

Maria Alcide Tavares Marques

# REPERCUSSÕES SISTÉMICAS DA DPOC

Tese de Doutoramento para obtenção do grau de Doutor em Ciências da Saúde, ramo Medicina, especialidade de Medicina Interna (Pneumologia), sob a orientação do Professor Doutor Carlos Robalo Cordeiro e Professor Doutor Manuel Santos Rosa, apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.

Junho de 2014



UNIVERSIDADE DE COIMBRA



MARIA ALCIDE TAVARES MARQUES

REPERCUSSÕES SISTÉMICAS DA  
DPOC



COIMBRA  
2014



TESE DE DOUTORAMENTO  
APRESENTADA À FACULDADE DE MEDICINA  
DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA



Tese de Doutoramento apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra para obtenção do grau de Doutor em Ciências da Saúde, ramo Medicina, especialidade de Medicina Interna (Pneumologia), sob a orientação do Professor Doutor Carlos Robalo Cordeiro e Professor Doutor Manuel Santos Rosa.

A Faculdade de Medicina não aceita qualquer responsabilidade em relação à doutrina e à forma desta dissertação.  
(Regimento da Faculdade de Medicina de Coimbra, 1931, Artigo 108, parágrafo único)

À MINHA FAMÍLIA



AOS MEUS MESTRES



AOS MEUS AMIGOS



## *PREFÁCIO*

*Quando há alguns anos nos apercebemos da nova visão com que passou a ser encarada a DPOC, fruto de uma intensa e profunda investigação efectuada nestes domínios, fomos surpreendidos por algumas desordens de natureza hematológica no âmbito mais genérico das perturbações sistémicas desta afecção, o que motivaria uma investigação das alterações então observadas.*

*Ora este achado, o qual viria a ser reforçado pelos sucessivos resultados obtidos ao longo do tempo, pareceu-nos justificar a escolha deste tema para a elaboração de uma Dissertação de Doutoramento.*

*Para além destes motivos, a opção então assumida proporcionaria a continuação, pelo nosso próprio intermédio, da investigação sobre um tema relativamente ao qual a Escola Pneumológica de Coimbra se tem especialmente dedicado e lhe conferiu, nesta matéria, importantes e reconhecidas tradições.*

*Uma vez iniciado o esquema de trabalho que nos propusemos levar a efeito decorreram alguns anos de intensa actividade, pontualmente entrecortada por inadiáveis solicitações hospitalares ou da Faculdade de Medicina e, não raramente, pela carência de situações clínicas enquadráveis no plano de estudos.*

*Foi uma época particularmente fatigante em que se tornou necessário conjugar a colaboração de diferentes serviços e laboratórios, marcada por muitas alegrias e alguns contratemplos, durante a qual abdicámos de um tipo de vida porventura mais agradável e aliciante com óbvios e sucessivos sacrifícios de natureza pessoal e familiar, que somente aqueles que alguma vez trilharam este percurso podem avaliar na sua real dimensão. Conforta-nos o facto de termos produzido um trabalho que, embora modesto, foi totalmente concebido e realizado dentro das paredes da nossa Escola.*

*Decerto que uma tarefa desta dimensão exige auxílios de índole variada, que suscitam naturalmente os agradecimentos devidos a quem pronta e espontaneamente nos prestou tão desinteressada colaboração.*

*No entanto, gostaríamos de invocar nestas palavras introdutórias os apoios cuja importância influenciaram decisivamente o delineamento e prossecução da investigação agora apresentada. E permita-se-nos que, neste agradecimento, as primeiras e mais calorosas sejam dirigidas aos Srs. Profs. Carlos Robalo Cordeiro e Manuel Santos Rosa, respectivamente orientador e co-orientador desta Dissertação. De facto, só uma amizade cimentada ao longo dos anos e o raro sentido que S. Ex.<sup>as</sup> exemplarmente mostram pela investigação científica, poderão justificar a sua permanente disponibilidade, consubstanciada na partilha de tantas horas para além dos seus sobrecarregados horários profissionais, e a solidária satisfação perante os resultados que a execução deste trabalho nos ia proporcionando.*

*Igualmente, à Sr<sup>a</sup> Prof. Filomena Botelho e às Dr<sup>as</sup> Bárbara Oliveiros e Vera Alves, eminentes e prestigiadas cientistas, a nossa infinita gratidão pelo precioso e decisivo contributo a esta obra nos domínios da interpretação estatística dos resultados e das técnicas imunológicas, respectivamente.*

*O nosso eterno reconhecimento pelo apoio técnico-científico, como pela generosa amizade de que se revestiram as suas colaborações.*

*Aos nossos colegas do Serviço de Pneumologia dos HUC, assim como aos seus enfermeiros, técnicos e restante pessoal exprimimos a nossa mais viva gratidão pela*

*boa vontade e dedicação manifestadas em tudo quanto se relacionou com o estudo dos doentes que integram esta obra.*

*A todos aqui deixamos o testemunho do nosso mais profundo e perene reconhecimento.*



## SUMÁRIO

### PRIMEIRA PARTE

#### NOVAS PERSPECTIVAS SOBRE A FISIOPATOLOGIA E A PATOGENIA NO ENQUADRAMENTO SISTÉMICO DA DPOC

Introdução

Actualização Epidemiológica

Factores de Risco da DPOC

Contribuição do Envelhecimento para as Manifestações Sistémicas da DPOC

O tabaco no contexto da DPOC

A DPOC e o *Stress* Oxidativo

Alterações Estruturais e Inflamatórias das Vias Aéreas e do Parênquima

Pulmonar

### SEGUNDA PARTE

#### TRABALHO PESSOAL

Objectivos

Abordagem Geral da Casuística

Material

Métodos

Resultados

## TERCEIRA PARTE

### INTERPRETAÇÃO GLOBAL E DISCUSSÃO GERAL DOS RESULTADOS

Discussão

Interpretação Patogénica

## QUARTA PARTE

### CONCLUSÕES FINAIS E RESUMO

Conclusões finais

Resumo / Abstract

Bibliografia consultada

## I PARTE

### **NOVAS PERSPECTIVAS SOBRE A FISIOPATOLOGIA E A PATOGENIA NO ENQUADRAMENTO SISTÉMICO DA DPOC**

*“A melhor forma de ordenar as ideias  
é passá-las a escrito”*

Umberto Eco, 2012



## CAPÍTULO I

### INTRODUÇÃO

A doença pulmonar obstrutiva crónica (DPOC) constitui um arquétipo da teoria mecanicista que impregnou cultural e cientificamente parte do século passado: centrada no carácter crónico e progressivo da obstrução das vias aéreas que conduzia inexoravelmente a uma degradação física e a uma morte lenta, e ainda na natureza individual enquanto doença autoinfligida clinicamente espalhada entre os extremos do espectro ancestral do *blue bloater* e do *pink puffer* e emoldurada pelo estereótipo de *doença de velhos fumadores*.

Foram provavelmente algumas destas circunstâncias que limitaram durante décadas o interesse da comunidade científica. De facto, é sobretudo a partir da década de noventa que se tem vindo a assistir à redescoberta desta afecção, não só na sua multiplicidade de aspectos - epidemiológicos, clínicos, patogénicos e terapêuticos - mas igualmente na concepção global que, sem perder de vista o impacto notável com que atinge o aparelho respiratório, a enquadra mais extensivamente através das suas manifestações e/ou complicações sistémicas. Esta nova fase na abordagem da DPOC contém de

*per se* um conjunto de desafios clínicos, na medida em que na sua heterogeneidade e carácter multisistémico a individualização fenotípica do doente se constitui como um imperativo que ultrapassa largamente a estreita caracterização funcional, e na qual se baseiam as premissas para novas pesquisas e desenvolvimentos no âmbito clínico da doença que culminariam na tão ambicionada medicina personalizada.

Por outro lado, esta individualização permitiria a classificação dos doentes em subgrupos uniformes com características diferentes, o que facilitaria a compreensão dos mecanismos patogénicos, das manifestações clínicas, do prognóstico e da resposta à terapêutica. Para este fim concorreriam os avanços tecnológicos e científicos nas áreas da medicina e da biologia, isto é, a aplicação de várias e novas metodologias: fisiológica, imagiológica e genética, entre outras.

A actual perspectiva da DPOC resultou de múltiplos trabalhos desenvolvidos ao longo da última década por vários autores e que viria a consubstanciar-se na última revisão proposta pela *Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease* (GOLD), na *Global Strategy for Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease* (GOLD) de 2013, a qual definiu a DPOC como uma doença frequente e susceptível de prevenção, caracterizada pela obstrução persistente e progressiva do fluxo aéreo devida à resposta inflamatória crónica das vias aéreas e do pulmão à acção de gases ou partículas tóxicas, em que as agudizações e as comorbilidades contribuem para a sua gravidade geral em cada doente [1].

É este novo olhar sobre a doença que tem motivado a comunidade científica na investigação e pesquisa exaustiva de novos elementos, assim como na aplicação conjunta de recentes e *velhos* conhecimentos, numa tentativa que esperamos bem sucedida de completar o *puzzle*, ao reconhecer e condensar, como no mito de *Janus*, deus das transformações Fig.1, o passado e o futuro desta afecção.



Fig.1

[http://www.zazzle.com/bust\\_of\\_janus\\_vatican\\_museums\\_greeting\\_cards-137804384489207083](http://www.zazzle.com/bust_of_janus_vatican_museums_greeting_cards-137804384489207083) em 26/01/2013



## CAPÍTULO II

### **ACTUALIZAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA**

A DPOC constitui um problema mundial de saúde pública, responsável não só pelas elevadas taxas de morbidade e mortalidade como pelo seu enorme impacto socio-económico.

Segundo as estimativas da prevalência global, em 2020 esta afecção ocupará o terceiro lugar entre as causas de mortalidade e o quinto como causa de mortalidade precoce e/ou de incapacidade [2]. Presentemente, a doença é anualmente responsável por cerca de 2,75 milhões de mortes, constituindo a quarta principal causa de mortalidade [3]. Em termos de prevalência, aceita-se que ronde os 210 milhões de indivíduos em todo o mundo [4,5].

De acordo com as previsões de Mathers [6], em 2030 esta afecção representará 7,8% de todas as mortes e cerca de 27% dos óbitos relacionados com o consumo tabágico; este valor só será ultrapassado pelos 29% das doenças cardiovasculares e pelos 33% do cancro. Ainda segundo este autor, a prevalência da DPOC na população em geral é de cerca de 1% em todas as idades, elevando-se para 8 a 10% na quarta década de vida ou acima desta.

Neste contexto, uma meta-análise dos estudos efectuados na população em geral [7], publicados entre 1990 e 2004, demonstrou que, apesar da existência de diferenças geográficas e de discrepâncias metodológicas, a prevalência da DPOC seria de 7,6% independentemente dos critérios de diagnóstico utilizados, atingindo valores de 6,4% para a bronquite crónica (em 38 estudos) e de 1,8% para o enfisema (através da radiologia torácica, em 8 estudos). A maioria dos trabalhos que integraram esta meta-análise centraram-se maioritariamente na faixa etária situada entre os 40 e os 64 anos, tendo-se constatado que a prevalência da doença aumentava ao longo da idade, com um risco que era cinco vezes maior nos indivíduos de 65 ou mais anos, comparativamente aos de menos de 40 anos [8].

Reconhece-se ainda que a prevalência é cinco vezes maior na presença de hábitos tabágicos [7] tendo-se no entanto demonstrado que nos não fumadores ela rondaria os 4%, expressando, eventualmente, quer o contributo genético, quer o de outros factores de risco.

Nos Estados Unidos, a prevalência da DPOC ronda os 13,5%, correspondendo na maioria a formas ligeiras e moderadas, segundo o *Third National Health and Nutrition Survey* (NHANES III) [9]. Na Europa têm-se apontado percentagens que variam entre os 2 e os 10% [10].

De facto, os estudos relativos à prevalência da DPOC evidenciam uma grande variabilidade resultante, quer dos critérios de diagnóstico utilizados, quer das populações estudadas, ou ainda das metodologias aplicadas. Essa variabilidade é salientada em vários trabalhos: no de Viegi [11], que estudou uma população de adultos entre os 25 e 73 anos de idade no norte da Itália, obtendo prevalências de 11% pelos critérios GOLD da obstrução das vias aéreas e de 18,3% com base na clínica (que corresponderia ao estágio I do GOLD); a do projecto latino-americano *Investigation en Obstrucion Pulmonar* (PLATINO) [12], efectuado em populações adultas urbanas, com valores de 11,9% na cidade do México e de 19,4% em Montevideu; ou ainda do estudo de Murtagh [13], realizado na Irlanda do Norte, o *Northern Ireland Cost and Epidemiology of Chronic Obstructive Pulmonary Disease* (NICECOPD), sobre

uma população na faixa etária situada entre os 40 e 69 anos, na qual os valores da prevalência estimada foram da ordem dos 14,4%. Já um estudo efectuado em Salzburgo, no contexto do projecto *Burden of Obstructive Lung Diseases* (BOLD) [14], revelou que a prevalência global da doença no estágio I ou mais elevado era de 26,1%, independentemente do sexo, e de 10,7% no estágio II ou superior.

Neste âmbito, as estimativas da prevalência ao nível mundial são ainda dificultadas pela quase ausência de dados relativos a muitos países asiáticos e a grande parte do continente africano. Por outro lado, às variações demográficas, como o envelhecimento da população, associam-se ainda os vários estados epidemiológicos no que diz respeito ao consumo tabágico, bem como a influência pontualmente preponderante de outros riscos inalatórios, pelo que os dados epidemiológicos necessitam de actualizações periódicas e de protocolos mais consensuais que permitam avaliar a prevalência real desta afecção, a qual permanece subestimada e largamente subdiagnosticada.

Na Península Ibérica, Soriano [15], em Espanha, constatou a existência de uma diminuição na prevalência de 9,1% em 1997 (estudo IBERPOC) para 4,5% em 2007 (estudo EPI-SCAN). Em Portugal, os valores da prevalência em 2003 eram de 5,34% [16]. Num estudo integrado no âmbito do BOLD, C. Bárbara et al. [17], em 2010, pôde constatar, numa população de 710 adultos com idade superior a 40 anos de idade (331 homens e 379 mulheres) da área de Lisboa, 17,9% dos quais eram fumadores, uma prevalência de 14,2% no estágio I ou superior (GOLD), 7,3% no estágio II ou superior e de 1,4% no estágio III ou superior. A prevalência da doença em não fumadores foi de 9,2%. Em relação à incidência, constata-se igualmente uma grande variabilidade, como ficou demonstrado nos trabalhos efectuados na Escandinávia por vários autores: Lindberg [18] reporta incidências de 15,3% no sexo masculino e de 11,8 no sexo feminino na Suécia, atingindo valores de 24,5% nos fumadores crónicos e 9,4% em não fumadores. Já no estudo de Johannessen [19], levado a cabo na Noruega, a incidência era bastante menor: 8,6% nos homens, 3,6% nas mulheres e 1,8% nos não fumadores. Lokke [20], num *follow-up* de 25

anos realizado na população de Copenhaga, constatou incidências da ordem dos 41% nos fumadores crónicos (31% nas mulheres) e de 4% e 9% nos não fumadores do sexo masculino e feminino, respectivamente.

