diana. Concretamente, la perforina es una proteína disruptora de membrana que facilita a las granzimas a inducir la apoptosis de las células. Adicionalmente, observamos un porcentaje mayor de linfocitos T CD4+ y CD8+ que expresan CD45RO y menor proporción de linfocitos que expresan CD28 en el pulmón de pacientes con enfisema comparado con los valores encontrados en sangre periférica. En este trabajo también hemos podido demostrar que la proporción de linfocitos T CD8+CD28+ en el BAL es menor en sujetos fumadores que en no fumadores, independientemente de la presencia o ausencia de la EPOC; y que en sangre periférica no hay diferencias entre grupos en ninguno de los marcadores estudiados, mientras que su distribución varía marcadamente entre sangre periférica y BAL. Esto sugiere un proceso fisiológico de compartimentación del tráfico de los linfocitos T.

En relación a los mecanismos de control de la respuesta inflamatoria, los trabajos I y III, aportan información complementaria ya que en ambos estudios se demuestra como tres subpoblaciones de linfocitos T con funciones inmunorreguladoras como son los linfocitos T $\gamma\delta$, los linfocitos T CD8+ $\gamma\delta$ y los linfocitos T CD4+CD25+(FoxP3+) en el lavado broncoalveolar de los sujetos fumadores activos con función pulmonar conservada presentan un prominente aumento, mientras que esta respuesta está ausente en fumadores que han desarrollado EPOC y, por tanto, la reacción pro-inflamatoria progresa de forma

incontrolada, llegando a generar el fenotipo citotóxico de los linfocitos T, anteriormente descrito.

Uno de los aspectos de este último trabajo, es que a pesar de los avances en el conocimiento de los mecanismos que determinan la susceptibilidad a la generación de la EPOC, es igualmente importante el conocimiento de los mecanismos de resistencia a la generación de la EPOC y que son activados por los fumadores que no desarrollan la enfermedad.

La aplicación de estos conocimientos adquiridos puede tener importantes repercusiones terapéuticas, ya que sólo la mejora en el conocimiento de los procesos moleculares y celulares anormales que subyacen en la fisiopatología de la EPOC, permitirán la elucidación de nuevos y específicos tratamientos.

Discusión principales resultados Estudio I

En este estudio se demuestra que no existen diferencias en la distribución de linfocitos $T_{\alpha\beta}$ ni $CD4+$ ni $CD8+$ en muestras de sangre periférica y en el BAL de los grupos estudiados. Sin embargo, en fumadores sin EPOC encontramos un aumento muy significativo de linfocitos $T_{\gamma\delta}$ en sangre periférica y especialmente en el BAL.

El hecho de que esta respuesta esté marcadamente disminuida en fumadores con EPOC, otorga un importante papel a los linfocitos $T_{\gamma\delta}$ en el control de la inflamación y la reparación tisular.

Linfocitos T $\alpha\beta$

Estudios anteriores han informado de un porcentaje incrementado de linfocitos T CD8+ en sangre periférica (118) y en las vías aéreas centrales (119), así como en el parénquima y la vasculatura pulmonar de los pacientes con EPOC (120). En el presente estudio, no encontramos diferencias en muestras del BAL en cuanto a la distribución de linfocitos T CD8+ entre individuos no fumadores, sujetos fumadores con la función pulmonar preservada y pacientes con EPOC, aunque los sujetos fumadores con y sin EPOC presentan una tendencia hacia valores más altos de CD8+. Estos resultados se pueden explicar en relación con otros estudios (121-123) en cuanto al diferente origen de las muestras. Sólo unos pocos estudios han investigado la distribución de los linfocitos T CD4+ y CD8+ en sangre periférica de pacientes con EPOC. De Jong et al. (124) no encontró diferencias entre fumadores con y sin EPOC. Kim et al. (125), también encontró porcentajes similares de CD8+ en pacientes con EPOC y fumadores sin EPOC. En conjunto, estos resultados sugieren que el origen de la infiltración anormal de linfocitos T vistos en los pulmones de los pacientes con EPOC es local más que sistémica.

Linfocitos T $\gamma\delta$

Los linfocitos T $\gamma\delta$ juegan un papel muy importante en la reparación de tejidos y el mantenimiento de la homeostasis de las mucosas (126). Sin embargo, muy poco se conoce de sus potenciales funciones en el desarrollo de la EPOC, excepto que esta subpoblación de linfocitos T tiene importantes

funciones en el remodelado de tejidos (127). Un estudio previo realizado por Richmond et al. (128) informó de un número incrementado de linfocitos T $\gamma\delta$ en glándulas bronquiales de fumadores comparados con no fumadores. Majo et al. (129) encontró un porcentaje incrementado de linfocitos T $\gamma\delta$ en el parénquima pulmonar de fumadores. Finalmente, Ekberg-Jansson et al. (130) evaluó los linfocitos T $\delta\gamma$ en muestras de sangre periférica y de BAL y también encontró una tendencia hacia niveles más altos de células T $\gamma\delta$ en fumadores con función pulmonar conservada.

El presente estudio confirma que comparado con sujetos no fumadores, los sujetos fumadores con la función pulmonar conservada muestran un aumento de los linfocitos T $\gamma\delta$ en sangre periférica y especialmente en el BAL. Dada la relevancia de estos linfocitos T en la homeostasis inmunitaria, esta observación es compatible con la respuesta fisiológica dirigida a proteger y/o reparar el tejido pulmonar de la lesión causada por tabaco.

Los mecanismos moleculares específicos que conducen a este aumento de los linfocitos T $\gamma\delta$ en los sujetos fumadores son desconocidos, aunque los resultados obtenidos nos permiten especular con la posibilidad de que algunos componentes del tabaco o algún mecanismo de trasducción de señales por parte del parénquima pulmonar lesionado, puede contribuir a que se genere esta respuesta. Por otra parte, ya que los pacientes con EPOC son incapaces de construir esta respuesta, dos implicaciones patogénicas pueden plantearse. Primero, esta disfunción puede poner en peligro la capacidad del parénquima pulmonar para repararse, como queda reflejado en ratones knock-out para linfocitos T $\gamma\delta$, que exhiben una capacidad de reparación y re-epitelización retrasada debido a la producción deficiente del factor de crecimiento de

queratocitos y otras citoquinas (131-133). En segundo lugar, esta situación puede facilitar la perpetuación de la respuesta inflamatoria (134;135). Esto último, es particularmente relevante para los linfocitos T CD8+ $\gamma\delta$, que a diferencia de los linfocitos T CD8- $\gamma\delta$, pueden suprimir la lesión a los tejidos mediado por linfocitos T efectores (136).

En resumen, en este trabajo se demuestra que los sujetos fumadores activos con función pulmonar conservada presentan un aumento significativo de linfocitos T $\gamma\delta$ y linfocitos T CD8+ $\gamma\delta$ en el lavado broncoalveolar, y que esta respuesta está ausente en fumadores que han desarrollado EPOC. Si estos resultados, constituyen un factor patogénico que facilita el desarrollo de la EPOC entre algunos fumadores, o bien si es una consecuencia de la enfermedad que contribuye a la amplificación de la respuesta inflamatoria causada por el tabaco y/o previene de una efectiva reparación tisular. Aunque esta teoría no puede ser dilucidada a partir de estos resultados. Sin embargo, en ambos casos, los resultados del presente estudio abren la posibilidad para elucidar un potencial y nuevo mecanismo de la enfermedad que requiere de posteriores investigaciones.

Discusión principales resultados Estudio II

Los principales resultados de este estudio indican que los linfocitos T del lavado broncoalveolar en pacientes con EPOC producen más citoquinas que los linfocitos de los controles. Sin embargo, no ocurre lo mismo con los linfocitos T circulantes, lo cual sugiere una activación local y/o un selectivo reclutamiento hacia los pulmones.

Por otra parte, el patrón de producción de citoquinas tiende a seguir un perfil de tipo Tc2, como demuestra el mayor porcentaje de células T CD8+ que se tiñen para las citoquinas IL-4, IL-10 y particularmente IL-13.

Además, algunas citoquinas de tipo 2 se correlacionan inversamente con el grado de obstrucción al flujo aéreo.

En conjunto, estos resultados sugieren que: 1) el perfil de citoquinas expresadas por los linfocitos T pulmonares siguen un patrón de tipo 2, principalmente Tc2, y que 2) dicho patrón de citoquinas se relaciona con la severidad de la enfermedad.

Es bien sabido que los linfocitos T participan activamente de la respuesta inflamatoria de las vías aéreas y del parénquima pulmonar que caracteriza la EPOC (137-140).

Algunos estudios previos han pretendido describir el perfil de producción de citoquinas en los pacientes con EPOC, sin embargo los

resultados son contradictorios e incompletos en algunos casos. Mattoli et al. informó que comparado con sujetos no fumadores o fumadores con la función pulmonar conservada, clones de linfocitos T CD8⁺ procedentes de pacientes con EPOC presentaban un fenotipo Tc2 (141). Estos resultados fueron confirmados posteriormente por Miotto et al. (142) y Zhu et al. (143) en tejido bronquial. Sin embargo, Majori et al. encontró que los linfocitos T CD4⁺ desarrollan un fenotipo Th1 en pacientes con EPOC comparados con sujetos fumadores con la función pulmonar conservadas y sujetos no fumadores (144); y más recientemente, Di Stefano et al. publicó que los linfocitos de tejido bronquial de pacientes con leve a moderada EPOC en fase estable mostraban un patrón del tipo Th1/Tc1 (145), aunque citoquinas de tipo 2 (como la IL-4 y la IL-5) no se determinaron.

Por otra parte, se ha asociado el patrón de respuesta inflamatoria Tc2 con fibrosis intersticial y deterioro de la función respiratoria en pacientes con esclerosis sistémica (146).

Finalmente, en un artículo publicado recientemente, Grumelli et al. (147) ha sugerido un patrón de tipo Th1 en linfocitos T del BAL en base a la producción de IFN- γ y a la expresión de los receptores de quimioquinas típicos de linfocitos Th1 como son CCR5 y CXCR3 y no CCR3 or CCR4 (marcadores de células Th2).

En contraste con las investigaciones previas que midieron sólo un número limitado de citoquinas, en nuestro estudio analizamos un amplio espectro de dichas citoquinas tanto de linfocitos CD4⁺ como CD8⁺ así como en sangre periférica como en lavado broncoalveolar.

Nuestros resultados demuestran que el porcentaje de producción de citoquinas de los linfocitos del BAL es más alto en pacientes con EPOC que en sujetos control para algunas citoquinas, sugiriendo un estado de activación muy alto de estas células en el pulmón de estos pacientes. Interesantemente, esto no sucede en los linfocitos T circulantes, sugiriendo una activación local o un reclutamiento selectivo hacia los pulmones.

En nuestro estudio, hemos podido describir como los linfocitos T CD8+ del BAL en pacientes con EPOC siguen principalmente un patrón Tc2 ya que producen más IL-4, IL-10 y IL-13 que en los otros dos grupos de individuos. Este patrón se encuentra menos definido en los linfocitos T CD4+, que muestran una mayor producción de IL-13 y IFN γ . Sin embargo, los porcentajes de linfocitos T CD4+ positivos para la IFN γ sólo resultaron ser mayores al compararlos con los sujetos no fumadores, una observación que puede indicar el efecto directo del tabaco sobre la producción de esta citoquina. Estas observaciones nos permiten demostrar que la respuesta que se produce en los pacientes con EPOC es de tipo Tc2. Esta afirmación está respaldada por el hecho de que los niveles circulantes de IL-6 están incrementados en los pacientes con EPOC. La IL-6 es una citoquina que polariza a las células T principalmente hacia una respuesta tipo 2 (148) (149;150). Una posible explicación de estos resultados es el hecho de que la estimulación del sistema inmunitario innato induce la producción entre otras de la IL-6 en los pacientes con EPOC y que a su vez induciría a las células T a producir un patrón de tipo 2, siendo así una consecuencia más que una causa de la enfermedad .

Desde un punto de vista de mecanismo de acción, otros dos aspectos de nuestro estudio merecen un comentario. Primero, las citoquinas de tipo 2 (IL-4, IL-10 y IL-13) presentan una correlación negativa con el grado de obstrucción al flujo aéreo. Segundo, de entre las diferentes citoquinas analizadas, la IL-13 fue la que presentó un mayor aumento en pacientes con EPOC, tanto en linfocitos T CD4+ como CD8+ del lavado broncoalveolar. Se conoce que la sobre-expresión de IL-13 en ratones transgénicos causa enfisema, metaplasia de la mucosa e inflamación (151); efectos todos ellos descritos en la EPOC. Estas observaciones avalan el papel de las citoquinas tipo 2 y en particular de la IL-13 en la patogénesis de la EPOC. Finalmente, otros estudios, de demostrado que un mayor porcentaje de células que sintetizan citoquinas de tipo 2 son más resistentes a la apoptosis (152), aumentando así su vida y por tanto su capacidad de destruir tejidos en los pulmones.

En resumen, este estudio proporciona una detallada descripción del patrón de activación de los linfocitos T CD4+ y CD8+ del BAL y de sangre periférica de pacientes con EPOC. Existen diferencias en el compartimento del BAL, siendo menores las diferencias en la sangre periférica, y que el perfil de citoquinas tiende a seguir un patrón de tipo 2, principalmente Tc2. Finalmente, estos datos están relacionados con la severidad de la destrucción del parénquima pulmonar en la EPOC.

Discusión principales resultados Estudio III

En este estudio se describe por primera vez el fenotipo de maduración-activación de los linfocitos T de los pacientes con EPOC y explora las potenciales anormalidades en la población de células T reguladoras CD25+. Los pacientes con EPOC presentan en el BAL mayores porcentajes de linfocitos CD8+CD45RA+ y menores de CD8+CD45RO+ que los fumadores con función pulmonar normal; y comparado con los no fumadores, los sujetos fumadores con función pulmonar conservada presentan un aumento de las células T reguladoras, hecho que no se produce en los pacientes con EPOC.

Estas observaciones indican un estadio final de maduración de los linfocitos T CD8+ en los pacientes con EPOC.

Adicionalmente a estos resultados, en este trabajo también hemos podido demostrar que la proporción de linfocitos T CD8+CD28+ es menor en sujetos fumadores que en no fumadores, independientemente de la presencia o ausencia de la EPOC; y que en sangre periférica no hay diferencias entre grupos en ninguno de los marcadores estudiados, mientras que su distribución varía marcadamente entre sangre periférica y BAL. Esto sugiere un proceso fisiológico de compartimentación del tráfico de los linfocitos T.

Algunos estudios previos han mostrado que los linfocitos T se acumulan en los pulmones de los pacientes con EPOC (153-157), pero sólo uno ha pretendido caracterizar el fenotipo de maduración-activación de estos linfocitos. Sullivann et al. (158) observó un mayor porcentaje de linfocitos T CD4+ y CD8+ que expresaban CD45RO y menor proporción de linfocitos que

expresaban CD28 en el pulmón de pacientes con enfisema comparado con los valores encontrados en sangre periférica. Estos resultados son totalmente coincidentes con los nuestros, indican que la mayoría de estas células están maduras y activas. Sin embargo, mientras que Sullivan et al. sugiere que este hallazgo indica que células T memoria efectoras activadas están siendo activamente reclutadas hacia los pulmones de pacientes con enfisema, nuestros resultados nos sugieren una interpretación diferente, ya que a diferencia de investigaciones previas, sujetos control también fueron estudiados. Haciendo esto, nuestro estudio muestra que la mayor proporción de linfocitos T CD4+CD45RO+ y CD8+CD45RO+ así como la menor proporción de células CD4+CD28+ y CD8+CD28+ en pacientes con EPOC también ocurre en sujetos fumadores con la función pulmonar conservada e incluso en sujetos no fumadores. Por lo tanto, estos cambios no pueden ser una consecuencia de la patogénesis de la EPOC y probablemente representa el reclutamiento fisiológico de los linfocitos T maduros a los pulmones.

Además la inclusión del grupo control nos permitió comparar los resultados del BAL entre grupos y aclarar alguna diferencia interesante. Primero, los pacientes con EPOC presentan mayores porcentajes de CD8+CD45RA+ y menores de CD8+CD45RO+ que los fumadores con función pulmonar conservada.

El proceso de maduración fisiológico de los linfocitos T implica una expresión secuencial de los siguientes marcadores, CD45RA (linfocitos T naive), a continuación CD45RO (linfocitos T maduros) y finalmente otra vez CD45RA (linfocitos T efectoras o citotóxicas) (159). Por tanto, la observación

de una mayor proporción de CD8+CD45RA+ en el BAL de pacientes con EPOC puede indicar un estado final de maduración-activación. Además, se sabe que estas células producen perforina, con la correspondiente mayor potencialidad de producir lesiones tisulares (159). En contraste con estos resultados, en nuestro estudio pudimos observar que el porcentaje de linfocitos T CD4+ que expresan los marcadores de maduración-activación CD45RA o CD45RO en el BAL no es diferente entre grupos, sugiriendo un diferente papel de estos linfocitos T en la patogénesis de la enfermedad, como la modulación de la respuesta inmune por las células T reguladoras CD4+CD25+, que se discuten a continuación.

Los linfocitos T reguladores constituyen una subpoblación de linfocitos T CD4+ que expresan CD25 y que han sido recientemente identificados como inmunomoduladores clave en algunas inflamaciones crónicas y enfermedades autoinmunes como la aterosclerosis y la artritis reumatoide (160-163). Hasta donde llega el conocimiento de los autores de este trabajo, las implicaciones potenciales de esta subpoblación de linfocitos T no ha sido explorada en pacientes con EPOC. Esta subpoblación de linfocitos puede tener implicaciones relevantes en la patogénesis de la enfermedad debido a su aportación en la respuesta inmune adquirida en el patogénesis de la enfermedad.

Los Treg mantienen la homeostasis del sistema inmune, impidiendo la activación de respuestas no deseables frente a antígenos propios y extraños. Después de la activación, los Treg suprimen la proliferación de las células T

CD4+ y CD8+ a través del contacto célula-célula y a través de la secreción de citoquinas como la IL-10.

El presente estudio demuestra que los sujetos fumadores con función pulmonar conservada a pesar de su hábito, presentan un aumento muy pronunciado de linfocitos Treg en el BAL comparado con los sujetos no fumadores, mientras que en los pacientes con EPOC, esta respuesta está ausente.

Dado el espectro de funciones inmunomoduladoras de los linfocitos Treg, su aumento en los individuos fumadores con función pulmonar normal puede ser interpretado como un intento de controlar o minimizar la respuesta inflamatoria provocada por el tabaco. Mientras que el fallo de este mecanismo en los pacientes con EPOC puede contribuir a potenciar dicha respuesta proinflamatoria, contribuyendo así a la patogénesis de la enfermedad.

El patrón de respuesta de esta subpoblación de linfocitos Treg es similar a la que se produce con los linfocitos $T\gamma\delta$, que son otra población de linfocitos con funciones inmunomoduladoras.

En cualquier caso, la respuesta anormal de los linfocitos Treg en los pacientes con EPOC proporciona un soporte adicional a la hipótesis que la autoinmunidad puede jugar un papel importante en la patogénesis de la EPOC.

Este estudio proporciona otros resultados de interés. Fumar reduce la expresión de la molécula co-estimuladora CD28 en los linfocitos T CD8+ en el BAL, pero no en la sangre periférica y esto ocurre independientemente de la presencia o ausencia de la EPOC. Dado que el proceso de maduración de los

linfocitos T implica una disminución de CD28 (159), este dato hallado en nuestro estudio sugiere que la maduración de los linfocitos T CD8+ está siendo activamente reclutada en los pulmones como respuesta al tabaco y no ligado a la patogénesis de la enfermedad. Por otro lado, no encontramos diferencias entre los diferentes grupos en ninguno de los diferentes marcadores estudiados en sangre periférica, mientras que una marcada compartimentación se observa cuando se comparan las muestras de sangre con las de BAL.

En resumen, este trabajo es el primero en describir el fenotipo de maduración-activación de los linfocitos T en pacientes con EPOC en comparación con el fenotipo de los linfocitos T en sujetos fumadores con función pulmonar conservada y con sujetos no fumadores. Los pacientes con EPOC presentan unos porcentajes más elevados de linfocitos CD8+CD45RA+. Este hecho, es consistente con el estado de maduración-activación final de estas células con un mayor potencial de lesionar tejidos. Por otra parte, este estudio es el primero en investigar las potenciales anomalías en la población de linfocitos T reguladores CD4+CD25+ en estos pacientes. En nuestro estudio pudimos demostrar que la respuesta normal de las células T reguladoras en respuesta al tabaco está ausente en pacientes con EPOC, apoyando estos datos la potencial implicación de la respuesta inmune adquirida en la patogénesis de la EPOC.

CONCLUSIONES

1. Los sujetos fumadores activos con función pulmonar conservada presentan un significativo aumento de los linfocitos T $\gamma\delta$ y linfocitos T CD8+ $\gamma\delta$ en el BAL, y esta respuesta está ausente en fumadores que han desarrollado EPOC
2. El perfil de las citoquinas expresadas por los linfocitos T pulmonares es de tipo 2, principalmente Tc2.
3. Las citoquinas de tipo 2 (IL-4, IL-10 y IL-13) presentan una correlación negativa con el grado de obstrucción al flujo aéreo.
4. Los pacientes con EPOC presentan unos porcentajes más elevados de células con un mayor potencial de lesionar tejidos.
5. Los pacientes con EPOC presentan en el BAL porcentajes mayores de linfocitos CD8+CD45RA+, células altamente citotóxicas y menores de linfocitos CD8+CD45RO+ que los fumadores con función pulmonar normal.
6. En el pulmón de los pacientes con EPOC existe un porcentaje mayor de linfocitos T CD4+ y CD8+ que expresan CD45RO y menor proporción de linfocitos que expresan CD28 comparado con los valores encontrados en sangre periférica. Este hecho, es consistente con el estado de maduración de estas células.
7. En el BAL, la proporción de linfocitos T CD8+CD28+ es menor respecto a la sangre periférica tanto en sujetos no fumadores, como en sujetos fumadores sin EPOC como en sujetos con EPOC. Esto sugiere un

proceso fisiológico de compartimentación del tráfico de los linfocitos T independiente a la patogenia de la EPOC.

8. En esta Tesis Doctoral se describe por primera vez como la respuesta de las células T reguladoras CD4+CD25+ en los sujetos fumadores está ausente en los pacientes con EPOC. Estos datos son complementarios a los resultados encontrados con los linfocitos T $\gamma\delta$, que también poseen funciones inmunomoduladoras.
9. No existen diferencias en cuanto a la distribución de linfocitos T $\alpha\beta$ CD4+ y CD8+ en sangre periférica y en el BAL de los grupos estudiados.
10. Globalmente todos los resultados obtenidos apoyan la implicación de la respuesta inmune adquirida en la patogénesis de la EPOC y adicionalmente proporcionan un soporte adicional a la hipótesis de que la autoinmunidad puede jugar un papel importante en la patogénesis de la EPOC.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Barnes PJ. Inhaled glucocorticoids for asthma. *N Engl J Med* 1995; 332(13):868-875.
- (2) Barnes PJ, Karin M. Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med* 1997; 336(15):1066-1071.
- (3) Kagoshima M, Cosio B, Adcock IM. How signaling pathways interact with gene transcription. *Monaldi Arch Chest Dis* 2003; 59(1):30-37.
- (4) Barnes PJ, Adcock IM, Ito K. Histone acetylation and deacetylation: importance in inflammatory lung diseases. *Eur Respir J* 2005; 25(3):552-563.
- (5) Rabe KF, Hurd S, Anzueto A, Barnes PJ, Buist SA, Calverley P et al. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 176(6):532-555.
- (6) Sobradillo V, Miravittles M, Jimenez CA, Gabriel R, Viejo JL, Masa JF et al. [Epidemiological study of chronic obstructive pulmonary disease in Spain (IBERPOC): prevalence of chronic respiratory symptoms and airflow limitation]. *Arch Bronconeumol* 1999; 35(4):159-166.
- (7) Sobradillo V, Miravittles M, Jimenez CA, Gabriel R, Viejo JL, Masa JF et al. [Epidemiological study of chronic obstructive pulmonary disease in Spain (IBERPOC): prevalence of chronic respiratory symptoms and airflow limitation]. *Arch Bronconeumol* 1999; 35(4):159-166.
- (8) Pauwels RA, Buist AS, Calverley PM, Jenkins CR, Hurd SS. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. NHLBI/WHO Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) Workshop summary. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163(5):1256-1276.
- (9) 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):367-372.
- (10) Fishman AP. One hundred years of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 171(9):941-948.
- (11) LIEBOW AA. Pulmonary emphysema with special reference to vascular changes. *Am Rev Respir Dis* 1959; 80(1, Part 2):67-93.
- (12) LAURELL CB, ERIKSSON S. THE SERUM ALPHA-L-ANTITRYPSIN IN FAMILIES WITH HYPO-ALPHA-L-ANTITRYPSINEMIA. *Clin Chim Acta* 1965; 11:395-398.
- (13) GROSS P, PFITZER EA, TOLKER E, BABYAK MA, KASCHAK M. EXPERIMENTAL EMPHYSEMA: ITS PRODUCTION WITH PAPAINE IN NORMAL AND SILICOTIC RATS. *Arch Environ Health* 1965; 11:50-58.
- (14) Orozco-Levi M, Garcia-Aymerich J, Villar J, Ramirez-Sarmiento A, Anto JM, Gea J. Wood smoke exposure and risk of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2006; 27(3):542-546.
- (15) Survival and FEV1 decline in individuals with severe deficiency of alpha1-antitrypsin. The Alpha-1-Antitrypsin Deficiency Registry Study Group. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158(1):49-59.

- (16) Pauwels RA, Buist AS, Calverley PM, Jenkins CR, Hurd SS. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. NHLBI/WHO Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) Workshop summary. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163(5):1256-1276.
- (17) Barnes PJ. Chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2000; 343(4):269-280.
- (18) Hogg JC, Chu F, Utokaparch S, Woods R, Elliott WM, Buzatu L et al. The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2004; 350(26):2645-2653.
- (19) 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(2):254-260.
- (20) Finkelstein R, Fraser RS, Ghezzi H, Cosio MG. Alveolar inflammation and its relation to emphysema in smokers. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152(5 Pt 1):1666-1672.
- (21) Retamales I, Elliott WM, Meshi B, Coxson HO, Pare PD, Scirba FC et al. Amplification of inflammation in emphysema and its association with latent adenoviral infection. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164(3):469-473.
- (22) Hogg JC, Chu F, Utokaparch S, Woods R, Elliott WM, Buzatu L et al. The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2004; 350(26):2645-2653.
- (23) Saetta M, Di Stefano A, Turato G, Facchini FM, Corbino L, Mapp CE et al. CD8+ T-lymphocytes in peripheral airways of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157(3 Pt 1):822-826.
- (24) Cosio MG, Majo J, Cosio MG. Inflammation of the airways and lung parenchyma in COPD: role of T cells. *Chest* 2002; 121(5 Suppl):160S-165S.
- (25) Agustí A, MacNee W, Donaldson K, Cosio M. Hypothesis: does COPD have an autoimmune component? *Thorax* 2003; 58(10):832-834.
- (26) Hogg JC, Chu F, Utokaparch S, Woods R, Elliott WM, Buzatu L et al. The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2004; 350(26):2645-2653.
- (27) Retamales I, Elliott WM, Meshi B, Coxson HO, Pare PD, Scirba FC et al. Amplification of inflammation in emphysema and its association with latent adenoviral infection. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164(3):469-473.
- (28) Hill AT, Bayley D, Stockley RA. The interrelationship of sputum inflammatory markers in patients with chronic bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160(3):893-898.
- (29) Keatings VM, Collins PD, Scott DM, Barnes PJ. Differences in interleukin-8 and tumor necrosis factor-alpha in induced sputum from patients with chronic obstructive pulmonary disease or asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153(2):530-534.
- (30) Di Stefano A, Maestrelli P, Roggeri A, Turato G, Calabro S, Potena A et al. Upregulation of adhesion molecules in the bronchial mucosa of subjects with chronic obstructive bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 149(3 Pt 1):803-810.
- (31) Zheng T, Zhu Z, Wang Z, Homer RJ, Ma B, Riese RJ, Jr. et al. Inducible targeting of IL-13 to the adult lung causes matrix metalloproteinase- and cathepsin-dependent emphysema. *J Clin Invest* 2000; 106(9):1081-1093.