No que diz respeito ao género, a doença é cerca de duas vezes mais prevalente no sexo masculino que no feminino; contudo, esta situação tende a modificar-se com o aumento do tabagismo entre as mulheres nos países desenvolvidos e a circunstância de muitas, embora não fumadoras, estarem sujeitas à exposição a produtos resultantes da combustão de biomassa, nos países ditos em vias de desenvolvimento. De facto, Mannino [21] constatou que em 2000, nos Estados Unidos da América, o número de óbitos por DPOC nas mulheres excedeu o dos homens. Neste contexto, Buist [22] demonstrou um aumento do risco e da gravidade da DPOC nas mulheres, em relação ao sexo masculino. Ainda neste âmbito, Tashkin, no *Lung Health Study* [23], ao explorar a relação entre a reactividade à metacolina e as alterações da função pulmonar ao longo do tempo, pôde constatar, em relação a um universo de 5733 fumadores, que as mulheres com níveis elevados de reactividade e que continuavam a fumar exibiam maiores diminuições da percentagem do FEV<sub>1</sub> previsto do que os homens fumadores, para níveis de reactividade idênticos. Com efeito, a hiperreactividade tem sido associada a um risco acrescido, não só de progressão da DPOC, mas igualmente da mortalidade [24].

Nas mulheres, o factor de risco mais importante parece ser o fumo do cigarro [25]. Neste contexto, o aumento da reactividade das vias aéreas viria a favorecer e a aumentar a deposição das pequenas partículas aerossolizadas [26], a que se associaria a forma de fumar; na verdade, esta pode influenciar a reactividade das vias aéreas, como foi demonstrado por Taylor [27] ao verificar que os padrões de inalação do fumo se relacionavam não só com a concentração de histamina, que por sua vez determinava quedas do FEV<sub>1</sub> da ordem dos 20%, como essa concentração se correlacionava com a profundidade e a frequência da inalação do fumo. Ora, as mulheres fumadoras tendem a inalar mais profundamente e a *travarem* o fumo durante mais tempo

que os homens, o que pode de facto predispô-las a lesões mais intensas das vias aéreas.

Na sua globalidade, todos estes estudos sugerem que as mulheres apresentam um risco mais elevado que os homens de desenvolverem a doença. Torres [28], ao pesquisar as diferenças na expressão clínica da DPOC entre os géneros numa amostra alargada, pôde verificar que para o mesmo grau de diminuição do FEV<sub>1</sub>, as mulheres eram 8 anos mais novas que os homens, sugerindo que a DPOC se desenvolvia mais precocemente nestas, ainda que as cargas tabágicas fossem significativamente menores (48 UMA nas mulheres *versus* 69 UMA nos homens); por outro lado, as mulheres exibiam menos comorbilidades, embora fossem mais sintomáticas: mais dispneia, mais exacerbações e pior qualidade de vida do que os homens. Relativamente à pressão parcial de oxigénio (PaO<sub>2</sub>), as mulheres, neste estudo, apresentavam valores significativamente mais elevados que os do sexo masculino, ocorrendo o inverso no que dizia respeito à pressão parcial de dióxido de carbono (PaCO<sub>2</sub>) e ao índice de massa corporal (IMC). Também na prova dos 6 minutos de marcha as mulheres evidenciaram uma pior *performance*.

Num extenso estudo populacional dinamarquês [29] sobre a susceptibilidade ao tabaco e às alterações da função pulmonar (em dois grupos nascidos após 1920) constatou-se que o tabaco tinha maior impacto na função respiratória das mulheres do que na dos homens. Assim, no grupo de mulheres fumadoras o declínio do FEV<sub>1</sub> foi de 7,4 mL por maço-ano *versus* 6,3 mL nos fumadores do sexo masculino.

Quanto ao risco de hospitalização, este foi também maior no sexo feminino. Numa vertente diferente inscreve-se o trabalho de Martinez [30] ao comparar o enfisema entre homens e mulheres, demonstrando que ele era menos grave nestas apesar de exibirem valores mais baixos da DLCO e da PaO<sub>2</sub>, maior grau de dispneia, e *scores* mais elevados do *Bode Index* e de depressão. De facto, este autor reconheceu, através de exames radiológicos e histológicos, que as mulheres evidenciavam uma proporção menor de enfisema, mas

apresentavam as paredes das pequenas vias aéreas mais espessadas em relação ao perímetro luminal, sugerindo um atingimento preferencial desta estrutura no sexo feminino, enquanto que no masculino incidiria sobretudo nos espaços aéreos. Estes resultados foram semelhantes aos obtidos por Dransfield [31], que quantificou através de tomografia computadorizada o enfisema a nível regional e total, demonstrando que os homens apresentavam a esses níveis mais enfisema que as mulheres nos vários estadios da DPOC.

A maior susceptibilidade do género feminino ao tabaco e ao risco de desenvolvimento da DPOC traduzir-se-ia não só por um declínio mais acentuado da função pulmonar como por uma evolução clínica diferente, caracterizada por mais exacerbações, maior grau de dispneia e pior qualidade de vida (para o mesmo grau de compromisso da função pulmonar), assim como por um atingimento desproporcionado das vias aéreas. Neste contexto parece relevante a constatação de que a cessação tabágica se traduz na mulher por um aumento significativamente maior da percentagem do FEV<sub>1</sub> previsto (cerca de duas vezes maior) durante o primeiro ano, do que no sexo masculino, esbatendo-se nos anos subsequentes [32,33].

Estas diferenças entre os géneros parecem verificar-se também no plano racial: as mulheres afro-americanas com DPOC apresentam maior susceptibilidade ao tabaco do que os homens [34].

Outro dos estereótipos da DPOC associa-se à idade. Com efeito, tem sido considerada uma doença que afecta sobretudo indivíduos acima dos 50 anos de idade; no entanto, de Marco [35] demonstrou, em relação a um universo de 18 mil indivíduos com idades entre os 20 e 44 anos, uma percentagem considerável de doentes jovens portadores de DPOC, concluindo que esta afecção se poderia desenvolver mais precocemente.

A mortalidade por DPOC tem vindo a aumentar de acordo com os dados da OMS. Na verdade, segundo esta Organização, em 2005, esta patologia foi responsável por cerca de 3 milhões de mortes, correspondentes a 5% de todos os óbitos considerados globalmente [36]. As estatísticas demonstraram ainda que cerca de 90% das mortes ocorreram em países de baixo e médio nível

económico [37]. Presentemente, a DPOC ocupa o quarto lugar entre as causas de mortalidade a nível mundial; contudo, as estimativas para 2020 apontam no sentido de um agravamento desta taxa o que a fará ocupar brevemente o terceiro lugar no *ranking* da mortalidade global [38]. Na Europa, este índice epidemiológico tem aumentado, registando-se no entanto grande variabilidade de país para país, como demonstram os dados do Eurostat, que evidenciou variações entre 7,2 por cem mil habitantes em França e 36,1 por cem mil habitantes na Hungria [39].

Pelo exposto, e em jeito de conclusão, podemos afirmar que a DPOC continuará nas próximas décadas a ocupar um lugar de relevo nas estatísticas mundiais e a exigir uma concertação de esforços a nível global que, para além do combate aos principais factores de risco do seu desenvolvimento, inclua igualmente medidas tendentes a minimizar muitas das assimetrias em termos sanitários e socio-económicos entre os países. A nível doméstico, a utilização de estratégias de *coping* comportamentais dirigidas a uma população alvo mais jovem poderá reverter duma forma mais sustentada os maus índices epidemiológicos desta afecção.



## CAPÍTULO III

### FACTORES DE RISCO DA DPOC

#### **1-Poluição Doméstica**

A participação de outros factores para além do tabaco [40,41] e a consistência de significativas percentagens da prevalência da afecção em não fumadores [42,43,44] vieram chamar a atenção para a pesquisa e identificação de outros riscos. Neste âmbito vários estudos têm responsabilizado o fumo resultante da combustão da biomassa como um risco importante no desenvolvimento da DPOC, sobretudo em zonas rurais e em áreas do mundo tão diversas como a Índia [42], Turquia [43] ou o México [44], utilizada para cozinhar alimentos ou como fonte de aquecimento. O fumo libertado durante a combustão contém inúmeros poluentes que incluem desde o material particulado inferior a 10 µm de diâmetro, ao monóxido de carbono, dióxido de nitrogénio, dióxido sulfúrico, formaldeído, compostos orgânicos policíclicos, assim como vários carcinogénios, entre os quais se destaca o benzopireno [45].

A exposição atingiria preferencialmente as mulheres, cujos filhos tendem a apresentar um peso à nascença mais baixo [46] que as expostas a outras fontes energéticas não poluentes como a electricidade ou o gás. Na verdade, o baixo peso à nascença é reconhecido como um factor de risco independente

da DPOC, associado a um deficiente crescimento e desenvolvimento funcional pulmonar durante a infância e a idade adulta [46]. Com efeito, esta poluição doméstica tem sido responsabilizada, tanto pelas elevadas taxas de infecção do tracto respiratório inferior e consequente aumento da mortalidade infantil nos países em desenvolvimento, como ainda pelo aumento da vulnerabilidade respiratória dos sobreviventes à DPOC ao longo da vida, e pela mortalidade significativa observada nas mulheres, resultante, quer da DPOC, quer do cancro do pulmão [46]. De facto, vários estudos epidemiológicos [46,47] têm evidenciado uma associação entre a exposição ao fumo da combustão da madeira e o aumento da prevalência de sintomas respiratórios, da diminuição da função respiratória e de um acréscimo de situações de DPOC e de asma.

## **2-Exposição Ocupacional**

A exposição ocupacional a poeiras, vapores e fumos desde há muito que foi reconhecida e implicada no desenvolvimento da DPOC em vários grupos profissionais [48]. De acordo com as estimativas publicadas [49, 50], o risco de DPOC de causa ocupacional é da ordem dos 15 a 19% e, paradoxalmente, de 31% nos não fumadores, tendo sido identificadas nestes últimos como actividades de maior risco, o trabalho rural e as indústrias têxtil, do ferro e do aço, das madeiras e da construção [51]. No entanto, também neste âmbito se podem constatar diferenças geográficas importantes influenciadas pela natureza e duração das exposições e ainda, as eventuais interacções entre estas e o tabaco, que parecem aumentar substancialmente o risco de DPOC [52].

Neste contexto, deve referir-se que o efeito de exposições cumulativas ao empoeiramento inorgânico pode ser em algumas circunstâncias superior ao do tabaco, comportando um risco de morte por DPOC significativamente aumentado [53,54]. Na verdade, num estudo efectuado por Hajdukova [55], a exposição prolongada (superior a 15 anos) ao pó do carvão associava-se a uma prevalência elevada de bronquite crónica e de DPOC, independentemente

do factor tabaco. Por outro lado, Melville [56] constatou, numa população do Nordeste de Inglaterra, que os efeitos respiratórios da exposição ocupacional se faziam sentir não só numa área industrial específica, mas igualmente na população em geral. Rodriguez [57], ao analisar o impacto de várias exposições ocupacionais nos sintomas respiratórios e na função pulmonar, verificou que a exposição a altas concentrações de poeiras minerais, gases ou fumos estava associada a valores do FEV<sub>1</sub> inferiores a 30% do previsto. Já a exposição a poeiras orgânicas determinava a ocorrência de expectoração crónica e de dispneia e um maior número de hospitalizações [58]. Relativamente à incapacidade respiratória atribuída à exposição ocupacional, atingiu os 4% num estudo que envolveu vários países europeus, em que foram incluídos indivíduos entre os 20 e 45 anos [58]. Num outro estudo [59], o mesmo autor reportou percentagens mais elevadas de incapacidade da ordem dos 25%, numa população de doentes com DPOC.

Na área agrícola o risco de DPOC é da ordem dos 7,7%, sendo particularmente mais elevado, por exemplo, nos criadores de gado comparativamente ao dos produtores de cereais [60,61].

A avaliação do contributo ocupacional na DPOC comporta uma multiplicidade de factores que se estendem desde o tabagismo activo, já referido, e que constitui mais do que um factor meramente aditivo no aumento do risco de desenvolvimento da DPOC, aos efeitos do fumo passivo e à exposição profissional que têm sido pouco estudados, à avaliação longitudinal da associação entre a DPOC e profissões específicas ou, ainda, ao impacto eventual de outras exposições prévias, até às condições de trabalho e ao ambiente profissional, que conferem a esta vertente uma extrema complexidade [62] e dificuldades acrescidas na identificação e quantificação do contributo individual de cada factor.

### **3-Poluição Ambiental**

É reconhecido ainda o papel da poluição ambiental no aumento do risco da

doença, sobretudo nas áreas urbanas, onde as altas concentrações de componentes gasosos e particulados têm sido responsabilizados não só pelo desenvolvimento como pelas agudizações da DPOC [63]. Este factor tem igualmente um impacto negativo nas crianças. Com efeito, Gauderman [64] demonstrou que as crianças que habitavam na proximidade de vias de tráfego (a cerca de 500 m) apresentavam diminuições do FEV<sub>1</sub> da ordem de 81 mL em 8 anos, relativamente àquelas que habitavam a maiores distâncias.

#### **4-Genética**

Em relação ao risco genético, vários dados têm apontado para a existência de uma componente hereditária no desenvolvimento da DPOC, entre eles a constatação de *clusters* familiares nos quais se pôde identificar um aumento do risco nos familiares de doentes com DPOC, independente dos hábitos tabágicos, da intensidade da carga tabágica individual, da exposição ao fumo passivo na infância e da exposição pré-natal, estimando-se, nestas circunstâncias, que a história parental de DPOC contribua em cerca de 20% para o risco desta afecção naquela população [65]. Assim como a existência de alterações similares da função pulmonar em gémeos monozigóticos e ausentes nos dizigóticos [66].