- (32) Tashkin DP, Altose MD, Connett JE, Kanner RE, Lee WW, Wise RA. Methacholine reactivity predicts changes in lung function over time in smokers with early chronic obstructive pulmonary disease. The Lung Health Study Research Group. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153(6 Pt 1):1802-1811.
- (33) Wang Z, Zheng T, Zhu Z, Homer RJ, Riese RJ, Chapman HA, Jr. et al. Interferon gamma induction of pulmonary emphysema in the adult murine lung. *J Exp Med* 2000; 192(11):1587-1600.
- (34) Di Stefano A, Capelli A, Lusuardi M, Balbo P, Vecchio C, Maestrelli P et al. Severity of airflow limitation is associated with severity of airway inflammation in smokers. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158(4):1277-1285.
- (35) de Boer WI, van Schadewijk A, Sont JK, Sharma HS, Stolk J, Hiemstra PS et al. Transforming growth factor beta1 and recruitment of macrophages and mast cells in airways in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158(6):1951-1957.
- (36) Davidson A, Diamond B. Autoimmune diseases. *N Engl J Med* 2001; 345(5):340-350.
- (37) Barnes PJ. Inhaled corticosteroids are not beneficial in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161(2 Pt 1):342-344.
- (38) van Lier RA, Brouwer M, De Groot ED, Kramer I, Aarden LA, Verhoeven AJ. T cell receptor/CD3 and CD28 use distinct intracellular signaling pathways. *Eur J Immunol* 1991; 21(7):1775-1778.
- (39) Stamenkovic I, Sgroi D, Aruffo A, Sy MS, Anderson T. The B lymphocyte adhesion molecule CD22 interacts with leukocyte common antigen CD45RO on T cells and alpha 2-6 sialyltransferase, CD75, on B cells. *Cell* 1991; 66(6):1133-1144.
- (40) Hara M, Kitani A, Harigai M, Suzuki K, Hirose T, Kawakami M et al. Discrete association of CD3 and CD4 molecules in T-cell stimulation acting through the autologous mixed lymphocyte reaction and the CD3/T-cell receptor complex in human autoreactive T-cell clones. *Scand J Immunol* 1991; 33(2):141-149.
- (41) Veillette A, Bookman MA, Horak EM, Bolen JB. The CD4 and CD8 T cell surface antigens are associated with the internal membrane tyrosine-protein kinase p56lck. *Cell* 1988; 55(2):301-308.
- (42) June CH, Fletcher MC, Ledbetter JA, Samelson LE. Increases in tyrosine phosphorylation are detectable before phospholipase C activation after T cell receptor stimulation. *J Immunol* 1990; 144(5):1591-1599.
- (43) Turner JM, Brodsky MH, Irving BA, Levin SD, Perlmutter RM, Littman DR. Interaction of the unique N-terminal region of tyrosine kinase p56lck with cytoplasmic domains of CD4 and CD8 is mediated by cysteine motifs. *Cell* 1990; 60(5):755-765.
- (44) Sarosi GA, Thomas PM, Egerton M, Phillips AF, Kim KW, Bonvini E et al. Characterization of the T cell antigen receptor--p60fyn protein tyrosine kinase association by chemical cross-linking. *Int Immunol* 1992; 4(11):1211-1217.
- (45) Iwashima M, Irving BA, van Oers NS, Chan AC, Weiss A. Sequential interactions of the TCR with two distinct cytoplasmic tyrosine kinases. *Science* 1994; 263(5150):1136-1139.
- (46) Chan AC, Iwashima M, Turck CW, Weiss A. ZAP-70: a 70 kd protein-tyrosine kinase that associates with the TCR zeta chain. *Cell* 1992; 71(4):649-662.

- (47) Szamel M, Resch K. T-cell antigen receptor-induced signal-transduction pathways--activation and function of protein kinases C in T lymphocytes. *Eur J Biochem* 1995; 228(1):1-15.
- (48) Fanger CM, Hoth M, Crabtree GR, Lewis RS. Characterization of T cell mutants with defects in capacitative calcium entry: genetic evidence for the physiological roles of CRAC channels. *J Cell Biol* 1995; 131(3):655-667.
- (49) Rao A. NF-ATp: a transcription factor required for the co-ordinate induction of several cytokine genes. *Immunol Today* 1994; 15(6):274-281.
- (50) Yang Y, Wilson JM. CD40 ligand-dependent T cell activation: requirement of B7-CD28 signaling through CD40. *Science* 1996; 273(5283):1862-1864.
- (51) O'Garra A. Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets. *Immunity* 1998; 8(3):275-283.
- (52) Szabo SJ, Kim ST, Costa GL, Zhang X, Fathman CG, Glimcher LH. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* 2000; 100(6):655-669.
- (53) Mullen AC, High FA, Hutchins AS, Lee HW, Villarino AV, Livingston DM et al. Role of T-bet in commitment of TH1 cells before IL-12-dependent selection. *Science* 2001; 292(5523):1907-1910.
- (54) Lee GR, Fields PE, Flavell RA. Regulation of IL-4 gene expression by distal regulatory elements and GATA-3 at the chromatin level. *Immunity* 2001; 14(4):447-459.
- (55) Larosa DF, Orange JS. 1. Lymphocytes. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 121(2 Suppl):S364-S369.
- (56) Larosa DF, Orange JS. 1. Lymphocytes. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 121(2 Suppl):S364-S369.
- (57) Nakae S, Saijo S, Horai R, Sudo K, Mori S, Iwakura Y. IL-17 production from activated T cells is required for the spontaneous development of destructive arthritis in mice deficient in IL-1 receptor antagonist. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100(10):5986-5990.
- (58) Murphy CA, Langrish CL, Chen Y, Blumenschein W, McClanahan T, Kastelein RA et al. Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. *J Exp Med* 2003; 198(12):1951-1957.
- (59) Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD et al. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med* 2005; 201(2):233-240.
- (60) Cua DJ, Sherlock J, Chen Y, Murphy CA, Joyce B, Seymour B et al. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature* 2003; 421(6924):744-748.
- (61) Li MO, Wan YY, Sanjabi S, Robertson AK, Flavell RA. Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annu Rev Immunol* 2006; 24:99-146.
- (62) Iwakura Y, Ishigame H. The IL-23/IL-17 axis in inflammation. *J Clin Invest* 2006; 116(5):1218-1222.
- (63) Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD et al. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med* 2005; 201(2):233-240.

- (64) Cua DJ, Sherlock J, Chen Y, Murphy CA, Joyce B, Seymour B et al. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature* 2003; 421(6924):744-748.
- (65) Harrington LE, Mangan PR, Weaver CT. Expanding the effector CD4 T-cell repertoire: the Th17 lineage. *Curr Opin Immunol* 2006; 18(3):349-356.
- (66) Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang YH et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol* 2005; 6(11):1133-1141.
- (67) Zinkernagel RM, Althage A. Antiviral protection by virus-immune cytotoxic T cells: infected target cells are lysed before infectious virus progeny is assembled. *J Exp Med* 1977; 145(3):644-651.
- (68) Kemeny DM, Vyas B, Vukmanovic-Stejic M, Thomas MJ, Noble A, Loh LC et al. CD8(+) T cell subsets and chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160(5 Pt 2):S33-S37.
- (69) Balaji KN, Schaschke N, Machleidt W, Catalfamo M, Henkart PA. Surface cathepsin B protects cytotoxic lymphocytes from self-destruction after degranulation. *J Exp Med* 2002; 196(4):493-503.
- (70) Bromley SK, Burack WR, Johnson KG, Somersalo K, Sims TN, Sumen C et al. The immunological synapse. *Annu Rev Immunol* 2001; 19:375-396.
- (71) Shresta S, Pham CT, Thomas DA, Graubert TA, Ley TJ. How do cytotoxic lymphocytes kill their targets? *Curr Opin Immunol* 1998; 10(5):581-587.
- (72) Lieberman J. The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. *Nat Rev Immunol* 2003; 3(5):361-370.
- (73) Pasternack MS, Verret CR, Liu MA, Eisen HN. Serine esterase in cytolytic T lymphocytes. *Nature* 1986; 322(6081):740-743.
- (74) Heusel JW, Wesselschmidt RL, Shresta S, Russell JH, Ley TJ. Cytotoxic lymphocytes require granzyme B for the rapid induction of DNA fragmentation and apoptosis in allogeneic target cells. *Cell* 1994; 76(6):977-987.
- (75) Ebnet K, Hausmann M, Lehmann-Grube F, Mullbacher A, Kopf M, Lamers M et al. Granzyme A-deficient mice retain potent cell-mediated cytotoxicity. *EMBO J* 1995; 14(17):4230-4239.
- (76) Berke G. The CTL's kiss of death. *Cell* 1995; 81(1):9-12.
- (77) Shresta S, Pham CT, Thomas DA, Graubert TA, Ley TJ. How do cytotoxic lymphocytes kill their targets? *Curr Opin Immunol* 1998; 10(5):581-587.
- (78) Harty JT, Bevan MJ. Responses of CD8(+) T cells to intracellular bacteria. *Curr Opin Immunol* 1999; 11(1):89-93.
- (79) Reinhardt RL, Khoruts A, Merica R, Zell T, Jenkins MK. Visualizing the generation of memory CD4 T cells in the whole body. *Nature* 2001; 410(6824):101-105.
- (80) Lanzavecchia A, Sallusto F. Dynamics of T lymphocyte responses: intermediates, effectors, and memory cells. *Science* 2000; 290(5489):92-97.
- (81) Forster R, Schubel A, Breitfeld D, Kremmer E, Renner-Muller I, Wolf E et al. CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell* 1999; 99(1):23-33.

- (82) Campbell JJ, Murphy KE, Kunkel EJ, Brightling CE, Soler D, Shen Z et al. CCR7 expression and memory T cell diversity in humans. *J Immunol* 2001; 166(2):877-884.
- (83) Seddon B, Tomlinson P, Zamoyska R. Interleukin 7 and T cell receptor signals regulate homeostasis of CD4 memory cells. *Nat Immunol* 2003; 4(7):680-686.
- (84) Schluns KS, Kieper WC, Jameson SC, Lefrancois L. Interleukin-7 mediates the homeostasis of naive and memory CD8 T cells in vivo. *Nat Immunol* 2000; 1(5):426-432.
- (85) Zhang X, Sun S, Hwang I, Tough DF, Sprent J. Potent and selective stimulation of memory-phenotype CD8+ T cells in vivo by IL-15. *Immunity* 1998; 8(5):591-599.
- (86) Saetta M, Baraldo S, Corbino L, Turato G, Braccioni F, Rea F et al. CD8+ve cells in the lungs of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160(2):711-717.
- (87) Saetta M, Di Stefano A, Turato G, Facchini FM, Corbino L, Mapp CE et al. CD8+ T-lymphocytes in peripheral airways of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157(3 Pt 1):822-826.
- (88) 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(3):852-857.
- (89) Jameson J, Ugarte K, Chen N, Yachi P, Fuchs E, Boismenu R et al. A role for skin gammadelta T cells in wound repair. *Science* 2002; 296(5568):747-749.
- (90) Agusti AG, Noguera A, Sauleda J, Sala E, Pons J, Busquets X. Systemic effects of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2003; 21(2):347-360.
- (91) Amadori A, Zamarchi R, De Silvestro G, Forza G, Cavatton G, Danieli GA et al. Genetic control of the CD4/CD8 T-cell ratio in humans. *Nat Med* 1995; 1(12):1279-1283.
- (92) Mattoli S, Kleimberg J, Stacey MA, Bellini A, Sun G, Marini M. The role of CD8+ Th2 lymphocytes in the development of smoking-related lung damage. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 239(1):146-149.
- (93) Miotto D, Ruggieri MP, Boschetto P, Cavallesco G, Papi A, Bononi I et al. Interleukin-13 and -4 expression in the central airways of smokers with chronic bronchitis. *Eur Respir J* 2003; 22(4):602-608.
- (94) Zhu J, Majumdar S, Qiu Y, Ansari T, Oliva A, Kips JC et al. Interleukin-4 and interleukin-5 gene expression and inflammation in the mucus-secreting glands and subepithelial tissue of smokers with chronic bronchitis. Lack of relationship with CD8(+) cells. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164(12):2220-2228.
- (95) Majori M, Corradi M, Caminati A, Cacciani G, Bertacco S, Pesci A. Predominant TH1 cytokine pattern in peripheral blood from subjects with chronic obstructive pulmonary disease. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 103(3 Pt 1):458-462.
- (96) Di Stefano A, Caramori G, Capelli A, Gnemmi I, Ricciardolo FL, Oates T et al. STAT4 activation in smokers and patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2004; 24(1):78-85.
- (97) Grumelli S, Corry DB, Song LZ, Song L, Green L, Huh J et al. An immune basis for lung parenchymal destruction in chronic obstructive pulmonary disease and emphysema. *PLoS Med* 2004; 1(1):e8.

- (98) Majo J, Ghezzeo H, Cosio MG. Lymphocyte population and apoptosis in the lungs of smokers and their relation to emphysema. *Eur Respir J* 2001; 17(5):946-953.
- (99) Agustí A, MacNee W, Donaldson K, Cosio M. Hypothesis: does COPD have an autoimmune component? *Thorax* 2003; 58(10):832-834.
- (100) Barnes PJ, Cosio MG. Characterization of T lymphocytes in chronic obstructive pulmonary disease. *PLoS Med* 2004; 1(1):e20.
- (101) Hogg JC, Chu F, Utokaparch S, Woods R, Elliott WM, Buzatu L et al. The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2004; 350(26):2645-2653.
- (102) Turato G, Di Stefano A, Maestrelli P, Mapp CE, Ruggieri MP, Roggeri A et al. Effect of smoking cessation on airway inflammation in chronic bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152(4 Pt 1):1262-1267.
- (103) Willemse BW, ten Hacken NH, Rutgers B, Lesman-Leegte IG, Postma DS, Timens W. Effect of 1-year smoking cessation on airway inflammation in COPD and asymptomatic smokers. *Eur Respir J* 2005; 26(5):835-845.
- (104) Retamales I, Elliott WM, Meshi B, Coxson HO, Pare PD, Sciruba FC et al. Amplification of inflammation in emphysema and its association with latent adenoviral infection. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164(3):469-473.
- (105) Barnes PJ, Cosio MG. Characterization of T lymphocytes in chronic obstructive pulmonary disease. *PLoS Med* 2004; 1(1):e20.
- (106) Grumelli S, Corry DB, Song LZ, Song L, Green L, Huh J et al. An immune basis for lung parenchymal destruction in chronic obstructive pulmonary disease and emphysema. *PLoS Med* 2004; 1(1):e8.
- (107) Majo J, Ghezzeo H, Cosio MG. Lymphocyte population and apoptosis in the lungs of smokers and their relation to emphysema. *Eur Respir J* 2001; 17(5):946-953.
- (108) Agustí A, MacNee W, Donaldson K, Cosio M. Hypothesis: does COPD have an autoimmune component? *Thorax* 2003; 58(10):832-834.
- (109) Barnes PJ, Cosio MG. Characterization of T lymphocytes in chronic obstructive pulmonary disease. *PLoS Med* 2004; 1(1):e20.
- (110) Sullivan AK, Simonian PL, Falta MT, Mitchell JD, Cosgrove GP, Brown KK et al. Oligoclonal CD4+ T cells in the lungs of patients with severe emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172(5):590-596.
- (111) Lee SH, Goswami S, Grudo A, Song LZ, Bandi V, Goodnight-White S et al. Antielastin autoimmunity in tobacco smoking-induced emphysema. *Nat Med* 2007; 13(5):567-569.
- (112) Bluestone JA, Tang Q. How do CD4+CD25+ regulatory T cells control autoimmunity? *Curr Opin Immunol* 2005; 17(6):638-642.
- (113) Jiang H, Chess L. Regulation of immune responses by T cells. *N Engl J Med* 2006; 354(11):1166-1176.
- (114) Bluestone JA, Tang Q. How do CD4+CD25+ regulatory T cells control autoimmunity? *Curr Opin Immunol* 2005; 17(6):638-642.
- (115) Jiang H, Chess L. Regulation of immune responses by T cells. *N Engl J Med* 2006; 354(11):1166-1176.

- (116) Mottonen M, Heikkinen J, Mustonen L, Isomaki P, Luukkainen R, Lassila O. CD4+ CD25+ T cells with the phenotypic and functional characteristics of regulatory T cells are enriched in the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol* 2005; 140(2):360-367.
- (117) Ait-Oufella H, Salomon BL, Potteaux S, Robertson AK, Gourdy P, Zoll J et al. Natural regulatory T cells control the development of atherosclerosis in mice. *Nat Med* 2006; 12(2):178-180.
- (118) Saetta M, Di Stefano A, Turato G, Facchini FM, Corbino L, Mapp CE et al. CD8+ T-lymphocytes in peripheral airways of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157(3 Pt 1):822-826.
- (119) 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(3):852-857.
- (120) Saetta M, Baraldo S, Corbino L, Turato G, Braccioni F, Rea F et al. CD8+ve cells in the lungs of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160(2):711-717.
- (121) Saetta M, Baraldo S, Corbino L, Turato G, Braccioni F, Rea F et al. CD8+ve cells in the lungs of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160(2):711-717.
- (122) Saetta M, Di Stefano A, Turato G, Facchini FM, Corbino L, Mapp CE et al. CD8+ T-lymphocytes in peripheral airways of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157(3 Pt 1):822-826.
- (123) 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(3):852-857.
- (124) de Jong JW, Belt-Gritter B, Koeter GH, Postma DS. Peripheral blood lymphocyte cell subsets in subjects with chronic obstructive pulmonary disease: association with smoking, IgE and lung function. *Respir Med* 1997; 91(2):67-76.
- (125) Kim WD, Kim WS, Koh Y, Lee SD, Lim CM, Kim DS et al. Abnormal peripheral blood T-lymphocyte subsets in a subgroup of patients with COPD. *Chest* 2002; 122(2):437-444.
- (126) Jameson J, Witherden D, Havran WL. T-cell effector mechanisms: gammadelta and CD1d-restricted subsets. *Curr Opin Immunol* 2003; 15(3):349-353.
- (127) Rennard SI. Inflammation and repair processes in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160(5 Pt 2):S12-S16.
- (128) Richmond I, Pritchard GE, Ashcroft T, Corris PA, Walters EH. Distribution of gamma delta T-cells in the bronchial tree of smokers and non-smokers. *J Clin Pathol* 1993; 46(10):926-930.
- (129) 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(5):946-953.
- (130) Ekberg-Jansson A, Andersson B, Avra E, Nilsson O, Lofdahl CG. The expression of lymphocyte surface antigens in bronchial biopsies, bronchoalveolar lavage cells and blood cells in healthy smoking and never-smoking men, 60 years old. *Respir Med* 2000; 94(3):264-272.
- (131) Jameson J, Ugarte K, Chen N, Yachi P, Fuchs E, Boismenu R et al. A role for skin gammadelta T cells in wound repair. *Science* 2002; 296(5568):747-749.

- (132) Chen Y, Chou K, Fuchs E, Havran WL, Boismenu R. Protection of the intestinal mucosa by intraepithelial gamma delta T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99(22):14338-14343.
- (133) King DP, Hyde DM, Jackson KA, Novosad DM, Ellis TN, Putney L et al. Cutting edge: protective response to pulmonary injury requires gamma delta T lymphocytes. *J Immunol* 1999; 162(9):5033-5036.
- (134) Lahn M, Kanehiro A, Takeda K, Joetham A, Schwarze J, Kohler G et al. Negative regulation of airway responsiveness that is dependent on gammadelta T cells and independent of alphabeta T cells. *Nat Med* 1999; 5(10):1150-1156.
- (135) Born WK, Lahn M, Takeda K, Kanehiro A, O'Brien RL, Gelfand EW. Role of gammadelta T cells in protecting normal airway function. *Respir Res* 2000; 1(3):151-158.
- (136) Harrison LC, Dempsey-Collier M, Kramer DR, Takahashi K. Aerosol insulin induces regulatory CD8 gamma delta T cells that prevent murine insulin-dependent diabetes. *J Exp Med* 1996; 184(6):2167-2174.
- (137) Hogg JC, Chu F, Utokaparch S, Woods R, Elliott WM, Buzatu L et al. The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2004; 350(26):2645-2653.
- (138) Hogg JC. Pathophysiology of airflow limitation in chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet* 2004; 364(9435):709-721.
- (139) Barnes PJ. Small airways in COPD. *N Engl J Med* 2004; 350(26):2635-2637.
- (140) Barnes PJ. Chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2000; 343(4):269-280.
- (141) Mattoli S, Kleimberg J, Stacey MA, Bellini A, Sun G, Marini M. The role of CD8+ Th2 lymphocytes in the development of smoking-related lung damage. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 239(1):146-149.
- (142) Mattoli S, Kleimberg J, Stacey MA, Bellini A, Sun G, Marini M. The role of CD8+ Th2 lymphocytes in the development of smoking-related lung damage. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 239(1):146-149.
- (143) Zhu J, Majumdar S, Qiu Y, Ansari T, Oliva A, Kips JC et al. Interleukin-4 and interleukin-5 gene expression and inflammation in the mucus-secreting glands and subepithelial tissue of smokers with chronic bronchitis. Lack of relationship with CD8(+) cells. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164(12):2220-2228.
- (144) Majori M, Corradi M, Caminati A, Cacciani G, Bertacco S, Pesci A. Predominant TH1 cytokine pattern in peripheral blood from subjects with chronic obstructive pulmonary disease. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 103(3 Pt 1):458-462.
- (145) Di Stefano A, Caramori G, Capelli A, Gnemmi I, Ricciardolo FL, Oates T et al. STAT4 activation in smokers and patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2004; 24(1):78-85.
- (146) Atamas SP, Yurovsky VV, Wise R, Wigley FM, Goter Robinson CJ, Henry P et al. Production of type 2 cytokines by CD8+ lung cells is associated with greater decline in pulmonary function in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 1999; 42(6):1168-1178.

- (147) Grumelli S, Corry DB, Song LZ, Song L, Green L, Huh J et al. An immune basis for lung parenchymal destruction in chronic obstructive pulmonary disease and emphysema. *PLoS Med* 2004; 1(1):e8.
- (148) Gan WQ, Man SF, Senthilselvan A, Sin DD. Association between chronic obstructive pulmonary disease and systemic inflammation: a systematic review and a meta-analysis. *Thorax* 2004; 59(7):574-580.
- (149) Rincon M, Anguita J, Nakamura T, Fikrig E, Flavell RA. Interleukin (IL)-6 directs the differentiation of IL-4-producing CD4+ T cells. *J Exp Med* 1997; 185(3):461-469.
- (150) Dodge IL, Carr MW, Cernadas M, Brenner MB. IL-6 production by pulmonary dendritic cells impedes Th1 immune responses. *J Immunol* 2003; 170(9):4457-4464.
- (151) Zheng T, Zhu Z, Wang Z, Homer RJ, Ma B, Riese RJ, Jr. et al. Inducible targeting of IL-13 to the adult lung causes matrix metalloproteinase- and cathepsin-dependent emphysema. *J Clin Invest* 2000; 106(9):1081-1093.
- (152) Vukmanovic-Stejic M, Vyas B, Gorak-Stolinska P, Noble A, Kemeny DM. Human Tc1 and Tc2/Tc0 CD8 T-cell clones display distinct cell surface and functional phenotypes. *Blood* 2000; 95(1):231-240.
- (153) Hogg JC, Chu F, Utokaparch S, Woods R, Elliott WM, Buzatu L et al. The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2004; 350(26):2645-2653.
- (154) 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(5):946-953.
- (155) Finkelstein R, Fraser RS, Ghezzi H, Cosio MG. Alveolar inflammation and its relation to emphysema in smokers. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152(5 Pt 1):1666-1672.
- (156) Saetta M, Di Stefano A, Turato G, Facchini FM, Corbino L, Mapp CE et al. CD8+ T-lymphocytes in peripheral airways of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157(3 Pt 1):822-826.
- (157) Saetta M, Baraldo S, Corbino L, Turato G, Braccioni F, Rea F et al. CD8+ve cells in the lungs of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160(2):711-717.
- (158) Sullivan AK, Simonian PL, Falta MT, Mitchell JD, Cosgrove GP, Brown KK et al. Oligoclonal CD4+ T cells in the lungs of patients with severe emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172(5):590-596.
- (159) Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol* 2004; 22:745-763.
- (160) Bluestone JA, Tang Q. How do CD4+CD25+ regulatory T cells control autoimmunity? *Curr Opin Immunol* 2005; 17(6):638-642.
- (161) Jiang H, Chess L. Regulation of immune responses by T cells. *N Engl J Med* 2006; 354(11):1166-1176.
- (162) Mottonen M, Heikkinen J, Mustonen L, Isomaki P, Luukkainen R, Lassila O. CD4+ CD25+ T cells with the phenotypic and functional characteristics of regulatory T cells are enriched in the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol* 2005; 140(2):360-367.

- (163) Ait-Oufella H, Salomon BL, Potteaux S, Robertson AK, Gourdy P, Zoll J et al. Natural regulatory T cells control the development of atherosclerosis in mice. *Nat Med* 2006; 12(2):178-180.

ANEXO

Otras publicaciones relacionadas

- Fuster A, Sauleda J, Sala E, **Barceló B**, Pons J, Carrera M, Noguera A, Togores B, Agustí AG. Systemic inflammation after inspiratory loading in chronic obstructive pulmonary disease. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2008;3(1):149-53.
- Pons AR, Sauleda J, Noguera A, Pons J, **Barceló B**, Fuster A, Agustí AG. Decreased macrophage release of TGF-beta and TIMP-1 in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J*. 2005 Jul;26 (1):60-6.

Becas obtenidas

- Título del proyecto: "Papel de la respuesta inmune en la patogénesis de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica". Agencia financiadora: Ministerio de Ciencia y Tecnología. Fondos de Investigación Sanitaria (RTIC C03/11, 02/0986).



Decreased macrophage release of TGF- β and TIMP-1 in chronic obstructive pulmonary disease

A.R. Pons*, J. Sauleda#, A. Noguera*, J. Pons[†], B. Barceló*,
A. Fuster# and A.G.N. Agustí#

ABSTRACT: The present study tested the hypothesis that alveolar macrophages (AM) from patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) release more pro-inflammatory and/or less anti-inflammatory mediators than those from smokers with normal lung function and never-smokers.

AM were sorted by flow cytometry from bronchoalveolar lavage fluid in 13 patients with COPD (mean \pm SEM 67 \pm 2 yrs, forced expiratory volume in one second (FEV₁) 61 \pm 4% reference), 16 smokers with normal lung function (55 \pm 2 yrs, FEV₁ 97 \pm 4% reference) and seven never-smokers (67 \pm 7 yrs, FEV₁ 94 \pm 4% reference). After sorting, AM were cultured (with and without lipopolysaccharide stimulation) after 4 h and 24 h, and the concentrations of leukotriene B₄ (LTB₄), transforming growth factor (TGF)- β ₁ and tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1 were quantified in the supernatant by ELISA. The production of reactive oxygen intermediates (ROI) in freshly isolated AM was determined by flow cytometry.

LTB₄ secretion and ROI production were not different between groups. In contrast, AM from COPD patients released significantly less TGF- β ₁ and TIMP-1 than those from smokers with normal lung function and nonsmokers.

In conclusion, these observations are compatible with reduced anti-inflammatory and anti-elastolytic capacity in chronic obstructive pulmonary disease, which is likely to contribute to the pathogenesis of the disease.

KEYWORDS: Chronic obstructive pulmonary disease, leukotrienes, oxidative stress, tissue inhibitor of metalloproteinase-1, transforming growth factor- β ₁

The inflammatory response to tobacco smoking is an essential pathogenic factor in chronic obstructive pulmonary disease (COPD) [1]. A variety of inflammatory cells, including alveolar macrophages (AM), polymorphonuclear (PMN) leukocytes and lymphocytes [2], and mediators such as cytokines, oxidants and matrix metalloproteinases (MMPs) participate in this response [2]. Given that tobacco smoking elicits an inflammatory response in all smokers [3], but only some of them develop COPD [4], it is likely that its type, intensity, localisation and/or failure to resolve after smoking cessation may contribute to the pathogenesis of the disease [5].