Entre as várias anomalias genéticas, a mais estudada, pela sua clara e inequívoca associação com o desenvolvimento precoce do enfisema panlobular, é a deficiência hereditária em  $\alpha_1$ -antitripsina ou  $\alpha_1$ -proteínase inibidor ( $\alpha_1$ -Pi) [67,68]; mas na verdade a sua contribuição no âmbito da DPOC é modesta, representando apenas cerca de 1 a 2% de todos os casos [69]. Esta glicoproteína de 394 aminoácidos e 52 kDa é um inibidor serina-protease codificada pelo gene *Serpina 1* localizado no braço longo do cromossoma 14 na região q31-32.3, cuja transmissão se faz de forma autossómica co-dominante [70]. A sua principal função é a de um verdadeiro escudo antiproteásico, protegendo o pulmão das enzimas proteolíticas através da inactivação da elastase neutrofílica e de outras serina-proteases [71,72], como

a tripsina, a quimotripsina, a catepsina G e a proteinase-3. A proteína circulante é sintetizada pelos hepatócitos e em menor quantidade por outras células, entre as quais se destacam as epiteliais brônquicas [73], os pneumócitos tipo II [74], os neutrófilos [75] e os macrófagos alveolares [76], contribuindo com outras enzimas para a manutenção do equilíbrio da relação protease-antiprotease.

A perturbação deste equilíbrio seria responsável pela destruição do parênquima pulmonar; no entanto, tornou-se evidente, pela complexidade das lesões observadas, a provável participação e interacção de outros mecanismos para além da proteólise da matriz induzida pela elastase neutrofílica no desenvolvimento do enfisema. Neste contexto, assumem papel relevante o stress oxidativo, a inflamação e a apoptose das células alveolares [77]. Por outro lado, acreditou-se que esta enzima poderia ter funções biológicas mais extensas, para além de mero écran antiproteásico, como ficou demonstrado experimentalmente através da inibição da apoptose em modelos reprodutores das lesões de isquémia-reperfusão [78,79], ou, mais especificamente, do efeito anti-apoptótico da enzima nas células alveolares em pulmões de animais cujo enfisema tinha sido induzido através do bloqueio dos receptores do *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) [80], reconhecendo-se que o seu papel na manutenção estrutural se espria para além da inibição da elastólise. Sob o ponto de vista estrutural, o local activo da enzima situa-se no aminoácido metionina na posição 358 e a sua oxidação torna-a funcionalmente inactiva [81]. Esta circunstância assume uma importância particular a nível pulmonar, dado que tanto as células inflamatórias brônquicas como as alveolares libertam oxidantes, para além das proteases, sendo esta inactivação ainda amplificada pela carga de oxidantes inalados, particularmente pelos que se encontram presentes no fumo do tabaco. Assim, a interacção entre a  $\alpha_1$ -Pi e o tabaco permite explicar, quer o desenvolvimento do enfisema em indivíduos sem alterações genéticas desta antiprotease, quer o seu desenvolvimento precoce nos portadores de mutações da enzima [82].

Reconhecem-se hoje mais de cem alelos diferentes em indivíduos portadores

de baixos níveis séricos de  $\alpha$ 1-Pi, o mais frequente dos quais é a variante Z resultante da substituição da glutamina pela lisina na posição 342 da respectiva molécula [83]. A homozigotia para este alelo (PiZZ) está associada a reduções severas da concentração sérica da enzima, cuja actividade antiproteolítica se encontra largamente comprometida, representando no estado homozigótico apenas 10% do alelo normal M e 60% no estado heterozigótico MZ [84].

A frequência deste alelo (Z) é mais elevada na raça caucasiana e nos países do norte e nordeste europeus, os quais apresentam uma frequência génica de 0,0140 [85], atingindo o máximo no sudeste da península escandinávica, Dinamarca, Holanda, Inglaterra e norte de França, onde essa frequência é superior a 0,0200 [86,87,88]. Esta distribuição geográfica reflecte a origem histórica da mutação [89]. Com efeito, os resultados de rastreios de massa efectuados em todos os recém-nascidos suecos, durante 2 anos, indicaram uma prevalência de 1/1550 indivíduos e uma frequência génica de 0,026 [90]. No *Copenhagen City Heart Study* [91] a prevalência foi idêntica à do estudo sueco, mas a frequência génica foi de 0,049, apontando para uma distribuição do PiZ que diminui gradualmente no continente europeu na direcção nordeste→sudeste, atingindo os valores mais baixos na Europa oriental [92].

O fenótipo PiMZ comporta um risco de desenvolvimento de DPOC que é 1,5 vezes superior ao do fenótipo MM como foi demonstrado em vários estudos [93,94]. Quanto à distribuição do alelo PiS é bastante diferente e mais homogénea, observando-se a sua maior frequência no sudoeste europeu, atingindo o máximo na Península Ibérica [95], com uma frequência génica superior a 0,1400, decrescendo depois segundo um gradiente sudoeste →nordeste. Nesta variante o ácido glutâmico é substituído pela valina na posição 264. O alelo S é responsável por uma diminuição das concentrações séricas da antiprotease que correspondem a cerca de 60% do alelo M, pelo que o genótipo MS não comporta um risco significativamente elevado de desenvolvimento de DPOC. Nos homozigotos PiSS as concentrações da  $\alpha$ 1-Pi são cerca de 10 a 20% inferiores aos homozigotos para alelos não deficientes, sendo portanto suficientes para prevenir as manifestações clínicas da

deficiência desta enzima. Neste contexto, Dahl [95], numa meta-análise destinada a avaliar o risco de DPOC nos portadores desta mutação, pôde constatar que o genótipo PiSZ constituía um risco significativo para o desenvolvimento de doença; aliás, algumas séries têm assinalado igualmente um aumento da prevalência de asma nos indivíduos MS [96].

Entre outras variantes destaca-se a *null* (designada por QO), a qual se encontra associada a quantidades plasmáticas indetectáveis de  $\alpha_1$ Pi e que comporta um risco muito aumentado de desenvolvimento do enfisema [97].

Na raça caucasiana os fenótipos intermediários e graves resultam das combinações dos alelos S, Z e *null*. A deficiência enzimática grave, com níveis plasmáticos inferiores a  $11 \mu\text{mol.L}^{-1}$ , inclui os homozigotos ou heterozigotos para os alelos Z e *null*, enquanto que a deficiência intermédia se expressa nos fenótipos PiMZ, PiSS e PiSZ, em que os níveis plasmáticos se situam entre os  $11$  e  $20 \mu\text{mol.L}^{-1}$  [98]. Tanto nos portadores de deficiência grave como nos fenótipos intermediários, o fumo activo constitui um factor de risco acrescido de DPOC [99,100], assim como outros agentes agressores inalatórios, entre os quais se contam os de natureza ocupacional [101,102].

Numa perspectiva diferente inscreve-se a questão da manutenção das mutações da  $\alpha_1$ -Pi ao longo da evolução. Uma das respostas possíveis da eventual vantagem selectiva da deficiência parece residir, como foi demonstrado por Lomas [103], na transformação bioquímica induzida pelas próprias mutações Z e S, que conduziriam à produção espontânea e excessiva de polímeros, tanto a nível hepático como pulmonar, com elevada actividade pró-inflamatória; ora, esta teria sido fundamental no combate às infecções que devastaram as populações malnutridas e de fracos recursos higiénico-sanitários na era pré-antibiótica. O desenvolvimento, na sua multiplicidade de impactos na sociedade humana, trouxe de facto um aumento da sobrevivência aos portadores da deficiência, mas transformou uma vantagem genética ancestral numa desvantagem mortal pela introdução do tabaco.

A abordagem da influência genética na doença pulmonar obstrutiva crónica, que partiu da premissa básica de que só 15 a 20% dos fumadores

desenvolviam a doença, foi marcada, pelo menos inicialmente, por resultados pouco consistentes [104] resultantes da conjugação de vários factores, entre os quais os de natureza metodológica, e os inerentes às dificuldades associadas a uma caracterização incompleta, de uma doença complexa e heterogénea. Como marcos relevantes neste contexto referem-se os primeiros estudos da associação familiar de casos de enfisema [105], a aplicação da espirometria na avaliação quantitativa funcional em estudos longitudinais, e a constatação da importância da hereditariedade dos parâmetros funcionais em estudos familiares de gémeos, e outros [106,107] que patentearam igualmente a influência dos factores ambientais, particularmente do tabaco.

Os estudos genéticos iniciais compreenderam a identificação de regiões cromossómicas eventualmente ligadas à doença ou presentes em análises familiares, e em estudos de genes candidatos com determinadas funções biológicas na patogenia da afecção, de que são exemplos os genes envolvidos no equilíbrio protease-antiprotease, no *stress* oxidativo, na inflamação, etc., ou nas suas variações, devidas geralmente a polimorfismos nucleotídeos simples (SNP) [108], entre os quais se contam: os polimorfismos genéticos das metaloproteinases (MMP) da matriz, particularmente da MMP-1 (colagenase intersticial), da MMP-12 (elastase macrofágica) e da MMP-9 (gelatinase B) [109,110,111], bem como dos seus inibidores tissulares (TIMPs) [112]. Neste contexto, as variantes identificadas em relação às duas primeiras estariam associadas à taxa de declínio funcional [109] e o polimorfismo da MMP-9 (C-1562T) a um risco significativo de desenvolvimento de enfisema em fumadores [110]. A MMP-12, de acordo com um trabalho recente de Haq [111], apresentava dois polimorfismos simples, em que a homozigotia para o alelo A (rs652438) aumentava não só a actividade da MMP-12 como a infiltração pelos macrófagos alveolares, contribuindo para o estabelecimento e gravidade do enfisema fornecendo assim, mais uma peça para o puzzle do *fumador susceptível*. Já em relação aos dois polimorfismos do gene TIMP-2 (G853A e G418 C) expressavam-se predominantemente na população portadora de DPOC [112].

As lesões induzidas pelo *stress* oxidativo, contrabalançadas ou não pela actividade antioxidante, foram também alvo de estudo, particularmente a hemoxygenase-1, tendo-se identificado um polimorfismo na região promotora do respectivo gene, cuja expressão foi significativa numa população de japoneses fumadores portadores de enfisema [113].

Um dos membros da família superóxido dismutase, a superóxido dismutase extracelular, ou SOD3, originou igualmente múltiplos estudos, sobretudo pela sua localização na matriz extracelular, e pela circunstância de se encontrar altamente expressa nas artérias e no pulmão. Sabe-se que a sua acção limita o processo inflamatório e previne a lesão oxidativa, impedindo a fragmentação de numerosos componentes da matriz extracelular tais como o colagénio tipo I [114], o heparano-sulfato [115] e o hialuronato [116], entre outros, pelo que as suas variantes genéticas podem contribuir para os desequilíbrios na homeostasia e função pulmonares.

Dela são conhecidos pelo menos três polimorfismos genéticos. Com efeito, Dahl [117] identificou os polimorfismos E1 (rs8192287) e I1 (rs8192288) no gene SOD3, demonstrando que os indivíduos homozigóticos exibiam um risco mais elevado de possuírem uma diminuição da capacidade vital forçada e mais hospitalizações por DPOC, em relação aos não portadores destes desvios. Curiosamente, um outro polimorfismo, o R213G (rs1799895) [118], conhecido por aumentar o risco de doença cardíaca isquémica, através da queda da SOD3 nas paredes arteriais devida à diminuição da afinidade para a heparina e outros componentes da matriz, tem sido descrito por vários autores como comportando um papel protector sobre a DPOC [119,120,121].

O gene da catalase localiza-se no cromossoma 11p13 e dele foram descritos vários polimorfismos responsáveis pelos baixos níveis de catalase eritrocitária [122], entre eles o 262C/T, estudado na população chinesa, o qual não parecia conferir uma susceptibilidade aumentada à DPOC [123].

Em relação ao citocromo P450 (CYP), este inclui um conjunto de enzimas com especificidades e substratos diferentes que desempenham um papel importante na destoxificação, e em relação ao qual se apontam vários

polimorfismos com implicações na doença, como é o caso da variante CYP1A1 presente nos doentes com DPOC, principalmente naqueles que são atingidos por formas muito graves ( $FEV_1 < 35\%$ ) [124], ou a variante descrita por Minematsu [125], o CYP2A6del, que parece exercer um papel protector do enfisema pulmonar, independente dos hábitos tabágicos.

Ainda neste âmbito, os resultados de uma meta-análise efectuada por Brogger [126] salientaram a importância da enzima epóxido hidrolase microssómica (EPHX1) presente no epitélio brônquico e participante activa na destoxificação dos epóxidos contidos, quer no fumo do tabaco, quer noutros componentes químicos de várias substâncias. A actividade funcional desta enzima pode expressar-se sob a forma rápida (Tyr113His) ou lenta (His139Arg), tendo-se verificado uma associação significativa do polimorfismo rápido com o efeito protector no desenvolvimento da DPOC e no cancro do pulmão [127,128], aumentando no entanto, paradoxalmente, o risco de carcinoma colo-rectal em fumadores [129].

Em relação à glutathiona-S-transferase, a qual tem importância no metabolismo dos hidrocarbonetos aromáticos presentes no fumo do cigarro, foram identificados polimorfismos associados, tanto à bronquite crónica em fumadores [130], como à DPOC [131].

O reconhecimento da importância da inflamação desde as fases inicial e evolutiva da doença conduziu à pesquisa dos genes responsáveis pelas citocinas pró-inflamatórias e suas variantes, entre as quais, se destaca o factor de necrose tumoral - alfa (TNF- $\alpha$ ), no qual a presença de um polimorfismo na posição 308, se associava à presença da DPOC ligada ao tabagismo nos indivíduos de origem japonesa [132]. Já o polimorfismo da interleucina-13 (IL-13) (1055) estava presente nos portadores de DPOC e nos fumadores funcionalmente normais [133]. Outra citocina alvo de interesse neste contexto, foi a interleucina-6 (IL-6), cuja importância no âmbito da DPOC foi suscitada pela constatação de que os seus níveis elevados, tanto séricos como na expectoração, se associavam às alterações da função pulmonar, especialmente ao seu rápido declínio [134, 135]. Estes achados vieram a ser

confirmados pelos resultados de He [136] que identificou, numa *coorte* do *Lung Health Study*, três polimorfismos ligados a uma diminuição do FEV<sub>1</sub>, entre os quais o alelo C (IL-6174C), associado a um rápido declínio da função pulmonar e a um conseqüente aumento da susceptibilidade à DPOC nos fumadores.

Um outro polimorfismo do gene do ligando da quimiocina CCL5, que foi relacionado inicialmente com o aparecimento tardio da asma [137], para a qual parecem contribuir os processos infecciosos, particularmente virusais [138], encontrava-se ligado à DPOC com enfisema ligeiro [139].

O estudo dos polimorfismos da proteína D do surfactante pulmonar (SFTPD) [140] permitiu o reconhecimento da associação destes com a susceptibilidade à DPOC, assim como a sua influência nas concentrações séricas dessa proteína, produzida principalmente pelos pneumócitos tipo II e libertada na corrente sanguínea na presença de uma lesão pulmonar [141], pelo que apresenta a capacidade de se tornar um potencial marcador de eventuais agudizações [142]. Encontra-se em baixas concentrações no LBA de doentes com DPOC, por oposição aos seus níveis séricos, geralmente mais elevados [143].

O estudo do receptor  $\beta$ -adrenérgico (ADRB2), localizado nas células musculares das vias aéreas [144] e com funções importantes, na regulação do tónus muscular, revelou que um dos seus polimorfismos, o Thr164Ile, que reduz a afinidade da ligação ligando-receptor [145], se expressava na queda da função pulmonar e no aumento do risco de DPOC na população em geral [146]. Bakke [147], ao estudar 257 polimorfismos simples de 16 genes potencialmente associados à DPOC em duas *coortes*, detectou a existência de associações significativas das variantes dos genes STAT1 e NF-kBIB/SIRT2 com o FEV<sub>1</sub> previsto, e com a relação FEV<sub>1</sub>/FVC. Estes genes parecem encontrar-se envolvidos nos vários mecanismos patogénicos da doença.

Uma das principais limitações deste tipo de estudos é a inconsistência e, por vezes, a conflitualidade de resultados entre os vários trabalhos.

Segundo Silverman [148], uma definição clínica precisa e válida dos vários

perfis da doença constituiria um requisito fundamental para uma adequada identificação genotípica. Neste contexto, a aplicação do *Genome-Wide Association Studies* (GWAS) veio complementar significativamente, o conhecimento da vertente genética da DPOC.

Foi com base neste tipo de estudos que foram identificados vários *loci* genéticos associados à susceptibilidade da doença. Pillai [149] demonstrou e reproduziu, em quatro *coortes*, a associação entre os polimorfismos (rs8034191 e rs1051730) no locus -  $\alpha$  *Nicotinic Acetylcholine Receptor* (CHRNA 3/5) do cromossoma 15q25 - e a DPOC, com um risco estimado da ordem dos 12,2%. Verificou ainda a existência de uma ligação do CHRNA3/5 com a função pulmonar, particularmente com o FEV<sub>1</sub>. Em relação ao tabaco, este autor pôde igualmente reconhecer a presença de um risco substancialmente maior de DPOC nos fumadores activos portadores do alelo C (rs8034191). A associação deste locus com a dependência nicotínica tem sido assinalada por outros investigadores [150,151], assim como com o cancro do pulmão e a doença arterial periférica [152].

Neste âmbito foram também identificados dois polimorfismos simples (rs13118928 e rs1828591) próximo do locus da *Hedgehog - Interacting Protein* - (HHIP) no cromossoma 4q31 [153]. A família *Hedgehog* codifica moléculas de sinalização da regulação da morfogénese, podendo por isso ter um papel importante no desenvolvimento pulmonar, bem como na resposta do epitélio das vias aéreas ao fumo do tabaco [154,155]. Assim, estes polimorfismos encontram-se associados à função pulmonar, à DPOC e à dependência tabágica.

Ainda neste contexto, Zhou [156] confirmou a associação de dois polimorfismos simples a nível do cromossoma 4q31, numa *coorte* polaca de portadores de DPOC grave. A expressão da HHIP, quer a nível proteico, quer no mRNA do tecido pulmonar dos portadores de DPOC, encontrava-se diminuída, favorecendo o aumento da susceptibilidade à DPOC. Por outro lado, Young [157] demonstrou que para o mesmo locus 4q31, tanto o genótipo G do polimorfismo rs1489759 do HHIP, como o genótipo C rs2202507 da glicoforina

A (GYPA), conferiam um efeito protector em relação à DPOC e ao cancro do pulmão em fumadores.

Outro gene implicado na susceptibilidade à doença, identificado através do estudo genómico integrado, é o *Iron Regulatory Protein 2* (IREB2) [158], localizado no cromossoma 15q25.1. A região 15q inclui vários outros genes para além do já citado, *nicotinic acetylcholine receptor*, identificado nos estudos GWAS do cancro do pulmão, doença em que a componente tabágica é igualmente importante [159,160].

A dinâmica do ferro no organismo depende da actividade de duas proteínas regulatórias (IRPs) que funcionam como sensores citosólicos do ferro, modulando as proteínas envolvidas na captação, distribuição e armazenamento deste ião [161]. Na verdade, a lavagem broncoalveolar permitiu detectar variações regionais das concentrações de ferro e das proteínas a ele associadas nos pulmões de fumadores [162], com concentrações mais elevadas de ferro a nível dos lobos superiores, comparativamente aos inferiores, sugerindo que estas diferenças poderiam ser responsáveis pelo aumento da carga oxidativa nas regiões pulmonares superiores, o que contribuiria não só para a patogenia do enfisema como para o desenvolvimento do cancro do pulmão. Por outro lado, a demonstração de um aumento da interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) nessas mesmas regiões poderia representar, segundo O'Brien-Ladner [163], um elo de ligação entre os níveis pulmonares de ferro e o processo inflamatório pulmonar.

Dois outros estudos do GWA ao nível do locus 4q22 no gene da *Family With Sequence Similarity 13 member A*, ou FAM13A, associaram-no a uma função pulmonar normal e a um menor risco de DPOC [164]. A análise sequencial permitiu ainda identificar uma proteína de activação (Rho GTPase) com uma actividade supressora tumoral demonstrada no estudo de Young [165] em doentes com cancro do pulmão, nos fumadores com função pulmonar normal e nos doentes com DPOC, tendo-se constatado que a variante rs7671167 (alelo C) estava não só associada a um risco reduzido de DPOC, como também de cancro do pulmão, mesmo nos indivíduos portadores de DPOC, o que sugere

que o locus 4q22 faz parte de um conjunto de genes partilhados entre a DPOC e o cancro do pulmão. De facto, esta partilha de genes pode explicar a forte ligação entre a DPOC e o cancro nos fumadores. Mais recentemente, Cho [166], num estudo alargado envolvendo quatro *coortes*: *ECLIPSE*, *National Emphysema Treatment Trial* (NETT), *Bergen-Norway GenKOLS* e *COPD Gene Study*, identificou no locus 19q13, previamente implicado na dependência tabágica e no consumo de cigarros por dia [167, 168], dois polimorfismos simples - rs7937 e rs2604894 - associados com o FEV<sub>1</sub> (pré-broncodilatação) e com as formas graves, e muito graves de doença pulmonar obstrutiva crónica. Relativamente ao gene ADAM33, membro da família das desintegrinas e metaloproteases, localizado na região do cromossoma 20p13, está envolvido na adesão e fusão celulares, bem como na sinalização celular e proteólise [169,170], possui alguns polimorfismos associados com o rápido declínio da função pulmonar na população em geral, e nos asmáticos [171,172], parecendo estar igualmente ligado à susceptibilidade à DPOC e à inflamação das vias aéreas [173,174].

Mais recentemente, Wang [175] demonstrou o envolvimento de polimorfismos deste gene na DPOC numa população do nordeste da China.

Uma abordagem mais consentânea com o actual *estado da arte*, e provavelmente mais pragmática da doença pulmonar obstrutiva crónica e da sua componente genética, centra-se no estudo da influência desta nos diferentes subtipos da doença. É neste âmbito que se inscreve o estudo de Kong [176], o qual demonstrou que uma variante do gene BICD1, importante na função da dineína (mitose, migração nuclear, transporte mRNA, etc), conferiria susceptibilidade ao fenótipo enfisematoso, através da análise do GWAS de várias *coortes* e da tomografia axial computadorizada na detecção e quantificação do enfisema pulmonar. Ou ainda o estudo de Pillai [177], que partindo do conhecimento adquirido dos genes e das suas variantes em relação ao HHIP, CHRNA3/5, FAM13 e IREB2, procurou determinar a sua influência nos vários fenótipos da doença obtidos a partir da população do estudo ECLIPSE e replicados no *International COPD Genetics Network* (ICGN),

tendo constatado que o CHRNA3/5 estava significativamente associado com os hábitos tabágicos (número de cigarros por dia e carga tabágica), com o FEV<sub>1</sub> e com a relação FEV<sub>1</sub>/FVC nos casos de DPOC do estudo ECLIPSE e do ICGN, com o aumento do BODE Index na *coorte* ECLIPSE e, ainda, com a quantificação do enfisema por tomografia computadorizada, não evidenciando qualquer relação com as agudizações. O HHIP e o FAM13A não mostraram qualquer relação com os hábitos tabágicos, tanto nas populações do ECLIPSE como no ICGN. O HHIP revelou uma associação significativa com a relação FEV<sub>1</sub>/FVC no ECLIPSE e no ICGN, assim como com as agudizações prévias, e somente uma tendência, com as exacerbações posteriores durante o período de dois anos do estudo ECLIPSE. O FAM13A apenas detectou uma associação significativa com o FEV<sub>1</sub> e com a relação FEV<sub>1</sub>/FVC na *coorte* ICGN, não exibindo qualquer relação com os fenótipos enfisematosos. Quanto ao IREB2, evidenciou uma associação significativa com o FEV<sub>1</sub>.

Em termos gerais, podemos afirmar que, também neste âmbito, a complexidade da DPOC se expressa pela interação entre os vários factores ambientais e a multiplicidade de polimorfismos genéticos e que, não obstante os progressos verificados nesta área, permanecem ainda na obscuridade muitos dos mecanismos que modulam a susceptibilidade à doença.

## **5-Infecções Respiratórias**

As infecções respiratórias desempenham um importante papel, tanto no desenvolvimento como no agravamento da DPOC, aceitando-se que as lesões provocadas pelos agentes infecciosos durante a infância, num período importante do desenvolvimento pulmonar, possam causar alterações permanentes neste órgão [178, 179], predispondo ao desenvolvimento da afecção, mais tarde, na vida adulta. Alguns estudos têm demonstrado que a bronquiolite, o *croup* ou a pneumonia na infância, podem ser responsabilizadas por alterações funcionais, com quedas médias do FEV<sub>1</sub> da ordem dos 0.65 L

em crianças que foram atingidas por pneumonia antes dos dois anos de idade [179].

A associação de tuberculose à obstrução crónica das vias aéreas tem sido reconhecida durante todas as fases da infecção, estando presente desde a altura do diagnóstico até ao tratamento e no decurso de mais alguns anos [180]. Este processo infeccioso específico seria responsável por alterações estruturais, entre as quais a fibrose das vias aéreas, e pela inflamação resultante da resposta imunológica ao *Mycobacterium tuberculosis*. A concepção de que a tuberculose pulmonar seria um factor de risco da DPOC é antiga e vários autores nas décadas de 70 e 80 chamaram a atenção para essa associação [181,182,183,184]. Ainda neste contexto, mais recentemente, Brashier [185] demonstrou que cerca de 50% dos doentes tratados por tuberculose pulmonar evidenciavam uma obstrução das vias aéreas. Numa pesquisa alargada, efectuada na África do Sul em 2004 [186], os resultados apontaram para os antecedentes de tuberculose como um factor altamente predictivo da bronquite crónica com um *odds ratio* de 4,9 para os homens (95% CI 2,6-9,2) e de 6,6 para as mulheres (95% CI 3,7-11,9). Outros estudos, nomeadamente o *Burden of Obstructive Lung Disease* (BOLD) [187], e um outro idêntico, realizado na América Latina (PLATINO Study) [188], vieram reforçar a constatação de que a tuberculose prévia constituía um factor de risco da DPOC. Ora, esta associação à tuberculose reveste-se de grande importância, tendo em linha de conta os dados epidemiológicos globais desta infecção: 2 biliões de infectados pelo *Mycobacterium tuberculosis* e cerca de 9,2 milhões de novos casos por ano, salientando-se ainda, que a maioria dos casos se distribuem pela Ásia, África e América do Sul [189]. Esta distribuição da tuberculose tem ainda outras implicações epidemiológicas, sobretudo em relação à epidemia do tabaco, à DPOC e à infecção VIH, partilhando sinergismos cujos impactos negativos já se fazem sentir numa larga porção da população mundial [190].

A participação das infecções latentes, sobretudo de etiologia viral, durante a infância e o risco de DPOC, tem sido alvo de várias investigações centradas

nos adenovirus, cujos resultados demonstraram: a presença no tecido pulmonar de fumadores com obstrução aérea de três vezes mais ácido desoxirribonucleico adenoviral-Ad E1 (DNA) que nos fumadores sem obstrução [191]; que o DNA adenoviral ficava retido nas células epiteliais pulmonares; que o gene E1 do adenovirus se expressava nas células epiteliais das vias aéreas e no parênquima pulmonar do hospedeiro, sem replicação do vírus [192]; e que o processo inflamatório pulmonar observado nos fumadores com enfisema grave, se encontrava associado ao aumento de células epiteliais alveolares que expressavam o E1A [193].

Os estudos efectuados no animal confirmaram que as proteínas E1 do adenovirus na infecção latente tinham a capacidade de se ligarem aos factores de transcrição, ou seja, possuíam o potencial para alterar a expressão dos genes do hospedeiro implicados no processo inflamatório [194]. Estes achados viriam a ser complementados, posteriormente, com a constatação de que os adenovirus induziam uma transformação epitélio-mesenquimatosa que, segundo Behzad [195], contribuiria para o processo de *remodeling* das vias aéreas periféricas, desregulando a deposição da matriz nas paredes das vias aéreas, intervindo portanto, na patogenia da afecção.

Ainda neste contexto, a infecção latente pelo vírus Epstein-Barr (EBV) [196] parece ser mais frequentemente identificada no tracto respiratório dos doentes com DPOC do que no dos fumadores sem doença, estando presente, quer nas agudizações, quer nos períodos de estabilidade da afecção. Salienta-se que um dos possíveis mecanismos de actuação do vírus na infecção crónica seria a interferência com a produção de INF- $\gamma$ , que facilitaria a recorrência de infecções virais e bacterianas.

## **6-Factores Socio-económicos**

O baixo nível socio-económico é apontado como um factor de risco independente associado à DPOC, e comporta um conjunto de diferentes dimensões, cujos impactos podem ser relevantes em várias áreas, como a

nutrição deficiente, o baixo peso à nascença, as condições precárias de habitabilidade, a exposição ao tabaco e a poluentes domésticos, as infecções respiratórias na infância, as exposições ocupacionais, etc. Estes factores de *per se*, e mais frequentemente em conjunto, constituem um risco importante da DPOC, cuja repercussão embora variável, é passível de tradução em termos quantitativos funcionais, apontando-se globalmente nas situações de baixo nível socio-económico para reduções do FEV<sub>1</sub> da ordem dos 300 mL nos homens e de 200 mL nas mulheres [197,198].