AM are ideally suited to control the degree and duration of the inflammatory response elicited by tobacco smoking because they are the major immunocompetent cell population in the lower human respiratory tract, where they act as sentinel cells [6]. In response to an inflammatory

stimulus such as smoking, AM rapidly release the following: 1) cytokines, such as interleukin (IL)-8 and tumour necrosis factor- α , which act in further recruiting PMNs that can, in turn, release more inflammatory mediators [7]; 2) leukotriene B₄ (LTB₄), a potent chemoattractant for other inflammatory cells [7]; 3) reactive oxygen intermediates (ROI) [8, 9], which can contribute towards enhancing the inflammatory response; and 4) MMP-1 and MMP-9, which can degrade the interstitial matrix and cause emphysema [7]. Conversely, AM also contribute to the resolution of the inflammatory response because they are capable of releasing several anti-inflammatory molecules, such as transforming growth factor (TGF)- β and tissue inhibitors of MMPs (TIMPs) [6, 7]. Previous studies in COPD have reported an abnormal release of IL-8, MMP-1 and MMP-9 by AM in these patients [9–11]. In the present investigation, the hypothesis that AM harvested

AFFILIATIONS

*Serveis de Anàlisis Clínics,
#Pneumologia, and
[†]Unitat de Investigació, Hospital
Universitari Son Dureta, IUNICS
(Institut Universitari d'Investigació en
Ciències de la Salut), Palma de
Mallorca, Spain.

CORRESPONDENCE

J. Sauleda
Servei Pneumologia
Hospital Universitari
Son Dureta
Andrea Doria 55
07014 Palma Mallorca
Spain
Fax: 34 971175228
E-mail: jsauleda@hds.es

Received:

March 17 2004

Accepted after revision:

March 21 2005

SUPPORT STATEMENT

The study was supported, in part, by CICYT (Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología, Madrid, Spain; SAF 2001/0203), SEPAR (Sociedad Española de Patología del Aparato Respiratorio, Barcelona, Spain), Red Respira (Madrid, Spain; RTIC 03/11, Fondo de Investigación Sanitaria, Instituto de Salud Carlos III) and ABEMAR (Associació Balear per l'Estudi de les Malalties Respiratòries, Palma Mallorca, Spain). This study was presented partially as an abstract at ATS, ERS and SEPAR meetings in 2003.

European Respiratory Journal
Print ISSN 0903-1936
Online ISSN 1399-3003

from patients with COPD release more pro-inflammatory mediators (LTB₄, ROI) and/or less anti-inflammatory molecules (TGF- β ₁, TIMP-1) than those obtained from smokers with preserved lung function was tested.

METHODS

Subjects and ethics

The current authors studied 13 patients with COPD (four current and nine ex-smokers) as defined by the Global Initiative for Obstructive Lung Disease (GOLD) criteria [1], 16 active smokers without chronic bronchitis or dyspnoea and with normal lung function, and seven never-smokers. All required bronchoscopic evaluation of a solitary pulmonary nodule or a haemoptysis episode. All patients with COPD were clinically stable and had not had any exacerbations for at least the 3 months that preceded inclusion in the study. The patients were treated with inhaled bronchodilators (salmeterol and/or salbutamol and/or ipratropium bromide), and four patients were treated with inhaled corticosteroids (ICS), but none received oral steroids. Patients with other chronic lung diseases (e.g. asthma, bronchiectasis and interstitial lung diseases) and cardiac, hepatic or renal failure were excluded. All participants gave signed, informed consent. The Ethics Committee of Comitè d'Ètica de les Illes Balears (Palma Mallorca, Spain) approved the study protocol.

Lung function

A forced spirometry (GS; Warren E. Collins, Braintree, MA, USA) was obtained in all participants [12]. Spirometric reference values were those of a Mediterranean population [13]. Exhaled CO concentrations (ToxCO; Bedford, Rochester, UK) were recorded before bronchoscopy to exclude active smoking.

Bronchoscopy

Bronchoscopy was performed with a flexible fiberoptic bronchoscope (Pentax 15v; Pentax, Tokyo, Japan). Active smoking subjects refrained from smoking for at least 12 h before bronchoscopy. This was checked by the exhaled CO concentration, which was <10 ppm in all cases. Bronchoalveolar lavage (BAL) was performed following the standard methodology. Eight 25-mL aliquots of sterile saline solution were instilled in one pulmonary segment of one of the lower pulmonary lobes not containing any nodule. Aliquots were placed in plastic recipients and immediately centrifuged at 200 × g for 10 min at 4°C. The cell pellet was washed once in calcium- and magnesium-free Hank's balanced saline solution (Gibco BRL, Eggenstein, Germany) and resuspended in minimal essential medium (Gibco BRL) until sorting. Cells were counted with a haemocytometer. Viability determined by trypan blue exclusion was always >95%.

The presence of airway bacterial infection was excluded by using a protected specimen brush (PSB; Mill-Rose Lab, Mentor, OH, USA) to sample bronchial secretions sterilely before BAL [14]. The culture of PSB samples yielded <10³ colony forming units·mL⁻¹ in all participants.

Sorting of alveolar macrophages

AM were sorted in BAL samples using a Coulter Epics Altra HyPerSort™ System (Beckman Coulter, Izasa, Spain). Calibration of the optical system was performed using flow-check

fluorospheres (Beckman Coulter). Nozzle orifice, flow rate and sorting strategy were set up as previously described [15]. Briefly, a 100- μ m diameter flow cell tip was used and the flow rate was adjusted to 400–500 events·s⁻¹. AM were gated on a forward scatter (linear scale) versus green fluorescence (logarithmic scale) to discriminate them, with a high degree of autofluorescence from neutrophils and lymphocytes. Cell suspensions, before and after sorting, were kept in polypropylene tubes and maintained on ice. After sorting, cells were counted in a haemocytometer and viability was determined by trypan blue exclusion. Cytospin preparations were prepared for morphological differentiation of BAL cells following Papanicolaou staining. The purity of sorted AM was always >96% as analysed by flow cytometry and visual quantification. Cell viability by trypan blue exclusion was always >95%.

Macrophage culture

Sorted AM were suspended at 5 × 10⁵·mL⁻¹ in endotoxin-free RPMI 1640/10% foetal calf serum, supplemented with 2 mM L-glutamine, 25 U·mL⁻¹ penicillin and 25 μ g·mL⁻¹ streptomycin. Cells were separated into aliquots and cultured in 24-well polystyrene plates (Nunc, Wiesbaden, Germany) at 37°C and 5% CO₂ for 4 h and 24 h, with or without lipopolysaccharide (LPS (O55:B5), 100 ng·mL⁻¹ (final concentration); *Escherichia coli* LPS; Sigma Chemicals CO, St. Louis, MO, USA). At these time points, the supernatant was collected and stored cell free at -80°C until analysed.

Measurement of TGF- β , TIMP and LTB₄

The cell culture supernatant concentration of TGF- β ₁, TIMP-1 and LTB₄ was measured using a commercially available sandwich ELISA kits (Amersham Pharmacia Biotech, Chalfont, UK). Biologically active TGF- β ₁ was measured in previously acidified samples (0.02 mL of 1-M hydrochloric acid was added to 100 μ L of samples to achieve pH 1–2). LTB₄ was measured using an enzyme-immunoassay system according to the manufacturer's directions (Amersham Pharmacia Biotech). The detection limits of TGF- β ₁, TIMP-1 and LTB₄ assays were 6 pg·mL⁻¹, 15.6 pg·mL⁻¹ and 1.25 pg·mL⁻¹, respectively.

Measurement of ROI

Production of ROI by fresh AM was determined by flow cytometry through the formation of the fluorescent compound rhodamine-123 from dihydrorhodamine-123 (DHR; Molecular Probes, Eugene, OR, USA). In brief, two 200- μ L samples of the macrophage suspension (5 × 10⁵·mL⁻¹; Falcon No. 2052; Beckton-Dickinson, Lincoln Park, NJ, USA) were incubated in polypropylene tubes with 10 μ L of a DHR solution (100 μ g·mL⁻¹) for 10 min at 37°C. One sample was used to assess the spontaneous ROI production, while the other was mixed with 20 μ L of LPS (10 ng·mL⁻¹, final concentration). Both samples were incubated for 30 min at 37°C. At the end of the second incubation period, 500 μ L of cold PBS was added to both samples, which were then kept on ice until analysed by flow cytometry on a Coulter Epics Altra HyPerSort™ System (Beckman Coulter) with a gate setting for macrophages on forward and side scatter. In total, 10,000 cells were analysed; green fluorescence was determined and mean cellular fluorescence intensities were calculated using LYSIS II software. Cell suspensions served as controls of autofluorescence. The

intensity of the specific fluorescence was calculated and expressed as relative linear mean fluorescence (RLMF), the ratio of specific to nonspecific (autofluorescence) linear fluorescence.

Statistical analysis

Results are shown as mean \pm SEM. One-way ANOVA (followed by *post hoc* contrast (Scheffe) if appropriate) was used to assess the statistical significance of the differences between groups. To analyse the potential effects of ICS in patients with COPD, the Mann-Whitney U-test was used. Correlations between variables of interest were explored using the Spearman rank test. A p-value <0.05 was considered significant.

RESULTS

Anthropometric and functional data

Table 1 presents the main clinical and lung function data of all participants. Age was similar in never-smokers and patients with COPD, but smokers with normal lung function were younger. Likewise, the latter had a smaller smoking exposure than patients with COPD (table 1). According to GOLD criteria, patients with COPD showed moderate airflow obstruction. By definition, spirometry was normal in smokers with normal lung function and never-smokers.

BAL cell count

Total cell count was higher in smokers with normal lung function ($3.6 \pm 0.6 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$) than in nonsmokers ($0.9 \pm 0.5 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$; $p < 0.05$). Patients with COPD also showed a trend towards higher values ($2.1 \pm 0.5 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$), but differences failed to reach statistical significance. Differential cell counts were similar among groups (table 2). Nevertheless, the number of AM tended to be higher in smokers with normal lung function, and the number of neutrophils appeared to be increased in patients with COPD. Overall, these observations are in keeping with previous studies [16].

LTB₄ release

After 4 h in culture, LTB₄ levels were similar in nonsmokers ($222 \pm 107 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$) and smokers with normal lung function

TABLE 1 Clinical and lung function data of all participants

	Nonsmokers	Smokers with normal lung function	COPD
Subjects n	7	16	13
Age yrs	67 \pm 7	55 \pm 2	67 \pm 2 [#]
Pack-yrs	0	40 \pm 4 ^{**}	61 \pm 7 ^{**,#}
Active smokers	0	16	4
Ex-smokers	0	0	9
Inhaled steroids	0	0	4
FEV ₁ % pred	94 \pm 4	97 \pm 4	61 \pm 4 ^{*,#}
FEV ₁ /FVC %	81 \pm 4	81 \pm 2	59 \pm 2 ^{*,#}

Data are presented as mean \pm SEM. COPD: chronic obstructive pulmonary disease; FEV₁: forced expiratory volume in one second; % pred: % predicted; FVC: forced vital capacity. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$ (versus nonsmokers); #: $p < 0.05$ (versus smokers with normal lung function). Spirometric reference values were those of a Mediterranean population [13].

TABLE 2 Bronchoalveolar lavage fluid total and differential cell counts

	Nonsmokers	Smokers with normal lung function	COPD
Subjects n	7	16	13
Total cell count $\times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$	0.9 \pm 0.5	3.6 \pm 0.6*	2.1 \pm 0.5
Macrophages %	90 \pm 5	94 \pm 1	90 \pm 2
Lymphocytes %	7 \pm 5	5 \pm 1	7.5 \pm 1
Neutrophils %	0.8 \pm 0.5	0.8 \pm 0.2	2.5 \pm 1

Data are presented as mean \pm SEM. COPD: chronic obstructive disease. *: $p < 0.05$ versus nonsmokers.

($244 \pm 107 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$). Patients with COPD showed a trend towards lower values ($137 \pm 61 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$), but differences failed to reach statistical significance. LPS stimulation did not modulate these levels significantly (nonsmokers: $284 \pm 144 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$; smokers with normal lung function: $342 \pm 99 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$; patients with COPD: $226 \pm 94 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$). The current authors did not measure LTB₄ release after 24 h in culture, as previous studies have shown that LTB₄ is almost completely metabolised at this time point [17].

ROI production

ROI production was similar in nonsmokers (8.32 ± 3.67 RLMF), smokers with normal lung function (5.03 ± 1.47 RLMF) and patients with COPD (6.32 ± 1.68 RLMF). LPS stimulation did not modify these values significantly (nonsmokers: 8.26 ± 4.07 RLMF; smokers with normal lung function: 5.29 ± 1.60 RLMF; patients with COPD: 6.37 ± 1.69 RLMF).

TGF- β_1 release

After 4 h in culture, TGF- β_1 concentration was below the detection limit of the assay in all groups. At 24 h, TGF- β_1 levels were detectable and similar in all of them (fig. 1). The addition

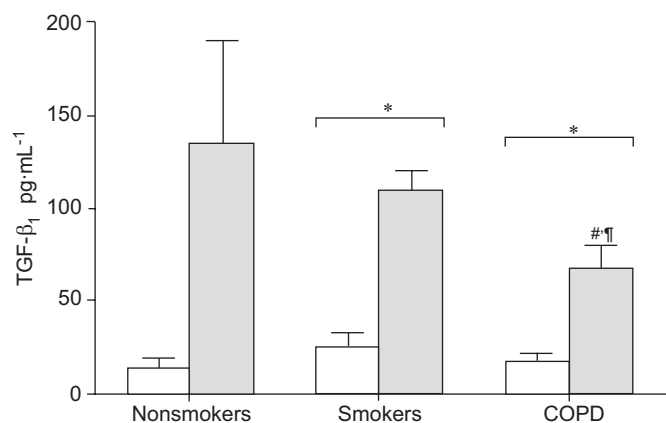


FIGURE 1. Transforming growth factor (TGF)- β_1 release after 24 h in culture in each of the subject groups studied, both with (■) and without (□) *Escherichia coli* lipopolysaccharide ($100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) stimulation. COPD: chronic obstructive pulmonary disease. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; #: $p < 0.05$ versus nonsmokers; !: $p < 0.05$ versus smokers with normal lung function.

of LPS increased TGF- β_1 release in all groups, but this effect was significantly attenuated in patients with COPD (67 ± 13 ng·mL $^{-1}$) as compared with smokers with normal lung function (135 ± 55 ng·mL $^{-1}$; $p < 0.01$) or nonsmokers (110 ± 10 ng·mL $^{-1}$; $p < 0.05$).

TIMP-1 release

After 4 h in culture, without LPS stimulation, AM from smokers with normal lung function released less TIMP-1 (6.2 ± 2.1 ng·mL $^{-1}$) than nonsmokers (11.7 ± 2.4 ng·mL $^{-1}$; $p < 0.05$). This defect was further accentuated in patients with COPD (1.7 ± 0.4 ng·mL $^{-1}$; $p < 0.05$ versus smokers with normal lung function; fig. 2). Stimulation with LPS augmented TIMP-1 release in nonsmokers (16.7 ± 4 ng·mL $^{-1}$; $p < 0.05$). Interestingly, this effect was clearly reduced in smokers with normal lung function (6.2 ± 2.1 ng·mL $^{-1}$), and basically abolished in patients with COPD (2.4 ± 0.8 ng·mL $^{-1}$). At 24 h, TIMP-1 release increased significantly in all groups (note change of y-axis scale in fig. 2). LPS stimulation did not enhance TIMP-1 release any further in any group, but differences observed at 4 h between groups persisted. Hence, TIMP-1 release was significantly lower in smokers with normal lung function and almost absent in patients with COPD (fig. 2).

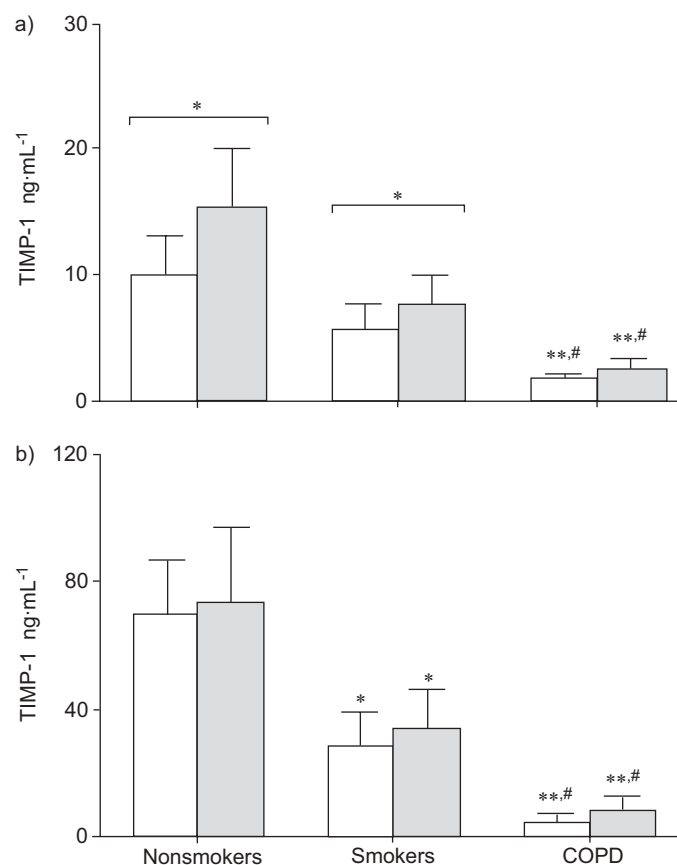


FIGURE 2. Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1 release after a) 4 h, and b) 24 h in culture in each of the subject groups studied, both with (■) and without (□) *Escherichia coli* lipopolysaccharide (100 ng·mL $^{-1}$) stimulation. COPD: chronic obstructive pulmonary disease. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$ versus nonsmokers; #: $p < 0.05$ versus smokers with normal lung function.

Effect of ICS

LTB $_4$, TGF- β_1 , TIMP-1 and ROI production were not different at any time point in patients treated with ($n=4$) or without ICS ($n=9$).

Physiological correlates

As smokers with normal lung function were younger and had smoked less than patients with COPD (table 1), in order to investigate a potential confounding effect of these two variables upon the different mediators studied, the biological relationships between the former and the latter were explored. However, no significant relationship could be found.

DISCUSSION

Tobacco smoking is the major risk factor for COPD [1]. However, only a small percentage of smokers develop the disease [2]. An excessive and persistent inflammatory response appears to be the hallmark of these latter individuals [5]. In theory, this can be due either to an enhanced inflammatory response to tobacco smoking and/or a failure to switch off the inflammatory machinery when the stimuli cease [5]. AM are the major immunocompetent cell population in the lower human respiratory tract and, as such, they are likely to play a significant role in the initiation, modulation and eventual termination of the inflammation that follows cigarette smoking [7]. In this study, the capacity of AM to secrete both pro- (LTB $_4$, ROI) and anti-inflammatory molecules (TGF- β_1 and TIMP-1) in patients with COPD was investigated. It was found that AM from these patients released similar amounts of LTB $_4$ and ROI than those from smokers with preserved lung function or nonsmokers. In contrast, the released TGF- β_1 and TIMP-1 by AM were markedly impaired in COPD.

LTB $_4$ is increased in breath condensate [18], induced sputum [18] and serum [19] of patients with COPD. However, AM release of LTB $_4$ has not been previously investigated in these patients. An abnormal release of LTB $_4$ by AM in COPD was not observed. This is similar to that reported by SPENCER *et al.* [20] in AM from patients with α -antitrypsin deficiency, and suggests that the main cellular source of LTB $_4$ in COPD is a different cell type, perhaps the neutrophil [21]. This is not to say that AM are not important sources of other inflammatory mediators in COPD, such as IL-8 [9].

Oxidative stress is an important factor in the pathogenesis of COPD [22], and AM can produce ROI [6]. A previous study by McLEOD *et al.* [23] could not detect significant differences in superoxide anion release by AM harvested from smokers with and without COPD. The results of the present study support this previous observation and, hence, also suggest a marginal role for AM in the pathogenesis of the oxidative stress that characterises COPD.

TGF- β_1 is a potent anti-inflammatory cytokine produced by several cell lineages, including AM [24–29]. It also has important anti-elastolytic properties because it reduces the production of MMP [30], and stimulates that of TIMP-1 and matrix proteins [31]. The current authors observed that AM from patients with COPD released significantly lower concentrations of TGF- β_1 in response to LPS than smokers with preserved lung function and never-smokers (fig. 1). To the present authors' knowledge, this has not been previously

reported. Previous studies have reported increased expression of TGF- β_1 in the airway epithelium of patients with chronic bronchitis or COPD [32, 33]. None, however, analysed its release by AM. Differences between the current study and those previously can be related to the different cell lineages analysed and techniques used. Studies in bronchial epithelium tissue used *in situ* hybridisation and/or immunohistochemistry to ascertain cell-associated proteins, which may give different results [32, 33], whereas, in the current study, ELISA was used to determine TGF- β_1 levels in the supernatant. Furthermore, it is also possible that the airway epithelium and AM behave differently in terms of TGF- β_1 release in COPD. The increased expression of TGF- β_1 in the epithelium may reflect the relevance of this cytokine in airway remodelling in COPD [34]. In contrast, the decreased release of TGF- β_1 from AM may reflect a deficient anti-inflammatory/repair capacity of these cells in patients with COPD. The different behaviour of airway epithelium and AM in patients with COPD has also been reported for other cytokines [35]. Interestingly, a polymorphism of the TGF- β_1 gene that is associated with low TGF- β_1 levels is common in patients with COPD [36]. This observation would be in keeping with the current findings of reduced TGF- β_1 release by AM in COPD patients.

Likewise, it was also observed that AM from patients with COPD release less TIMP-1 than those from smokers with normal lung function or nonsmokers (fig. 2). As TGF- β_1 stimulates TIMP-1 release [31], it is tempting to speculate that the lower TIMP-1 release seen in COPD may be mechanistically linked to the reduced TGF- β_1 release discussed previously. In any case, given that TIMP-1 is an important anti-elastolytic molecule [10], its reduced release in COPD may contribute to the development of pulmonary emphysema. However, the present results contrast with a previous study reporting no difference in TIMP-1 release by AM between COPD patients and smokers with normal lung function [10]. Several methodological aspects may contribute towards explaining this difference because, at variance with this former study [10], the current authors were very careful at controlling the acute effects of smoking known to cause oxidative stress and to decrease TIMP-1 activity [37]. An uneven distribution of active smokers in the individuals studied [10] may have blurred potential differences between groups. Likewise, at variance with previous studies [10, 11], bronchial infection was systematically excluded because it enhances lung inflammation [38].

Other methodological aspects of the current study also deserve comment. First, patients with COPD were not perfectly matched to smokers with normal lung function in terms of age and smoking history. However, the absence of any significant relationship between these two variables and any of the biological mediators studied here suggests that the relatively small differences (albeit statistically significant) of both age and smoking history did not exert any relevant confounding effects. Secondly, no significant differences were found in BAL cell counts between patients with COPD and smokers with normal lung function. This is in keeping with some previous studies [16], and in contrast to others [10], suggesting a high variability of the inflammatory cell counts in these subjects. Thirdly, previous studies isolated AM attending to their adherent properties [10, 11], whereas the present authors used flow-sorted AM. This strategy avoids the loss of

nonadherent AM [39], although it does not prevent the priming of the adherent ones, because, for the duration of the exposition period, the cells were cultured in plastic well plates and may have presumably also adhered to the plastic surface. Fourthly, previous reports incubated AM 24 h before stimulation [9, 10, 40]. As mentioned earlier, this can alter AM response [39]. Accordingly, the present authors decided to stimulate AM immediately after sorting and to quantify the concentration of the different inflammatory mediators both early (4 h) and late (24 h). Fifthly, the concentration of LPS used and the time points chosen were similar to those of previous studies [10, 41, 42]. However, different results in LTB₄ and/or ROI release may have been found if different LPS concentrations and/or different time points had been used [17, 41]. Sixthly, the current authors did not analyse other inflammatory markers that might be relevant in COPD, such as IL-8 and MMP-9. This was because previous studies have already done so [9, 43], and the present authors wanted to focus on other less well-characterised molecules. Finally, the current authors excluded a potential confounding effect of ICS because there were no significant differences in the levels of the mediators studied between patients with (n=4) and without ICS (n=9). This is in keeping with many studies suggesting a relative steroid resistance in COPD [44–46].

In conclusion, the present study shows that alveolar macrophages in chronic obstructive pulmonary disease release significantly less transforming growth factor- β_1 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 than smokers with preserved lung function and never-smokers. This observation suggests a lower anti-inflammatory and anti-proteolytic activity in these patients that may, eventually, contribute to the pathogenesis of the disease.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank the participating individuals for their collaboration, and F. Bauzà, M. Bosch, A. Noguera and M. López for their help during the study.

REFERENCES

- 1 Pauwels R, Buist AS, Calverley PMA, Jenkins CR, Hurd S, on behalf of the GOLD scientific committee. Global strategy for the diagnosis, management and prevention of chronic pulmonary disease. NHLBI/WHO Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD). Workshop summary. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163: 1256–1276.
- 2 Barnes PJ. Chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2000; 343: 269–280.
- 3 Hogg JC. Pathophysiology of airflow limitation in chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet* 2004; 364: 709–721.
- 4 Fletcher C, Peto R. The natural history of chronic airflow obstruction. *BMJ* 1977; 1: 1645–1648.
- 5 Agusti A, MacNee W, Donaldson K, Cosio M. Hypothesis: does COPD have an autoimmune component? *Thorax* 2003; 58: 832–834.
- 6 Lohmann-Matthes ML, Steinmuller C, Franke-Ullmann G. Pulmonary macrophages. *Eur Respir J* 1994; 7: 1678–1689.
- 7 Shapiro SD. The macrophage in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160: S29–S32.

- 8 Nathan C. Points of control in inflammation. *Nature* 2002; 420: 846–852.
- 9 Culpitt SV, Rogers DF, Shah P, *et al.* 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: 24–31.
- 10 Russell RE, Culpitt SV, DeMatos C, *et al.* 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.
- 11 Finlay GA, O'Driscoll LR, Russell KJ, *et al.* Matrix metalloproteinase expression and production by alveolar macrophages in emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156: 240–247.
- 12 American Thoracic Society Official Statement. Standardization of spirometry. 1994 Update. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152: 1107–1136.
- 13 Roca J, Sanchis J, Agustí-Vidal A, *et al.* Spirometric reference values for a Mediterranean population. *Bull Eur Physiopathol Respir* 1986; 22: 217–224.
- 14 Wimberley NW, Bass JB Jr, Boyd BW, Kirkpatrick MB, Serio RA, Pollock HM. Use of a bronchoscopic protected catheter brush for the diagnosis of pulmonary infections. *Chest* 1982; 81: 556–562.
- 15 Maus U, Rousseau S, Seeger W, Lohmeyer J. Separation of human alveolar macrophages by flow cytometry. *Am J Physiol* 1997; 272: L566–L571.
- 16 Linden M, Rasmussen JB, Pitulainen E, *et al.* Airway inflammation in smokers with nonobstructive and obstructive chronic bronchitis. *Am Rev Respir Dis* 1993; 148: 1226–1232.
- 17 Rankin JA, Sylvester I, Smith S, Yoshimura T, Leonard EJ. Macrophages cultured *in vitro* release leukotriene B4 and neutrophil attractant/activation protein (interleukin 8) sequentially in response to stimulation with lipopolysaccharide and zymosan. *J Clin Invest* 1990; 86: 1556–1564.
- 18 Montuschi P, Kharitonov SA, Ciabattini G, Barnes PJ. Exhaled leukotrienes and prostaglandins in COPD. *Thorax* 2003; 58: 585–588.
- 19 Seggev JS, Thornton WH Jr, Edes TE. Serum leukotriene B4 levels in patients with obstructive pulmonary disease. *Chest* 1991; 99: 289–291.
- 20 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.
- 21 Zhou S, Stark JM, Leikauf GD. Leukotriene B4 formation: human neutrophil–airway epithelial cell interactions. *J Appl Physiol* 1995; 78: 1396–1403.
- 22 MacNee W. Oxidants/antioxidants and COPD. *Chest* 2000; 117: Suppl. 1, 303S–317S.
- 23 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: 377–384.
- 24 Shull MM, Ormsby I, Kier AB, *et al.* Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature* 1992; 359: 693–699.
- 25 Kulkarni AB, Huh CG, Becker D, *et al.* Transforming growth factor beta 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 770–774.
- 26 Yaswen L, Kulkarni AB, Fredrickson T, *et al.* Autoimmune manifestations in the transforming growth factor-beta 1 knockout mouse. *Blood* 1996; 87: 1439–1445.
- 27 Letterio JJ, Roberts AB. Regulation of immune responses by TGF-beta. *Annu Rev Immunol* 1998; 16: 137–161.
- 28 Christ M, McCartney-Francis NL, Kulkarni AB, *et al.* Immune dysregulation in TGF-beta 1-deficient mice. *J Immunol* 1994; 153: 1936–1946.
- 29 Nakao A, Miike S, Hatano M, *et al.* Blockade of transforming growth factor beta/Smad signaling in T cells by overexpression of Smad7 enhances antigen-induced airway inflammation and airway reactivity. *J Exp Med* 2000; 192: 151–158.
- 30 Feinberg MW, Jain MK, Werner F, *et al.* Transforming growth factor-beta 1 inhibits cytokine-mediated induction of human metalloelastase in macrophages. *J Biol Chem* 2000; 275: 25766–25773.
- 31 Border WA, Noble NA. Transforming growth factor beta in tissue fibrosis. *N Engl J Med* 1994; 331: 1286–1292.
- 32 Vignola AM, Chanez P, Chiappara G, *et al.* Transforming growth factor-beta expression in mucosal biopsies in asthma and chronic bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156: 591–599.
- 33 De Boer WI, van Schadewijk A, Sont JK, *et al.* Transforming growth factor β_1 and recruitment of macrophages and mast cells in airways in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158: 1951–1957.
- 34 Jeffery PK. Remodeling in asthma and chronic obstructive lung disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164: S28–S38.
- 35 Fuke S, Betsuyaku T, Nasuhara Y, Morikawa T, Katoh H, Nishimura M. Chemokines in bronchiolar epithelium in the development of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004; 31: 405–412.
- 36 Wu L, Chau J, Young RP, *et al.* Transforming growth factor-beta1 genotype and susceptibility to chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 2004; 59: 126–129.
- 37 Frears ER, Zhang Z, Blake DR, O'Connell JP, Winyard PG. Inactivation of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 by peroxynitrite. *FEBS Lett* 1996; 381: 21–24.
- 38 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: 1015–1022.
- 39 Bauer GJ, Arbabi S, Garcia IA, deHingh I, Rosengart MR, Maier RV. Adherence regulates macrophage signal transduction and primes tumor necrosis factor production. *Shock* 2000; 14: 435–440.
- 40 Finlay GA, Russell KJ, McMahon KJ, *et al.* Elevated levels of matrix metalloproteinases in bronchoalveolar lavage fluid of emphysematous patients. *Thorax* 1997; 52: 502–506.
- 41 Suzuki K, Yamamoto T, Sato A, *et al.* Lipopolysaccharide primes human alveolar macrophages for enhanced release of superoxide anion and leukotriene B4: self-limitations of the priming response with protein synthesis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1993; 8: 500–508.