## **7-Outros Factores de Risco**

A constatação em vários estudos epidemiológicos [199,200,201,202] de um número substancial de portadores de DPOC não fumadores que, em termos gerais, se estima que oscile entre um quarto e um terço de todos os casos de DPOC, desencadeou o interesse pelas características, e potenciais factores de risco nesta população. Neste contexto, Lamprecht [202], num estudo multicêntrico envolvendo catorze países, pôde verificar que 6,6% da população estudada não fumadora apresentava um estágio I e que 23,3% preenchiam os critérios de DPOC moderada a muito grave, salientando-se que mais de dois terços destes doentes eram mulheres. Esta incidência no género feminino foi evidenciada igualmente por outros autores [203].

O perfil clínico dos portadores de DPOC moderada a grave incluía: doentes mais idosos, menos instruídos e mais sintomáticos (tosse, expectoração, pieira e dispneia), com antecedentes patológicos de asma, tuberculose pulmonar ou de doença cardiovascular, e com eventuais hospitalizações durante a infância por problemas respiratórios. Este grupo reportava ainda a exposição doméstica aos produtos de combustão do carvão e pelo menos 10 anos de exposição a poeiras orgânicas. Já o perfil clínico dos não fumadores com obstrução ligeira era idêntico ao dos fumadores sem obstrução [202,203]. Ainda neste âmbito Zhou [204], no *Chinese Epidemiologic Survey of COPD* (CESCOPD), constatou que a prevalência de DPOC em não fumadores era de 5,4%, dos quais 1,4%

no estágio I e 3,7% nos estágios II a IV, e que as mulheres se contavam entre a maioria dos doentes não fumadores. O perfil clínico nos estágios mais avançados da doença incluía igualmente a idade mais avançada, a exposição a fumos de combustão de biomassa, menos instrução e um baixo índice de massa corporal, enquanto que o estágio 0 se associava exclusivamente com a exposição ocupacional a poeiras, gases e fumos. Já no estágio I os doentes partilhavam dos mesmos factores de risco daqueles com obstrução mais grave (estágios II-IV) como: idade mais avançada, sexo masculino, história familiar de doença respiratória, tosse recorrente na infância e exposição passiva ao fumo do tabaco e aos fumos de biomassa e má ventilação doméstica [204].



## **CAPÍTULO IV**

### **CONTRIBUIÇÃO DO ENVELHECIMENTO PARA AS MANIFESTAÇÕES SISTÉMICAS DA DPOC**

Durante décadas a DPOC centrou-se no aparelho respiratório, de tal forma que, embora se reconhecessem algumas manifestações extrapulmonares da doença, elas eram enquadradas como consequências inevitáveis e irreversíveis da gravidade da obstrução do fluxo aéreo. Assim por exemplo, a perda de peso associada ao enfisema pulmonar foi reconhecida e descrita desde os finais do século XIX por Fowler e Godlee [205]; mas só a partir dos anos 60 do século passado, é que alguns autores chamaram a atenção para a importância do emagrecimento, como factor preditivo negativo da sobrevivência nesta afecção [206]. Ainda neste contexto realça-se o poder dos estereótipos: a DPOC era uma doença dos velhos fumadores.

Neste âmbito, porém, o envelhecimento constitui um factor relevante, dado que associa às alterações estruturais do organismo, perturbações da sua função, tornando-o globalmente mais vulnerável aos desafios, quer do meio interno

quer do ambiente, coadjuvados e/ou modulados pelo *background* genético. Com efeito, aceita-se que ao longo deste processo biológico complexo as células acumulem alterações decorrentes dos mecanismos de agressão e de reparação; o resultado cumulativo dos defeitos celulares traduzir-se-ia posteriormente, em fragilidade relacionada com a idade, incapacidade e/ou mesmo doença [207]. Sob o ponto de vista imunológico, o envelhecimento pode ser reconhecido por um conjunto complexo de alterações designadas colectivamente por imunosenescência [208], com anomalias, quer da vertente inata [208], quer da adaptativa [209], responsáveis pelo aumento da morbidade e da mortalidade por doenças infecciosas, autoimunes ou neoplásicas [210]. De facto, o envelhecimento humano é acompanhado por um processo inflamatório sistémico, designado por *inflamm-aging* [211, 212,213], o qual pode resultar tanto do aumento da libertação de mediadores inflamatórios em resposta a condições patológicas pré-existentes, como do declínio do sistema inato, cuja principal função é a manutenção do balanço citocínico e o controlo da inflamação. Neste contexto alguns autores têm vindo a referir o aumento, quer no sangue quer a nível tecidual, da IL-6 sobretudo nos indivíduos que mostram maior limitação da mobilidade nas actividades da vida diária, ou depressão, bem como da proteína C reactiva (PCR) e do fibrinogénio [213,214], realçando o facto da sua presença se associar a consequências clínicas negativas [215]. Também, e de novo, se pode colocar a questão se são os factores de risco que alteram a regulação das citocinas pro-inflamatórias, ou se existe uma predisposição genética para essa desregulação, que associando-se ao risco tornariam o indivíduo mais susceptível a esses factores [216].

### **1-Envelhecimento da População. Alguns Dados Estatísticos**

Em relação ao envelhecimento da população, dados da Organização das Nações Unidas (ONU) [217] evidenciaram percentagens de indivíduos idosos superiores a 20% em quase todos os países da Europa do Norte e Ocidental, e

entre 17 e 20% na América do Norte, Austrália e Europa de Leste. Ainda na Europa Ocidental, e segundo a mesma fonte, 23,4% da população é idosa e existem 15,9% de indivíduos com menos de 14 anos. Em termos globais os idosos representavam 11% (605 milhões) da população total.

Dados mais recentes da OMS [218], assinalam uma duplicação da população global com mais de 60 anos entre 1980 e 2012, estimando-se que venha a atingir os 2 biliões em 2050, ou seja, 22% da população mundial.

Este aumento dos idosos mesmo nos países de baixos e médios recursos representa sem dúvida uma melhoria das condições de vida e da saúde das populações; no entanto irá colocar novos desafios a nível global, tanto no âmbito da saúde, através da necessidade de profissionais dedicados à prevenção e ao tratamento dos problemas do envelhecimento, e ao desenvolvimento de políticas sustentáveis que permitam um fácil acesso a cuidados prolongados e paliativos, como em termos sociais, através da mudança do conceito de *velhice*, que permita desenvolver modelos de envelhecimento e ambientes sociais *age-friendly* consentâneos com uma participação activa e visível desta população.

Em Portugal, segundo os dados do Instituto Nacional de Estatística (INE) (Censos 2011) [219], constatou-se um aumento do número de idosos Fig.2. Em 2001 este grupo etário representava já cerca de 20% da população total, enquanto que o número de jovens com menos de 14 anos passou de 29% para 17 % no mesmo período. Entre 2001 e 2011 verificou-se não só uma redução da população mais jovem com menos de 14 anos, mas igualmente da população jovem activa com idade inferior a 24 anos, de 5,1% e 22,5%, respectivamente. Em contrapartida assistiu-se a um aumento da população idosa (mais de 65 anos) para 19,4% bem como da faixa etária situada entre os 25 e os 64 anos, que cresceu 5,3%. No que diz respeito ao índice de envelhecimento (número de indivíduos com 65 anos ou mais em relação à população dos 0-14 anos, expressa em número de idosos por cada 100 indivíduos dos 0-14 anos) este é, segundo os dados de 2011, de 128. Pelo que diz respeito ao índice de longevidade da população (população de 75 ou mais

anos em relação ao total da população idosa) em 2011 esse índice era de 48, em comparação com os índices de 2001 e 1991 que foram de 41 e 39 respectivamente [219].

A perda da população em todos os grupos etários associada ao aumento dos índices de envelhecimento e de longevidade traduzem o grave problema demográfico do País.

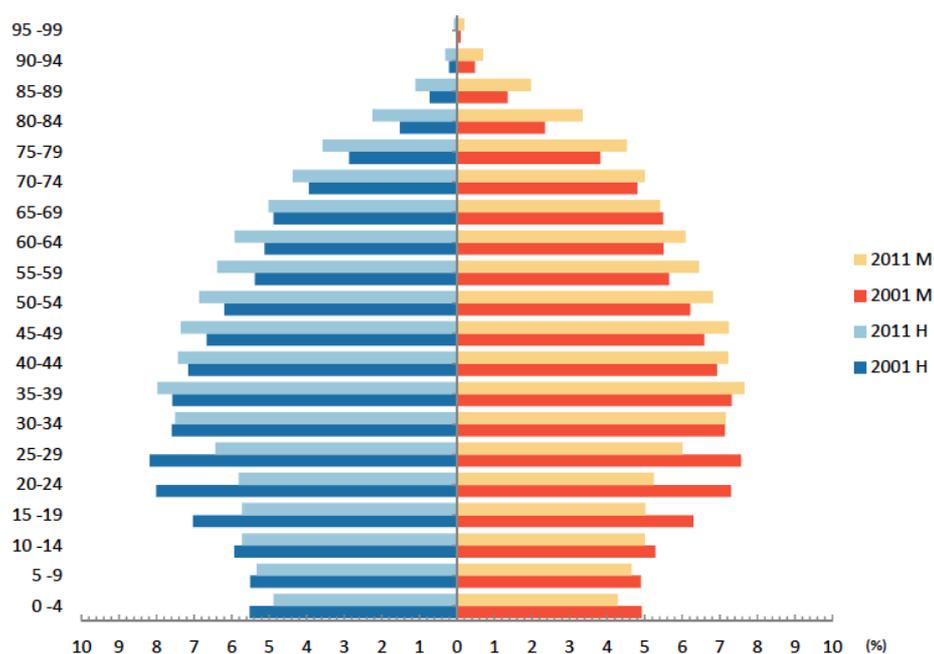


Fig. 2- Estrutura Etária da População Portuguesa Residente por sexo (2001-2011) (Censos 2011. Resultados Definitivos-Portugal. INE)

## 2-Envelhecimento e Stress Oxidativo

Em termos gerais parece ser consensual que o envelhecimento comporta um aumento da prevalência de doenças crónicas: cardiovasculares, neoplásicas, metabólicas e doenças respiratórias crónicas, particularmente a DPOC, entre outras [210].

Assim, o envelhecimento pode ser perspectivado como uma perda progressiva e gradual da homeostasia dos vários sistemas que integram o organismo

humano após a maturação reprodutiva [220] e obedece, segundo Strehler [221], a quatro regras: é universal, progressivo, intrínseco e deletério, na medida em que conduz inevitavelmente à morte.

A imunosenesescência justificaria de *per se* a maior susceptibilidade, quer a afecções infecciosas, quer inflamatórias. Pelo contrário, a manutenção da funcionalidade imunológica seria um bom indicador do estado de saúde e da longevidade [220]. No entanto, a imunosenesescência é mais que um simples processo de declínio unidireccional, englobando um complexo quadro de múltiplas alterações, interacções e *remodeling*, em que algumas funções podem de facto estar diminuídas, enquanto outras se encontram conservadas ou até ampliadas [222].

Existem múltiplas teorias para abordar o envelhecimento, as quais vão desde as de fundamentação estritamente genética, onde o envelhecimento seria devido a uma programação genética prévia, à epigenética, em que o envelhecimento resultaria de eventos não programados geneticamente, que ocorreriam de forma randomizada ou estocástica e que culminariam no conceito de Harman [223], ou teoria dos radicais livres, segundo a qual as espécies reactivas de oxigénio (ROS) formadas durante os processos metabólicos induziriam lesões, que cumulativa e progressivamente, conduziriam ao envelhecimento ou senescência. Mais recentemente Kirkwood [224] propôs que o envelhecimento seria o resultado de uma interacção estocástica entre os processos de lesão e de reparação, como consequência da bioenergia necessária à manutenção da integridade orgânica e da protecção do DNA das lesões oxidativas. Neste modelo, conhecido também como *disposable soma*, a falência dos mecanismos de manutenção/reparação, dependentes da interacção entre os genes, o ambiente e os defeitos intrínsecos do organismo, desencadearia uma acumulação de lesões celulares que por si só seriam capazes de promover uma reacção inflamatória passível de ampliar o processo lesional [224].

Neste sentido, a inflamação associar-se-ia às alterações estruturais e funcionais, decorrentes da incapacidade em eliminar eficazmente os radicais

oxidantes e/ou de reparar as lesões, modulando o processo de envelhecimento. As lesões do DNA originadas principalmente pelo *stress* oxidativo, associado ao tabagismo e/ ou a outros factores, seriam responsáveis pelas mutações somáticas que atingiriam a maior parte das células do organismo, com o envelhecimento. Deste modo, uma maior capacidade de reparação das lesões do DNA estaria associada a uma maior longevidade [216].

Outro aspecto importante neste âmbito prende-se com a instabilidade genómica, que parece ser um mecanismo relevante, não só do envelhecimento, mas igualmente das doenças dependentes da idade [225, 226].

### **3-Factores do Envelhecimento**

O encurtamento progressivo dos telómeros [227,228] tem sido relacionado com o envelhecimento, com o aumento do risco de várias doenças, entre as quais o cancro, e também com a mortalidade. Os telómeros desempenham um papel importante na estabilidade cromossómica, prevenindo activações inapropriadas das vias de lesão do DNA, regulação da viabilidade celular e condução de sinais de envelhecimento às células normais, etc. [225,227,228]. O comprimento dos telómeros é controlado pela enzima telomerase. Nos indivíduos normais, esta encontra-se expressa nas células germinais e raramente nas células somáticas diferenciadas. Uma expressão elevada da telomerase parece correlacionar-se com a carcinogénese: 85% a 90% dos cancros humanos evidenciam uma actividade elevada desta enzima [227]. Por outro lado, a supressão da actividade da telomerase em células cancerígenas telomerase positivas, leva à morte celular, e à diminuição do crescimento tumoral [228]. Contrariamente, uma alta estabilidade dos telómeros correlaciona-se com o aumento da sobrevida [229], com a protecção das doenças associadas à idade, com a melhoria das funções cognitivas e do perfil lipídico, conferindo uma maior sobrevida [227,229].

A acumulação das proteínas danificadas, ou mal transcritas, é uma outra característica do envelhecimento, estando presente em doenças tão diversas como as cataratas, as doenças de Alzheimer, de Parkinson e na DPOC [225]. De facto, o *turnover* proteico implica a cooperação de substratos proteicos que ajudam a sequestrar e/ ou a reparar as proteínas desnaturadas, bem como de proteasomas que as degradam através da via da ubiquinação, mas durante o envelhecimento ambas parecem estar funcionalmente comprometidas [230, 231].