- 42** Gosset P, Wallaert B, Tonnel AB, Fourneau C. Thiol regulation of the production of TNF- α , IL-6 and IL-8 by human alveolar macrophages. *Eur Respir J* 1999; 14: 98–105.
- 43** 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.
- 44** 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.
- 45** Hattotuwa KL, Gizycki MJ, Ansari TW, Jeffery PK, Barnes NC. The effects of inhaled fluticasone on airway inflammation in chronic obstructive pulmonary disease: a double-blind, placebo-controlled biopsy study. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165: 1592–1596.
- 46** Barnes PJ, Ito K, Adcock IM. Corticosteroid resistance in chronic obstructive pulmonary disease: inactivation of histone deacetylase. *Lancet* 2004; 363: 731–733.

Systemic inflammation after inspiratory loading in chronic obstructive pulmonary disease

Antonia Fuster
Jaume Sauleda
Ernest Sala
Bernardí Barceló¹
Jaume Pons²
Miguel Carrera
Aina Noguera¹
Bernat Togores
Alvar GN Agustí

¹Serveis de Pneumologia, Anàlisi
Clínics, and ²Inmunologia, Hospital
Universitari Son Dureta, Fundació
Caubet-Cimera and CIBER
Enfermedades Respiratorias, Mallorca,
Spain

Objective: Patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) present systemic inflammation. Strenuous resistive breathing induces systemic inflammation in healthy subjects. We hypothesized that the increased respiratory load that characterizes COPD can contribute to systemic inflammation in these patients.

Patients and methods: To test this hypothesis, we compared leukocyte numbers and levels of circulating cytokines (tumor necrosis factor alpha [TNF α], interleukin-1 β [IL-1 β], IL-6, IL-8, and IL-10), before and 1 hour after maximal incremental inspiratory loading in 13 patients with stable COPD (forced expiratory volume in one second [FEV₁] 29 \pm 2.5% ref) and in 8 healthy sedentary subjects (FEV₁ 98 \pm 5% ref).

Results: We found that: (1) at baseline, patients with COPD showed higher leukocyte counts and IL-8 levels than controls ($p < 0.01$); and, (2) one hour after maximal inspiratory loading these values were unchanged, except for IL-10, which increased in controls ($p < 0.05$) but not in patients with COPD.

Conclusions: This study confirms the presence of systemic inflammation in COPD, shows that maximal inspiratory loading does not increase the levels of pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-8) in COPD patients or controls, but suggests that the former may be unable to mount an appropriate systemic anti-inflammatory response to exercise.

Keywords: COPD, endurance, exercise, IL-10, respiratory muscles, systemic inflammation

Introduction

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is characterized by pulmonary (Pauwels et al 2001) and systemic inflammation (Agusti et al 2001). In healthy subjects, whole body exercise results in increased circulating leukocyte counts (Bury et al 1996), higher plasma concentration of pro-inflammatory cytokines (interleukin-6 [IL-6], interleukin-1 β [IL-1 β], tumor necrosis factor alpha [TNF- α]) (Smith et al 2000), oxidative stress (Sen 1995), an increased levels of acute phase reactants (C-reactive protein [CRP]) and creatin phosphokinase (Pizza et al 1995). This occurs also after strenuous resistive breathing (Vassilakopoulos et al 1999, 2004).

Airway resistance and the work of breathing are typically increased in patients with severe COPD, especially during acute exacerbations of the disease (AECOPD) (Barbera et al 1997; Ramirez-Sarmiento et al 2002). Systemic inflammation is known to increase during AECOPD (Malo et al 2002). We hypothesized that the increased respiratory load that characterizes COPD, particularly during AECOPD, can contribute to systemic inflammation in these patients. To test this hypothesis, we designed a prospective and interventional study comparing circulating leukocyte counts and plasma concentration of IL-1 β , IL-6, TNF α , IL-8, and IL-10 in patients with severe COPD and healthy controls, before and after a maximal incremental inspiratory loading test (Martyn et al 1987).

Correspondence: Jaume Sauleda
Servei Pneumologia. Hospital Univ. Son
Dureta. Andrea Doria 55, 07014 Palma
Mallorca, Spain
Tel +34 971 175433
Fax +34 971 175228
Email jsauleda@hdsd.es

Methods

Subjects and ethics

We studied 13 males with very severe COPD (GOLD IV) (Pauwels et al 2001) and 8 healthy male volunteers. Patients with COPD were consecutively recruited from the outpatient clinic of our department. None of them had required hospital admission or treatment change during the preceding 3 months nor had any other concomitant chronic inflammatory disease. All patients received long-acting β_2 agonists, inhaled anticholinergics, and inhaled steroids. None of them was receiving oral steroids. We also studied 8 healthy sedentary volunteers who served as controls. All participants gave their written consent after being fully informed of the purpose, characteristics, and nature of the study, which had been approved by the Ethics Review Board of our institution.

Design of the study

Patients were studied in two different days. The first one, forced spirometry, arterial blood gases and maximal inspiratory and expiratory pressures were determined. Then three to seven days later, subjects performed a maximal inspiratory loading test (MILT). This was always done at the same time of the day (4 pm), at least four hours after the last meal. Briefly, a venous line was inserted into an antecubital vein and a baseline venous blood sample was obtained in EDTA containing tubes. MILT was then performed until exhaustion (see below) and, 1 hour later, a second venous blood sample was obtained. Plasma was separated from whole blood immediately after blood sampling by centrifugation at 2000 rpm for 10 min, and stored frozen at -80°C .

Lung function tests

A forced spirometry (GS, Warren E Collins, Braintree, MA, US) was obtained in all participants according to international guidelines (American Thoracic Society 1995). Spirometric reference values were those of a Mediterranean population (Roca et al 1986). In patients with COPD, an arterial blood sample was obtained by radial artery puncture under local anaesthesia. This was immediately assayed for PaO_2 , PaCO_2 , and pH (IL BG3, Izasa, Spain). This was not obtained in healthy subjects who all had normal arterial oxyhemoglobin saturation by pulse oxymetry (504-US, Criticare systems, Waukesha, WI). Maximum inspiratory pressure (MIP) was measured according to the standard technique (Morales et al 1997) using a differential pressure transducer (Sibelemed, Barcelona, Spain) whose output was digitized and stored into

a computer, while the patient was in the sitting position. MIP reference values were from caucasian population (Morales et al 1997).

Maximal incremental inspiratory load test (MILT)

We followed the methodology described by Martyn and colleagues (1987). In brief, subjects were asked to breath (following a metronome) through a weighted inspiratory plunger (with an orifice whose diameter was 2.1 cm) connected to a bidirectional valve, while wearing a nose clip. Initially, there was no weight load, but this was increased every two minutes with 25 g for COPD patients (or 50 g for healthy subjects) until subjects could no longer inspire (three unsuccessful attempts to open the inspiratory valve). The expiratory circuit was connected to an O_2 and CO_2 analyzer (GS, Warren E Collins, Braintree, MA, USA) that allowed breath-by-breath measurements of volume, flow, oxygen consumption (VO_2), and carbon dioxide production (VCO_2).

Inflammatory markers

Total and differential leukocyte counts were determined automatically in whole blood (Sysmex K-4500, Toa Medical Electronics Co Ltd, Kobe, Japan). In plasma, the concentration of IL-1 β , IL-6, TNF α , IL-10, and IL-8 was determined using a cytokine bead array system (BD Biosciences San Diego, CA, USA). This assay system consists of a mixture of six types of beads of uniform size that contain different fluorescence intensities of a red-emitting dye. A different capture antibody (Ab) against each cytokine is covalently coupled to each type of bead. Cytokines bound to these Abs are detected by use of Abs labeled with phycoerythrin. The fluorescence intensity measured with phycoerythrin is proportional to the cytokine concentration in the sample and is quantified from a calibration curve. The detection limits of these assays were 7.2 pg/mL for IL-1 β , 2.5 pg/mL for IL-6, 3.7 pg/mL for TNF- α , 3.6 pg/mL for IL-8, and 3.3 pg/mL for IL-10. All assays were performed in duplicated. Intra-assay variation was $<10\%$.

Statistical analysis

Results are shown as mean \pm SEM. The Mann-Whitney test was used to compare results between the two groups of subjects whereas the Wilcoxon test was used to compare data before and after MILT. A *p* value lower than 0.05 was considered significant.

Results

Table 1 shows the main clinical and functional data of subjects studied. Patients with COPD were older than controls and had severe airflow obstruction, mild hypoxemia without hypercapnia and a moderate reduction of MIP (Table 1). By definition, lung function was normal in healthy volunteers.

Table 2 presents the results of MILT. Healthy subjects achieved a higher peak load but the rest of variables were similar in both groups. Of note, VO_2 increased significantly with MILT in both groups, indicating significant respiratory muscle activity.

Figure 1 presents the values of different inflammatory markers determined in both groups, before and 1 hour after MILT. At baseline, leukocyte counts (panel A) were higher in patients with COPD ($8.3 \pm 0.4 \times 10^3/\text{mL}$) than controls ($6.2 \pm 0.5 \times 10^3/\text{mL}$, $p < 0.01$); these values were unchanged after MILT, so differences persisted ($8.5 \pm 0.3 \times 10^3/\text{mL}$ and $6.5 \pm 0.5 \times 10^3/\text{mL}$ respectively, $p < 0.01$). IL-8 levels at baseline (panel B), were higher in patients with COPD ($15.6 \pm 3 \text{ pg/mL}$ vs $5.9 \pm 0.8 \text{ pg/mL}$, $p < 0.01$). MILT did not change these values significantly so differences remained after it ($13.4 \pm 1.8 \text{ pg/mL}$ vs $5.5 \pm 0.4 \text{ pg/mL}$ respectively, $p < 0.01$). The concentration of IL-1 β (panel C) was not different between groups at baseline ($38 \pm 19 \text{ pg/mL}$ vs $25 \pm 8 \text{ pg/mL}$) nor did it change with MILT ($46 \pm 26 \text{ pg/mL}$ vs $20 \pm 2 \text{ pg/mL}$) (panel C). IL-6 and TNF- α levels were undetectable in almost all subjects. Interestingly, we observed that IL-10 values were similar at baseline but increased after exercise only in healthy subjects ($5.9 \pm 0.8 \text{ pg/mL}$) but not in patients with COPD ($3.6 \pm 0.5 \text{ pg/mL}$, $p < 0.05$) (panel D).

Discussion

This study: (1) confirms the presence of systemic inflammation in patients with severe COPD, as shown by their higher leukocyte counts and increased IL-8 plasma levels; (2) does not support the hypothesis that a high inspiratory load may contribute to systemic inflammation in COPD; and, (3) shows that, at variance with healthy subjects, patients with COPD were unable to mount an appropriate anti-inflammatory response after MILT (as indicated by their low plasma levels of IL-10 after MILT).

It is now well established that systemic inflammation occurs in patients with COPD (Agusti et al 2001). In this study we hypothesized that the increased respiratory load that characterizes COPD may contribute to it. This hypothesis was based upon the following, previously established, observations. First, increased airway resistance is a key physiological abnormality in COPD (Hogg 2004). Second, leukocytosis,

Table 1 Clinical and lung function data

	COPD patients	Healthy subjects
Age (yrs)	63 \pm 2**	46 \pm 1
BMI (Kg/m ²)	24.7 \pm 1.1	26.5 \pm 0.6
Smoking history (pack-yr)	62 \pm 6**	2.5 \pm 2
FEV ₁ (%reference)	29 \pm 2.5**	98 \pm 5
FEV ₁ /FVC (%)	37 \pm 2**	73 \pm 2
PaO ₂ (mmHg)	70 \pm 3.3	NA
PaCO ₂ (mmHg)	42 \pm 2.3	NA
SaO ₂ %	95 \pm 3*	97 \pm 0.4
MIP (% reference)	68 \pm 6**	96 \pm 8

Abbreviations: BMI, body mass index; FEV₁, forced expiratory volume in 1 second; FVC, forced vital capacity; PaO₂, arterial partial pressure of oxygen; PaCO₂, arterial partial pressure of carbon dioxide; MIP, maximal inspiratory pressure; NA, not available.