#### **4-Moléculas Anti-envelhecimento**

Em relação às moléculas anti-envelhecimento, estas são representadas principalmente pela família das sirtuinas [225,232]. Trata-se de proteínas desacetilases (enzimas) que actuam especificamente em substratos acetilados. Catalisam a reacção em que a nicotinamida-adenina-dinucleótido (NAD) e o substrato acetilado são convertidos no produto desacetilado, nicotinamida, e no metabolito O-acetil adenosina difosfato (ADP)-ribose [232]. Embora a capacidade de catalização se afigure conservada nesta família, estas enzimas parecem deter especificidades diferentes consoante os substratos acetilados em que actuam, o que lhes confere um espectro alargado de actividades fisiológicas, entre as quais se destacam: o controlo da expressão genética, a regulação do ciclo celular, o metabolismo, a apoptose e o envelhecimento [233]. Estão identificadas nesta família sete proteínas: da SIRT<sub>1</sub> à SIRT<sub>7</sub> [232] e, ainda, as sirtuinas tipo III histona desacetilases (HDAC). A HDAC-2 tem também funções anti-envelhecimento [234]. A actividade da SIRT<sub>1</sub> estende-se pela regulação da apoptose, pela resistência ao *stress*, sinalização da insulina e da inflamação, diminuindo a sua actividade face ao stress oxidativo. Estudos efectuados em modelos murinos deficientes em SIRT<sub>6</sub> [235] conduziram ao desenvolvimento entre as duas e três semanas, de um conjunto de alterações como: linfopenia, perda da gordura subcutânea, cifolordose, alterações metabólicas e morte precoce, sugerindo portanto, que esta molécula está

implicada na reparação do DNA e na supressão da instabilidade genómica, pelo menos no animal.

Uma outra família de proteínas reguladoras da transcrição (Forkhead) [236] é representada pela FOXO, que tem uma acção importante na reparação do DNA, na resistência ao stress oxidativo e na produção de anti-oxidantes, como a superóxido dismutase e a catalase [237,238].

Os factores FOXO poderão estar relacionados não só com a longevidade em mamíferos [239] como desempenharem um papel na prevenção do declínio funcional cardíaco associado à idade, nos invertebrados [240].

Ainda no conjunto dos factores de transcrição, o *nuclear factor erythroid-2 related factor-2* (Nrf<sub>2</sub>) induz a produção de moléculas anti-oxidantes, participando na formação da glutathiona [225].

Outro grupo de proteínas responsáveis pela reparação do DNA celular, extensivamente estudadas em modelos animais, é representado pelas proteína-cinases (proteínas Ku) DNA dependentes (DNA-PK): Ku70 e Ku86 ou Ku80. A Ku70 parece ter ainda uma função reguladora da apoptose, inibindo a translocação do factor pro-apoptótico Bax para a mitocôndria [241]. Ainda neste contexto salienta-se a proteína membrana da família das glicosidasas codificada pelo gene Klotho e que poderá ter uma actividade protectora do stress oxidativo sobre as células e tecidos. No mutante homocigótico (KL<sup>-/-</sup>), o rato apresenta uma diminuição do período de vida, enfisema, aterosclerose, osteoporose, atrofia cutânea e calcificações [242]. O enfisema, neste modelo, parece estar associado a um aumento da metaloprotease 9 (MMP-9) [243].

A proteína 30 (SMP30), que se encontra expressa largamente nos vertebrados, é um marcador da senescência, diminuindo com a idade de uma forma hormono-independente (androgénio-independente) [244]; sabe-se que os ratos sem esta proteína desenvolvem um pulmão senil [245], têm uma sobrevivência menor [246] e, quando expostos ao fumo do tabaco, evidenciam a nível pulmonar um alargamento dos espaços aéreos acompanhado de destruição parenquimatosa [247].

Com a idade, qualquer destes factores parece estar atenuado; por outro lado,

dada a sua relevância biológica, podem constituir potenciais alvos terapêuticos.

## **5-Envelhecimento e Alterações Funcionais Respiratórias**

Sob o ponto de vista funcional respiratório o envelhecimento condiciona tanto as alterações estruturais como as funcionais, conhecidas pela designação pouco apropriada de *enfisema senil* [248], as quais englobam: a dilatação alveolar, o aumento dos espaços aéreos, a diminuição da superfície de trocas gasosas e a perda do tecido de suporte das vias aéreas periféricas. Estas alterações acarretam uma diminuição da retracção elástica estática e um aumento da capacidade residual funcional [249]. Por outro lado, as perturbações estruturais da caixa torácica, ao conferirem-lhe maior rigidez, aumentam o trabalho respiratório; no entanto, a capacidade pulmonar total permanece pouco alterada, mas a capacidade vital reduz-se com a idade, contrariamente ao que acontece com a capacidade residual funcional, que tende a aumentar com o envelhecimento [249].

Ainda no âmbito das alterações estruturais, a força muscular diminui, parecendo correlacionar-se, quer com o estado de nutrição, quer com o índice cardíaco [250,251]. Os débitos expiratórios tendem a cair, com atingimento preponderante das pequenas vias aéreas. A transferência alvéolo-capilar do monóxido de carbono (DLCO) diminui, traduzindo a redução da superfície de trocas. Estas alterações são no entanto discretas, repercutindo-se nos gases do sangue arterial por uma ligeira quebra da pressão parcial de oxigénio, habitualmente sem alterações significativas da pressão parcial do dióxido de carbono [251]. Porém, o envelhecimento atinge também os centros respiratórios, tornando-os menos sensíveis, quer à hipoxia quer à hipercapnia, o que pode explicar a relativa desadequação da resposta ventilatória a situações de *stress* orgânico, como infecções e/ou insuficiência cardíaca e agudizações da DPOC, entre outras [248].

O envelhecimento seria pois um *continuum* dinâmico de interacções genéticas, ambientais, metabólicas e imunológicas, as quais podem ter um papel

modificador e/ ou modulador do ritmo do envelhecimento [252]. De facto, a compreensão dos mecanismos moleculares deste processo parece decorrer actualmente, de uma tendência integradora das múltiplas informações que foram obtidas ao longo de décadas de investigação deste processo biológico, bem como da óbvia sinalização de diversos alvos, com finalidade terapêutica. Tanto no envelhecimento como nas doenças dele dependentes, apesar de possuírem etiologias e mecanismos complexos, a inflamação em maior ou menor grau parece desempenhar um papel decisivo.

## **6-Envelhecimento e Inflamação**

O processo inflamatório crónico que acompanha o envelhecimento depende fundamentalmente do *stress* oxidativo [253,254].

A formação de ROS constitui o principal responsável pelo conjunto de alterações metabólicas, génicas, imunológicas e funcionais que ocorrem a nível celular. Desde logo pela activação de factores de transcrição, como a proteína 1 activadora (AP-1) e o factor de transcrição nuclear (NF-kB) [253], que actuam frequentemente em conjunto, e conduzem à libertação de várias moléculas pró-inflamatórias, tendo, por isso, um papel importante na regulação do processo inflamatório durante o envelhecimento [254]. Nas células não activadas o complexo NF-kB encontra-se no citoplasma, ligado à proteína inibitória IκB. A sua estimulação, tanto interna como externa, conduz à fosforilação da proteína inibitória IκB, que sofre ubiquinação, sendo então o NF-kB translocado para o núcleo, onde vai activar a transcrição de genes, sobretudo dos inflamatórios.

A sua regulação é no entanto influenciada tanto pelo estado redox intracelular, o que significa que acima de um certo limiar, há activação da cascata de transcrição, que ao activar os genes codificadores de moléculas pró-inflamatórias, promove a diminuição da expressão do seu inibidor  $\alpha$  (IκB $\alpha$ ). Em sentido oposto, actuariam os processos de acetilação/desacetilação [255], de que é exemplo a desacetilação pela SIRT<sub>1</sub> que dá lugar a uma inibição da actividade de transcrição.

A enzima ciclo oxigenase (COX) encontra-se activada com a idade [256], desencadeando uma síntese acrescida de prostaglandinas, contribuindo assim para a acumulação de ROS. O aumento da expressão da óxido nítrico sintetase ocorre igualmente durante o envelhecimento, promovendo o aumento dos níveis de óxido nítrico [257], o qual, através da sua interacção com as ROS, conduz à formação de peroxinitrito; este, por sua vez, induz a nitração dos resíduos de tirosina das proteínas levando à formação de depósitos de nitrotirosinas, detectados em várias doenças associadas à idade, como a DPOC, entre outras [258]. Esta nitração é ainda responsável, quer por alterações enzimáticas, quer pela instabilidade proteica [259].

## **7-Envelhecimento e Alterações Imunológicas**

Quanto às alterações do envelhecimento observadas a nível imunológico, elas compreendem, em termos gerais, o declínio significativo da imunidade adaptativa, assim como alterações profundas da imunidade inata, responsáveis pelo perfil pro-inflamatório característico - *inflamm-aging* [211, 212,213].

Os linfócitos T originários da medula óssea (a partir da *stem cell*-célula estaminal hematopoiética pluripotente) [260, 261, 262] no decurso do processo evolutivo de maturação migram para o timo. A selecção intra-tímica é fundamental na aquisição do repertório e diversidade dos receptores de superfície (TCR) característicos dos linfócitos *maduros*, representando uma etapa fundamental no funcionamento normal do sistema imunológico [262,263,264].

Sob o ponto de vista estrutural, o TCR é um heterodímero constituído por cadeias alfa e beta presentes em mais de 90% dos linfócitos T circulantes, ou gama delta [262,264].

Durante o envelhecimento estas células perdem a expressão CD28, que é uma molécula co-estimulatória fundamental na activação do TCR [268,269]. Este facto, permite explicar, em parte, as alterações qualitativas observadas, como

as diminuições da capacidade proliferativa e de produção de citocinas [270], para além da resistência à apoptose [271].

Por outro lado, a atrofia tímica [264] e a diminuição da timopoiese têm como consequência uma diminuição do *output* de células T *naive* (CD45RA<sup>+</sup>), bem como uma diminuição das suas concentrações a nível do sangue periférico e nos gânglios linfáticos [260,270]. Parece haver, portanto, um desvio na relação células T *naive*/células T memória (CD45RO<sup>+</sup>) favorável a estas últimas, destinado a manter a homeostasia das células T periféricas. Acresce ainda, que as células Th<sub>1</sub> memória derivadas de células T *naive* envelhecidas, produzem menos IL-2, o mesmo se constatando em relação às células Th<sub>2</sub>, com diminuição da produção de IL-4 e IL-5 [260]. Tais alterações podem ter influência nas interações entre as células T e B, contribuindo para as anomalias da resposta humoral com a idade [272, 273].

Esta população compreende vários subtipos funcionais: os linfócitos T auxiliares (T *helper*) que expressam CD4 [262], os citotóxicos que expressam CD8 [274] e os linfócitos reguladores (Treg) [275], que podem ser CD4 ou CD8 e são dotados da capacidade de suprimir respostas imunológicas específicas, os linfócitos  $\gamma$   $\delta$  [276,277,278] e os linfócitos NK, entre outros.

Os linfócitos TCD4 ou auxiliares reconhecem os antígenos processados pelas células apresentadoras de antígenos cooperando com as moléculas da classe II do complexo major de histocompatibilidade (MHC). Durante a activação linfocitária há eliminação das moléculas CD4 da superfície por um processo de internalização, tal como acontece com o receptor CD3 dos linfócitos T. Neste contexto é ainda possível subdividir esta população em duas subpopulações, de acordo com a expressão de CD4 [266]: uma mais numerosa, com expressão elevada de CD4 e que se mantém constante, e outra, menor, em que essa expressão se encontra diminuída. A caracterização desta última, revelou a presença de outros antígenos e em proporções diferentes da mais representativa, como: CD28, CD152, CD25, HLA-DR e Fas. O envelhecimento faz aumentar esta população, que chega a atingir cerca de 40% dos linfócitos CD4 totais. Kovaïou [268] demonstrou ainda que os

linfócitos TCD4<sup>+</sup> dos idosos não expressavam CD40L, que é essencial para a activação dos linfócitos B; este facto poderia contribuir para as alterações da imunidade humoral, particularmente a fraca produção de anticorpos após vacinação, observada nesta população [272,279].

Os linfócitos T CD8 [274,280] são células efectoras cujo papel principal inclui a destruição de células infectadas por vírus ou outros microorganismos intracelulares, células em transformação tumoral, ou ainda células que apresentem antígenos de superfície de histocompatibilidade não *self*. O reconhecimento antigénico das células alvo, é efectuado através das moléculas da classe I do MHC. São dotadas de mecanismos de destruição que envolvem o ligando Fas, a perforina e granzimas. O envelhecimento parece promover um aumento da oligoclonalidade destas células [280], com aumento das células memória e diminuição das células *naïve*. Esta circunstância tem relevância clínica, dado que a sua capacidade para responderem a um novo desafio antigénico ou a um agente patogénico não conhecido previamente, é muito reduzida [273].

Muitas das expansões clonais do sistema imune dos idosos resultam de infecções virais prévias persistentes [279]. Esta perda da diversidade e da integridade das subpopulações CD4 e CD8 poderá estar igualmente na origem da diminuição da resposta imune adaptativa nos processos de reinfecção [273]. Em relação aos linfócitos T  $\gamma\delta$  (TCR  $\gamma\delta$ ) [276,277,278,281], estes representam cerca de 1 a 10% dos linfócitos circulantes, sendo-lhes reconhecido um papel importante como primeira linha de defesa contra microorganismos invasores e na inflamação crónica. Têm grande capacidade de síntese de INF- $\gamma$ . O seu número parece estar reduzido nos idosos [276,277], apresentando ainda uma capacidade proliferativa diminuída, e uma tendência acrescida para a apoptose [281,282].

Pelo que diz respeito às células T reguladoras (Treg) identificadas inicialmente através do fenótipo-CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> e, mais recentemente identificadas como CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> continuando no entanto, a verificar-se uma forte correlação entre ambos atestada em numerosos trabalhos [275,283,284], a sua

capacidade de regulação da resposta imunológica é tão importante como a sua activação, ao limitar ou mesmo inibir os danos, que uma estimulação persistente, e de intensidade variável podem infligir tanto a nível celular, como tecidual, para além de constituírem um valioso mecanismo de tolerância. Representam, além disso, um bom exemplo da complexidade do sistema imunológico [285,286,287,288,289,290].

Sob o ponto de vista clínico têm um papel importante nos processos infecciosos, controlando e monitorizando as respostas imunes do hospedeiro prevenindo eventuais danos tecidulares, como foi demonstrado no rato com pneumonia por *Pneumocystis jirovecci* em que as Treg pareciam limitar o processo inflamatório e lesional pulmonares [291]. No entanto, um controlo excessivo das respostas imunes pode resultar, num contexto infeccioso, na sobrevivência do agente patogénico, ou até na sua persistência, como é o caso da tripanosomíase, em que a produção de IL-10 pelas Treg, ao condicionar os efeitos da resposta imune ao agente patogénico, favorece a sua persistência [292]. No âmbito da resposta anti-tumoral, o efeito supressor exercido pelas Treg sobre as células da mucosa gástrica infectadas pelo *Helicobacter pylori* impede a resposta de células efectoras específicas, suprimindo, quer as respostas antibacterianas, quer anti-tumorais, permitindo a persistência do agente infeccioso e o eventual desenvolvimento do adenocarcinoma gástrico [293].

Durante o envelhecimento assiste-se, como já foi referido, a um declínio funcional das células T, o que poderá explicar o aumento do risco de infecções graves, e igualmente, a fraca resposta à vacinação. Por outro lado, a reactivação e/ou a persistência das infecções é também frequente nesta população. Nestas circunstâncias, vários autores têm demonstrado a presença em modelos animais envelhecidos, de uma acumulação de células T reguladoras, quando comparadas com animais jovens [294]. Esta situação seria igualmente responsável pela atenuação das respostas anti-tumorais [295,296].

Os linfócitos B formados na medula óssea e no fígado fetal, expressam na

superfície o *B cell Receptor* (BCR) que inclui uma imunoglobulina através da qual se liga a antigénios, e que é importante na sua diferenciação em plasmócito produtor de anticorpos. As interacções com as células T fazem-se através dos linfócitos CD4. Estas células, que no estado maduro apresentam vários marcadores de superfície, tendem a diminuir no sangue periférico com a idade, contrariamente ao que acontece com os níveis de imunoglobulinas [297,298].

Segundo Hasler [270], apesar de se verificar um declínio em muitas funções essenciais do sistema imunológico no idoso, as doenças autoimunes poderão estar aumentadas. Ainda segundo o mesmo autor, esta maior susceptibilidade aos fenómenos de autoimunidade poderia assentar nos seguintes factores: atraso na *clearance* de autoantigénios, alterações das barreiras anatómicas ou, ainda, nas modificações pós-translacionais das proteínas. Já para Boren [299], as alterações no número, proporção, sinalização e função dos linfócitos estariam na base da incapacidade em distinguir as estruturas *self* de antigénios estranhos.

Quanto à imunidade inata, esta constitui a primeira linha de defesa do organismo face à agressão por agentes patogénicos e é representada fundamentalmente pela resposta imunológica inicial em que se encontram envolvidos os monócitos/macrófagos, os polimorfonucleares neutrófilos, as células NK e as células dendríticas (DCs). Também esta vertente imunológica é afectada pelo envelhecimento, e tem sido alvo de um interesse crescente, na perspectiva de um conhecimento mais profundo dos fenómenos da imunosenescência, que venha a permitir uma eventual reactivação funcional, que melhore a resposta aos agentes infecciosos nos idosos. É aliás neste âmbito, que se inscrevem os estudos mais recentes, dos quais salientamos os de Solana [213], e que referiremos, embora sumariamente, alguns dos aspectos mais relevantes.

Assim, no sistema monocítico-macrofágico, a população celular não é homogénea, reconhecendo-se a existência de diferentes subpopulações de monócitos. Estas células identificadas através da expressão de CD14 e CD16,

apresentam receptores de superfície e funções distintas, de que são exemplos os CD14 (high) CD16<sup>-</sup> que expressam os receptores de superfície CD62L, CD64 e CCR2, e a subpopulação CD14 (low) CD16<sup>+</sup> que apresenta uma expressão elevada de CX3CR1, e é considerada pró-inflamatória, dada a produção de grandes quantidades de TNF- $\alpha$  em resposta à estimulação dos TLR2 e TLR4. É aliás, esta subpopulação, que aumenta com o envelhecimento. Também em relação aos macrófagos, que constituem a primeira linha de defesa a nível tecidual, existe heterogeneidade sob o ponto de vista funcional: a polarização M1 (activação clássica) ou M2 (activação alternativa) reflectem as interacções mútuas com os linfócitos, determinando tanto as respostas Th1 a partir da polarização M1 via IFN- $\gamma$ , como as Th2 através da polarização M2 e das interleucinas IL-4 e IL-13.

As principais alterações funcionais detectadas nestas células durante o envelhecimento incluem: a redução tanto da fagocitose como da produção de radicais oxidantes, a diminuição da capacidade de apresentação antigénica, as alterações na expressão e função dos *Toll-Like Receptors* (TLRs), com aumento de uns, enquanto que outros se apresentam funcionalmente diminuídos, devido a alterações nas vias de activação desses receptores. Globalmente, estas anomalias podem contribuir para uma maior susceptibilidade às infecções. Uma outra função do sistema monocítico-macrofágico que se encontra comprometida diz respeito à remoção das células apoptóticas mediada pelos *Pattern Recognition Receptors* (PRRs). Ora, a persistência dessas células apoptóticas contribui para o estado pro-inflamatório e para a manutenção do *inflamm-aging*. Os macrófagos, durante o envelhecimento, apresentam uma redução da secreção do TNF- $\alpha$ , que constitui uma citocina chave, necessária à manutenção da integridade da medula óssea e à produção de outras citocinas: IL6, IL-11, factores de crescimento (M-CSF, GM-CSF) e receptores de activação como o NF- $\kappa$ B [260,300].

No seu conjunto, existem dados que evidenciam que a maior parte das funções do sistema monocítico-macrofágico se encontram alteradas com o

envelhecimento, tanto através de uma remoção pouco eficiente dos agentes infecciosos como por uma desregulação do próprio processo inflamatório, e consequentemente, da ulterior iniciação da resposta imune adaptativa, da qual resulta a inflamação crónica e o aumento das doenças associadas à idade, como as infecções, as doenças cardiovasculares e o cancro.

O sistema inato tem a capacidade de detectar vários padrões moleculares patogénicos - *Pathogen Associated Molecular Patterns* (PAMPs) - [301, 302,303] através de um conjunto de receptores de reconhecimento (PRRs) que incluem a detecção de lípidos, lipoproteínas, proteínas e ácidos nucleicos. Estes receptores estão representados nos mamíferos pela família dos *Toll-like Receptors*, constituídos por proteínas membranares de tipo I, caracterizadas por ectodomínios ricos em repetições de leucina que reconhecem os PAMP, e cujo citoplasma possui um domínio homólogo ao do citoplasma do receptor da IL-1, necessário à sua activação. Esses receptores encontram-se expressos nas células apresentadoras de antígenos, como os macrófagos e as células dendríticas, as quais desempenham neste contexto, não só um papel fundamental na indução da resposta inata, como igualmente, no desenvolvimento subsequente da resposta imune adaptativa. O reconhecimento dos PAMPs pelos PRRs activa as vias de sinalização intracelular que conduzem à indução de citocinas inflamatórias, quimiocinas, interferões e ao aumento da expressão de moléculas co-estimulatórias. Reconhecem-se nos seres humanos 11 TLRs, sabendo-se que cada um deles identifica PAMPs distintos de vários agentes patogénicos, o que permite a sua classificação em vários grupos: os TLR1, 2,4 e 6 reconhecem lípidos; o TLR4 o lipopolissacarídeo (LPS) de bactérias Gram<sup>-</sup>; o TLR5 e 11 os ligandos proteicos, (como por exemplo a flagelina bacteriana a nível intestinal) e os TLRs 3 7 e 9 que têm uma localização intracelular, e detectam ácidos nucleicos de vírus ou bactérias [301]. Com o envelhecimento, tanto a expressão como a função dos TLRs encontram-se diminuídas [260,303], acarretando um aumento dos processos infecciosos nesta população.

Em relação aos polimorfonucleares neutrófilos são igualmente representados

por uma população heterogénea, existindo subpopulações em diferentes estádios de activação, que podem determinar a duração, a intensidade, e o tipo de resposta inflamatória. Quanto às alterações quantitativas destas células, embora não haja consenso, não parecem ocorrer no envelhecimento saudável; pelo contrário, a neutrofilia tem sido associada ao aumento do risco de mortalidade. O envelhecimento promove várias alterações funcionais nestas células embora nem todas se verifiquem no mesmo sentido, ou em proporções semelhantes, como a fagocitose, a quimiotaxia e a destruição intracelular de agentes infecciosos através da produção de radicais livres. A adesão encontra-se conservada. A capacidade fagocitária está diminuída [304], (de que são exemplo os casos da fagocitose da *Escherichia coli* e do *Staphylococcus aureus* e /ou do pneumococo) devido à redução na expressão de receptores de superfície- Fcγ do CD16, contribuindo para o aumento destas infecções nos idosos. Também a destruição intracelular de agentes patogénicos através da produção de radicais livres se encontra comprometida. Com a idade, estas células evidenciam um aumento da apoptose, quer espontânea quer induzida. Os neutrófilos possuem receptores que são importantes na mediação de várias funções (MLP, Fcγ e C3b) muitas das quais se encontram alteradas com a idade, sobretudo por anomalias nas suas vias de activação, entre elas uma das mais afectadas, é a via das MAP cinases (a Jak/STAT e a PI3K-Akt). De facto, estas perturbações não estão relacionadas com a diminuição do número de receptores, mas com alterações na composição da membrana, incluindo os microdomínios designados *lipid rafts*; a integridade destes, é necessária para a ligação da NADPH oxidase, bem como o recrutamento de moléculas que assegurem uma sinalização adequada através dos receptores. Outros receptores envolvidos na activação dos neutrófilos são os PRRs que reconhecem os PAMPs. Têm um papel essencial em muitas funções celulares, permitindo às células discriminarem entre *self* e *non-self* infeccioso, e actuando ainda como sensores de perigo, uma vez que alertam o organismo da agressão microbiana, assim como da presença de células transformadas ou lesadas.

O número de receptores nos neutrófilos não sofre alterações substanciais com a idade; no entanto, verificam-se anomalias significativas na sinalização das moléculas dentro e fora dos *lipid rafts* bem como alterações na activação dos TLRs, de entre os quais se destacam os TLR4 e TLR7, que estão envolvidos na activação da macroautofagia. Esta representa um meio de destruição de agentes patogénicos intracelulares (bactérias, vírus e parasitas) e encontra-se comprometida com a idade, circunstância que associada à activação defeituosa dos TLRs, pode efectivamente favorecer o aumento da frequência das infecções observadas neste grupo etário.

Os neutrófilos libertam substâncias anti-microbianas constituídas por cromatina e agentes microbicidas capazes de ligar bactérias Gram<sup>+</sup> e Gram<sup>-</sup>, embora o processo exacto da sua formação não esteja completamente esclarecido, e se desconheça se esta função se encontra ou não preservada com a idade; no entanto, como são fundamentalmente inflamatórias, é possível que a sua actividade se encontre aumentada e contribua, para o estado pro-inflamatório associado ao envelhecimento.

A interacção entre os neutrófilos com outras células que participam na resposta imunológica é fundamental na destruição de agentes agressores, nomeadamente com os macrófagos e as células dendríticas. Em relação a estas últimas, os polimorfonucleares neutrófilos não só lhes fornecem os agentes patogénicos como libertam alarminas, que contribuem para a maturação das células dendríticas imaturas e para o seu recrutamento em direcção aos locais de inflamação através do TLR4, e do TNF- $\alpha$ . Por outro lado, a constatação da diminuição sérica da alarina humana catelicidina (LL37) com a idade, sugere que as alterações dos neutrófilos com o envelhecimento possam ser responsáveis por uma activação anormal das células dendríticas, de que resultaria uma diminuição das respostas Th1.

As células NK representam 10-15% dos linfócitos do sangue periférico. Participam nas fases iniciais de defesa contra agentes patogénicos intracelulares e células tumorais. São células citotóxicas (não T), caracterizadas pela expressão de CD56 e/ou CD16. Expressam

preferencialmente receptores de activação como os receptores de citotoxicidade natural (NCRs): NKp46, NKp30, NKp44 e os receptores inibitórios específicos da classe I do MHC, tais como os - *Killer Immunoglobulin-like Receptors* (KIR) e da família da lectina C (CD94/NKG2). Outros receptores de activação como o NK2G2D e o DNAM-1, encontram-se largamente expressos nos linfócitos T CD8 humanos.

As células NK humanas são classicamente subdivididas em duas subpopulações com base na sua densidade de superfície em CD56: *CD56 bright Immunoregulatory Cells* e as *CD56 dim Cytotoxic Cells*. As *CD56 bright* são uma das principais fontes de citocinas imunoregulatórias deste grupo celular. Quanto às *CD56 dim* constituem a maioria (90%) das células NK circulantes, expressam altos níveis de CD16 e são consideradas células efectoras maduras citotóxicas, embora também possam produzir, sob estimulação, grandes quantidades de IFN- $\gamma$ . Um terceiro subgrupo de células NK que tem sido definido como  $CD56^-CD16^+$  NK e que representa apenas uma pequena percentagem das células NK em circulação nos indivíduos normais, encontra-se muito expandida nas infecções virusais crónicas (VIH, hepatite C, etc.). A sobrevivência das células maduras é citocino-dependente da IL-15, que parece exercer esse efeito através do factor anti-apoptótico Bcl-2 [305].

Embora se desconheçam ainda quais os factores que presidem ao desenvolvimento deste grupo celular, existem evidências que confirmam que a subpopulação *CD56 bright* representa um estadio de desenvolvimento mais precoce e imaturo, em relação ao da subpopulação *CD56 dim*. Parece que o número de células NK se mantém constante através de um processo de diferenciação contínuo associado à expressão de CD57. As células NK CD57 evidenciam um aumento da resposta às células alvo e respostas diminuídas às citocinas, são células maduras, que possuem grande capacidade citotóxica e uma grande sensibilidade à estimulação através do CD16. Parece ocorrer, portanto, em termos funcionais de diferenciação, uma mudança gradual do fenótipo *CD56 bright* via  $CD56^-CD57^-$  para as  $CD56^-CD57^+$ .