** $p < 0.01$.

increased circulating levels of pro-inflammatory cytokines (IL-6, IL-8, IL-1 β , TNF α) and oxidative stress have been reported in response to intense whole body exercise in athletes and healthy subjects (Rohde et al 1997; Smith et al 2000) and have been shown to persist several hours after exercise (Ostrowski et al 1999). Third, albeit smaller in absolute values, a similar systemic inflammatory response has been described in healthy subjects after strenuous resistive breathing (at 75% of their MIP) (Anzueto et al 1994; Bury et al 1996; Vassilakopoulos et al 1999). Finally, increased TNF α levels have been reported in COPD patients after moderate-intensity constant-work-rate exercise (Rabinovich et al 2003). To our knowledge, however, no previous study has investigated the effects of progressive inspiratory loading of the respiratory muscles upon systemic inflammation in patients with COPD.

At variance with our working hypothesis, we were not able to show that that MILT exerts a significant pro-inflammatory effect in patients with COPD. Several reasons can explain this observation. First, the peak inspiratory load achieved by our

Table 2 Maximal inspiratory loading test (MILT) results

	COPD patients	Healthy subjects
Pmouth peak/MIP(%)	32.5 \pm 6.5	29.9 \pm 4.2
Peak load (gr)	125.0 \pm 22.4**	287.5 \pm 29.5
Duration (seconds)	626 \pm 148	654 \pm 69
VO _{2 basal} [†] L \times min ⁻¹	0.25 \pm 0.02	0.28 \pm 0.01
VO _{2 max} [†] L \times min ⁻¹	0.34 \pm 0.04 [†]	0.41 \pm 0.04 [†]
VCO _{2 basal} [†] L \times min ⁻¹	0.22 \pm 0.01	0.23 \pm 0.01
VCO _{2 max} [†] L \times min ⁻¹	0.25 \pm 0.03 ^{††}	0.34 \pm 0.04 [†]

Abbreviations: Pmouth peak, peak mouth pressure, expressed as percentage of Maximal inspiratory pressure (MIP); VO_{2 basal}, basal oxygen consumption; VO_{2 max}, maximal oxygen consumption; VCO_{2 basal}, basal CO₂ consumption; VCO_{2 max}, maximal CO₂ consumption.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ versus healthy subjects; [†] $p < 0.05$ versus basal in the same group.

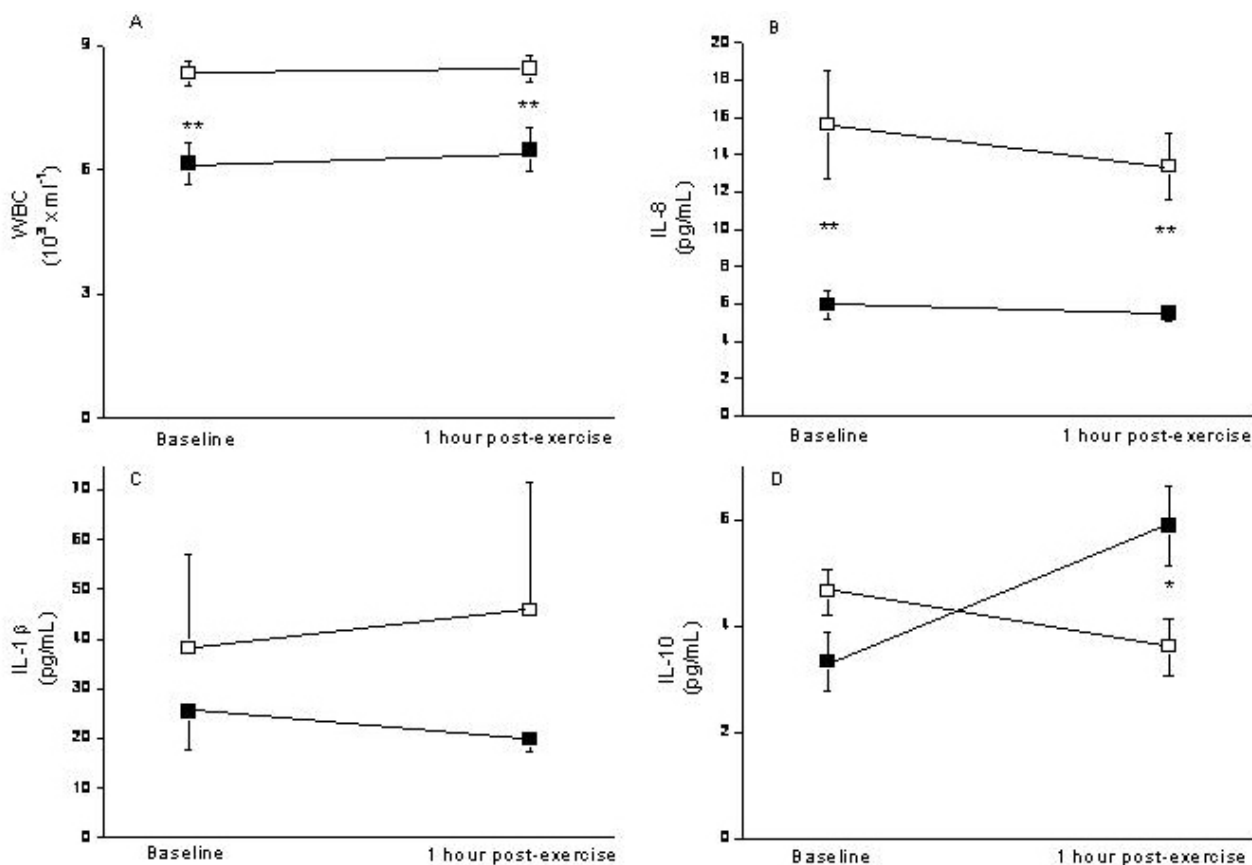


Figure 1 Systemic inflammatory markers determined in patients with COPD (open squares) and healthy controls (closed squares), before and after maximal incremental inspiratory loading.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ versus controls.

patients averaged only about 30% of their MIP whereas those previous studies in healthy subjects reporting increased systemic inflammation after inspiratory loading achieved a peak inspiratory load of about 75% of their MIP (Vassilakopoulos et al 1999, 2002). It is possible, therefore, that a higher inspiratory load may have resulted indeed in systemic inflammation in our patients, as hypothesized. Yet, the severity of their airflow obstruction precluded them to achieve and sustain these high loads. Actually, Koechlin and colleagues (2004) also failed to induce systemic inflammation in patients with COPD after localized quadriceps exercise at 40% of its maximal strength. Second, blood samples were obtained 1 hour after MILT. It is therefore possible that earlier sampling may have picked up higher systemic cytokine concentrations. However, previous studies investigating whole body exercise found positive results within the time framework used in our study (Suzuki et al 1999). Finally, it is known that inhaled steroids can reduce systemic inflammation in COPD (Sin et al 2004). Given that all the patients studied here received them, we can not exclude that a different result may have been obtained should patients not under inhaled steroid therapy had been studied.

In contrast, we found that the anti-inflammatory cytokine IL-10 showed a different response to MILT in healthy subjects and in patients with COPD (Figure 1, panel D). IL-10 is a primary anti-inflammatory cytokine that acts by inhibiting pro-inflammatory cytokine production by activated monocytes and macrophages (Fiorentino et al 1991). Previous studies in healthy subjects have shown that plasma IL-10 increases significantly immediately after strenuous exercise (Suzuki et al 2000), fitting well with the period of resolution of the acute inflammatory response elicited by exercise (Ostrowski et al 1999; Smith et al 2000; Vassilakopoulos et al 2002). Also, these studies demonstrate that exercise induces a cascade of cytokine and the anti-inflammatory cytokine suggesting that there is a balance between pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines during and/or after exercise. In keeping with these observations, we found that IL-10 increased significantly after MILT in healthy subjects (Figure 1, panel D). In contrast, patients with COPD failed to do so. This may reflect a certain inability to restrict the magnitude and/or duration of the inflammatory response that may occur after exercise.

It is interesting to note here that IL-10 has also been found reduced in the sputum of these patients (Takanashi et al 1999), which may contribute also to the maintenance of airway inflammation.

Two potential limitations of our study deserve comment. First, because this was a pilot physiological study, we did not formally calculate sample size. Instead, we evaluated a relatively small number of subjects, similarly to what other studies of this nature have done before (Takanashi et al 1999; Rabinovich et al 2003; Koechlin et al 2004). Second, controls were younger than patients. Some studies have suggested that ageing is associated with systemic inflammation (De Martinis et al 2006). Therefore, we can not exclude an independent effect of ageing.

In summary, the present study suggests that patients with severe COPD have systemic inflammation and shows that MILT in these patients fails to elicit a significant systemic inflammatory response. Yet, the capacity of these patients to mount an adequate anti-inflammatory response seems jeopardized. Whether this occurs also during other forms of respiratory loading (exercise during activities of daily living, acute exacerbation of COPD) requires further study.

Disclosure

Supported, in part, by ABEMAR. There is no conflict of interest.

Acknowledgments

The authors thank the participating individuals for their collaboration in the study, and M. Bosch RN, A. Noguera RN, M. López RN, M.J. Hernández RN and M.V. Ramis RN for their help during the study.

References

- Agusti AG, Noguera A, Sauleda J, et al. 2003. Systemic effects of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J*, 21:347–60.
- American Thoracic Society. 1995. Official Statement. Standardization of Spirometry. 1994 Update. 1995. *Am J Respir Crit Care Med*, 152:1107–36.
- Anzueto A, Supinski GS, Levine SM, et al. 1994. Mechanisms of disease: Are oxygen-derived free radicals involved in diaphragmatic dysfunction. *Am J Respir Crit Care Med*, 149:1048–52.
- Barbera JA, Roca J, Ferrer A, et al. 1997. Mechanisms of worsening gas exchange during acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J*, 10:1285–91.
- Bury TB, Louis R, Radermecker MF, et al. 1996. Blood mononuclear cells mobilization and cytokines secretion during prolonged exercises. *Int J Sports Med*, 17:156–60.
- De Martinis M, Franceschi C, Monti D, et al. 2006. Inflammation markers predicting frailty and mortality in the elderly. *Exp Mol Pathol*, 80:219–27.
- Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR, et al. 1991. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J Immunol*, 147:3815–22.
- Hogg JC. 2004. Pathophysiology of airflow limitation in chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet*, 364:709–21.
- Koechlin C, Couillard A, Cristol JP, et al. 2004. Does systemic inflammation trigger local exercise-induced oxidative stress in COPD? *Eur Respir J*, 23:538–44.
- Malo O, Sauleda J, Busquets X, et al. 2002. Inflamación sistémica durante las agudizaciones de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica. *Arch Bronconeumol*, 38:172–6.
- Martyn JB, Moreno RH, Paré PD, et al. 1987. Measurement of inspiratory muscle performance with incremental threshold loading. *Am Rev Respir Dis*, 135:919–23.
- Morales P, Sanchis J, Cordero PJ, et al. 1997. Maximum static respiratory pressures in adults. The reference values for a Mediterranean Caucasian population. *Arch Bronconeumol*, 33:213–19.
- Ostrowski K, Rohde T, Asp S, et al. 1999. Pro- and anti-inflammatory cytokine balance in strenuous exercise in humans. *J Physiol*, 515:287–91.
- Pauwels RA, Buist AS, Calverley PM, et al. 2001. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. NHLBI/WHO Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) Workshop summary. *Am J Respir Crit Care Med*, 163:1256–76.
- Pizza FX, Mitchell JB, Davis BH, et al. 1995. Exercise-induced muscle damage: effect on circulating leukocyte and lymphocyte subsets. *Med Sci Sports Exerc*, 27:363–70.
- Rabinovich RA, Figueras M, Arditte E, et al. 2003. Increased tumour necrosis factor- α plasma levels during moderate-intensity exercise in COPD patients. *Eur Respir J*, 21:789–94.
- Ramirez-Sarmiento A, Orozco-Levi M, Guell R, et al. 2002. Inspiratory muscle training in patients with chronic obstructive pulmonary disease: structural adaptation and physiologic outcomes. *Am J Respir Crit Care Med*, 166:1491–97.
- Roca J, Sanchis J, Agustí-Vidal A, et al. 1986. Spirometric reference values for a mediterranean population. *Bull Eur Physiopathol Respir*, 22: 217–24.
- Rohde T, MacLean DA, Richter EA, et al. 1997. Prolonged submaximal eccentric exercise is associated with increased levels of plasma IL-6. *Am J Physiol*, 273:E85–E91.
- Sen CK. 1995. Oxidants and antioxidants in exercise. *J Appl Physiol*, 79: 675–86.
- Sin DD, Lacy P, York E, et al. 2004. Effects of fluticasone on systemic markers of inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*, 170:760–65.
- Smith LL, Anwar A, Fragen M, et al. 2000. Cytokines and cell adhesion molecules associated with high-intensity eccentric exercise. *Eur J Appl Physiol*, 82:61–7.
- Suzuki K, Totsuka M, Nakaji S, et al. 1999. Endurance exercise causes interaction among stress hormones, cytokines, neutrophil dynamics, and muscle damage. *J Appl Physiol*, 87:1360–7.
- Suzuki K, Yamada M, Kurakake S, et al. 2000. Circulating cytokines and hormones with immunosuppressive but neutrophil-priming potentials rise after endurance exercise in humans. *Eur J Appl Physiol*, 81:281–7.
- Takanashi S, Hasegawa Y, Kanehira Y et al. 1999. Interleukin-10 level in sputum is reduced in bronchial asthma, COPD and in smokers. *Eur Respir J*, 14:309–14.
- Vassilakopoulos T, Zakyntinos S, Roussos C. 1999. Strenuous resistive breathing induces proinflammatory cytokines and stimulates the HPA axis in humans. *Am J Physiol*, 277: R1013–19.
- Vassilakopoulos T, Katsaounou P, Karatza MH, et al. 2002. Strenuous resistive breathing induces plasma cytokines: role of antioxidants and monocytes. *Am J Respir Crit Care Med*, 166:1572–8.
- Vassilakopoulos T, Roussos C, Zakyntinos S. 2004. The immune response to resistive breathing. *Eur Respir J*, 24:1033–43.