O envelhecimento saudável acompanha-se por um aumento quer absoluto

quer percentual das células NK, associado a uma diminuição da subpopulação CD56 *bright* e a uma expansão das células CD56 *dim*. Esta distribuição celular sugere que o aumento das células NK com a idade se deve sobretudo, à expansão das células maduras CD56 *dim*. Por outro lado, observa-se um aumento da expressão de CD57 nas células NK CD56<sup>dim</sup> e nos linfócitos CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>, diminuindo-lhes a capacidade de resposta citocínica, mas conferindo-lhes uma alta capacidade citolítica. O declínio das células CD56 *bright* e o aumento das CD56 *dim* CD57<sup>+</sup>, sugere que as células NK sofrem um processo de *remodeling*, em que há uma redução do *output* de células mais imaturas (CD56 *bright*) e a acumulação das células CD56 *dim* CD57<sup>+</sup> altamente diferenciadas. Esta circunstância pode explicar algumas das alterações fenotípicas e funcionais das células NK nos idosos, como a alteração na expressão de alguns receptores, a resposta proliferativa diminuída às citocinas e a preservação da capacidade citotóxica, mediada pelo CD16. A idade não afecta significativamente a capacidade citotóxica das células NK, alguma deficiência nesta actividade, pode estar relacionada com a expressão ou funcionalidade de alguns receptores que podem ser atingidos pelo envelhecimento. Não é no entanto o caso do CD16, que é o receptor de baixa afinidade da Ig G (Fcγ RIII-A). A sua ligação activa a via PI3K e induz a libertação de grânulos citotóxicos, conduzindo à citotoxicidade dependente de anticorpos (ADCC). Pelo contrário, a expressão de alguns receptores naturais de citotoxicidade das células NK como o NKp30, e o NKp46 encontram-se diminuídos nos idosos, ao inverso do observado nos adultos jovens (fenótipo NCR *bright*), somente uma pequena percentagem expressa baixos níveis de ambos os receptores (fenótipo NCR *dull*) ou ainda, uma expressão discordante (fenótipo NCR discordante). Na população idosa um grupo significativo apresenta os fenótipos NCR *dull* ou NCR discordantes. Atendendo a que ambos os receptores se encontram envolvidos no reconhecimento e na destruição de células alvo, as alterações acima referidas, poderão ser responsáveis pela diminuição da citotoxicidade. O receptor NKp30 tem ainda um papel regulador na mediação da interacção entre as células NK e as células

dendríticas. Esta interacção é muito importante e dela pode resultar tanto um efeito citopático directo, com morte de células dendríticas imaturas, como a secreção de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  necessários à sua maturação. Por outro lado, a activação das células dendríticas liberta citocinas do perfil Th1 que amplificam a activação das células NK.

Relativamente a outros receptores, como os de inibição específica os - *Killer Immunoglobulin - like Receptors* (KIR), os resultados não são consensuais, e estendem-se desde a ausência de alterações, até ao aumento da sua expressão na população mais idosa.

No seu conjunto estas alterações têm relevância clínica, dado que uma actividade normal das células NK é um requisito fundamental para a manutenção da saúde e da longevidade [306]; em contrapartida, o seu declínio ou perda da funcionalidade, podem explicar a elevada incidência de infecções virais e bacterianas [279].

As células dendríticas são fundamentalmente células apresentadoras de antígeno *profissionais*. Existem vários tipos de DCs: as plasmocitóides (pDCs), as mielóides (mDCs), e uma nova população semelhante às DCs murinas, que expressa níveis elevados do antígeno 3 das DCs do sangue (BDCA3), que são activadas por agonistas do TLR8 e produzem IL-12 em resposta aos estímulos inatos e aos derivados das células T.

As primeiras têm um papel importante na defesa do hospedeiro contra agentes patogénicos, particularmente virais, através da produção dos interferões (IFN) I e III; promovem ainda a activação das células NK, que amplificam a resposta do hospedeiro, e estão envolvidas na apresentação antigénica aos linfócitos TCD4 e TCD8. Os receptores TLR7 e TLR9 são importantes na activação destas células, promovendo a secreção de IFN I e III através da via *Interferon Regulatory Factor* (IRF). As mDCs são fundamentais na apresentação antigénica aos linfócitos T, expressam TLRs e lectinas do tipo C na detecção de antígenos, incluindo os vírus. Produzem IL-12, IL-15 e IL-18. A IL-12 é essencial na indução de respostas Th1. Para além da apresentação antigénica, estas células fornecem ainda sinais co-estimulatórios e citocinas para uma

correcta activação dos linfócitos T, que sofrem diferenciação e proliferação.

O envelhecimento parece afectar estas células quer sob o ponto de vista quantitativo, quer funcional. Em relação ao primeiro aspecto, poderá ocorrer uma diminuição do número de mDCs bem como das células precursoras CD34+, enquanto que as pDCs se mantêm inalteradas. Relativamente aos aspectos funcionais, as mDCs apresentam alterações da endocitose, da quimiotaxia e da produção de IL-12, assim como uma capacidade deficiente de activação dos linfócitos TCD4<sup>+</sup> *naive*, tanto através de uma marcada redução no processamento antigénico, como de uma diminuição na activação dos TLRs. Do conjunto destas anomalias, resulta uma activação do factor de transcrição nuclear NFkB, com o conseqüente aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias, que ao tornar-se excessivo, compromete seriamente a resposta às infecções virusais nos idosos.

As pDCs estão sujeitas sobretudo a alterações funcionais das quais se destacam: a diminuição da produção dos interferões I e III após estimulação dos TLRs e a redução significativa da capacidade de apresentação antigénica aos linfócitos T. Mantêm contudo, a capacidade de produção de citocinas pró-inflamatórias e activação dos linfócitos TCD8, assim como de estimulação da secreção de IL-17, que promove o recrutamento de neutrófilos.

Em conclusão, o envelhecimento acompanha-se de um aumento da morbidade e mortalidade devida às infecções, agravada pela incapacidade de gerar respostas imunológicas protectoras robustas. Predispõe ainda ao desenvolvimento de doenças neoplásicas e autoimunes.

Estas conseqüências devem-se à imunosenescência associada à desregulação e à deterioração funcional do sistema imunológico. Tanto a imunidade adaptativa como a inata são pesadamente afectadas pelo processo de envelhecimento, conduzindo ao paradoxo da existência de uma inflamação crónica ligada ao declínio da resposta imunológica.

A DPOC tem uma evolução lenta, pelo que são os indivíduos de meia idade ou mais idosos os principais atingidos [307]. Por outro lado, o envelhecimento

caracteriza-se por um declínio da homeostasia, pela falência dos mecanismos de reparação consecutivos à acção de múltiplos factores: genéticos, ambientais e defeitos orgânicos intrínsecos, através dos quais se acumulam ao longo da vida as lesões moleculares responsáveis pelo processo inflamatório, pelas lesões do DNA e pelo encurtamento dos telómeros, numa luta constante contra o *stress* oxidativo.

Existem semelhanças entre o envelhecimento e o enfisema pulmonar, na medida em que também neste se assiste a uma incapacidade quer na manutenção estrutural pulmonar quer nos processos de reparação.

Funcionalmente, muitas das alterações que caracterizam o pulmão do idoso, estão presentes igualmente no pulmão atingido pela DPOC, embora neste último, a queda dos débitos aéreos seja bastante mais acelerada.

Pelo que diz respeito à inflamação, presente no envelhecimento e na DPOC Fig.3, em ambos os casos se assiste à acumulação de neutrófilos e à activação de factores de transcrição nucleares responsáveis pela produção exagerada de citocinas pro-inflamatórias, como a IL-6, a IL-8, o TNF- $\alpha$ , etc. A nível molecular demonstrou-se ainda no pulmão afectado pela DPOC, particularmente no enfisematoso, a presença de telómeros substancialmente mais curtos nas células alveolares e endoteliais [308] em comparação com os identificados nas mesmas células, em indivíduos não fumadores. Resultados idênticos foram obtidos a nível do sangue periférico em relação às células mononucleares [309] dos doentes. De facto, o *stress* oxidativo ocupa um lugar central, quer no processo fisiológico do envelhecimento, quer na patogenia da DPOC [310] Fig.3, como demonstram os vários marcadores oxidativos identificados, tanto a nível local como sistémico, nos portadores de doença.

## ENVELHECIMENTO E DPOC

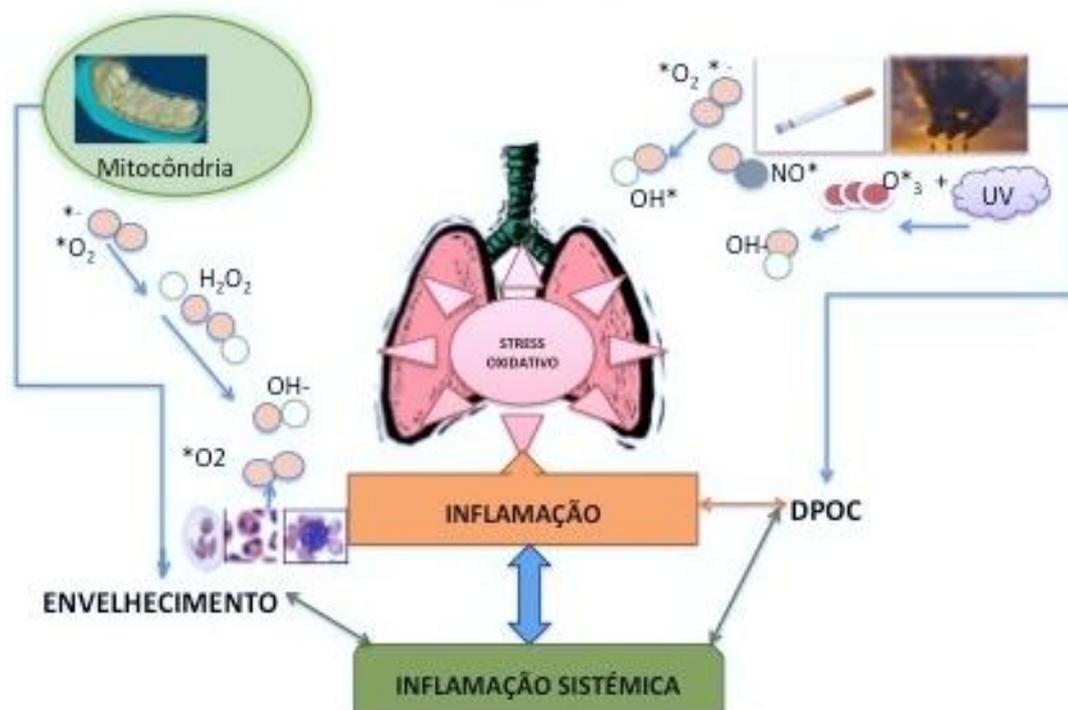


Fig.3-Envolvimento do Envelhecimento no contexto da DPOC

As lesões do DNA constituem um factor de risco de carcinogénese, o qual não só está presente, como aumentado, nos portadores da afecção.

A capacidade antioxidante está diminuída nas duas situações consideradas, sendo reconhecida a diminuição da actividade da superóxido dismutase nos fumadores crónicos e na DPOC estável, em comparação com os indivíduos saudáveis não fumadores [311].

Também no âmbito das moléculas com capacidade anti-envelhecimento se demonstrou a diminuição da SIRT1 no tecido pulmonar e nas células mononucleares do sangue nos portadores de DPOC [312]. Além disso, esta molécula possui ainda uma capacidade reguladora inibitória sobre a metaloproteinase-9, o que pode explicar as alterações estruturais pulmonares, nomeadamente as lesões enfisematosas consecutivas à diminuição local dos seus níveis. Ainda neste contexto, a marcada redução da expressão da HDAC-2 na DPOC [313] contribui para a amplificação do processo inflamatório e para a relativa insensibilidade aos corticosteróides, situação igualmente detectada

no envelhecimento [314,315].

Estas têm sido as bases defendidas por aqueles que consideram o pulmão da DPOC como o exemplo de um envelhecimento acelerado. Na verdade, em ambos os processos há a participação central do *stress* oxidativo, ao qual o organismo reage com uma resposta inflamatória, quer local quer sistémica, modulando, porventura, tanto as características da afecção e das suas manifestações sistémicas, como o próprio envelhecimento, impondo-lhe todo um conjunto de desafios para os quais o organismo apenas dispõe de um número bastante mais limitado de respostas.

## CAPÍTULO V

### **O TABACO NO CONTEXTO DA DPOC**

Um aspecto central da DPOC no contexto das suas manifestações sistémicas extra-respiratórias e/ou comorbilidades prende-se com a presença da inflamação sistémica coexistente, quer nos indivíduos com DPOC estável, quer ligada ao processo fisiológico do envelhecimento, e, ainda, como consequência do consumo de tabaco, o qual é reconhecidamente o principal factor etiopatogénico da doença.

Em termos epidemiológicos, o consumo de tabaco continua a crescer nos países em desenvolvimento [316], especialmente no sexo masculino, ultrapassando os países industrializados nos quais a prevalência tem vindo a diminuir, mantendo-se no entanto elevada entre os jovens e as mulheres.

Segundo dados da OMS, de 2012, em termos globais o tabaco foi responsável por 5 milhões de mortes/ano [317], com taxas mais elevadas na Europa e nas Américas (16%), calculando-se que por volta de 2025 aquele valor venha a atingir os 8 milhões, 80% dos quais nos países mais pobres. Cerca de 12% da totalidade das mortes em adultos de 30 ou mais anos são atribuídas ao

consumo tabágico. No âmbito das doenças sem declaração obrigatória o tabaco é responsável por 10% de todas as mortes por doenças cardiovasculares, 22% dos cancros e 36% das doenças do aparelho respiratório; nestas últimas, são-lhe atribuídos 71% dos cancros do pulmão e 42% dos casos de DPOC [317].

Em Portugal, e segundo a mesma fonte [317], a taxa de mortalidade atribuída ao tabaco em 2004 foi de 17% nos homens e 3% nas mulheres (na população acima dos 30 anos de idade). Já a mortalidade na faixa etária dos 45 aos 59 anos a ele associada foi de: 25,3% por infecções respiratórias inferiores; 41,1% por doenças cardiovasculares; e 81,1% por cancro (traqueia, brônquio, pulmão).

A magnitude desta epidemia global desencadeou na comunidade internacional liderada pela OMS uma resposta da qual resultaria o primeiro tratado de saúde global, ratificado por 167 países em 2008, e o documento *WHO Framework Convention on Tobacco Control*, contendo recomendações que permitiriam o desenvolvimento de medidas efectivas no controlo da epidemia [316,317,318].

Entretanto, à medida que as consequências do tabaco na saúde humana foram sendo identificadas, particularmente o seu impacto nefasto sobre o aparelho respiratório, viriam a ser coligidos dados cada vez mais consistentes que apontavam igualmente para uma toxicidade extrapulmonar, através da sua relação e efeitos potencialmente negativos em várias doenças sistémicas (DPOC, aterosclerose, doenças cardiovasculares, cancro, etc.). Na verdade, enquanto que no aparelho respiratório, principal órgão alvo, as relações causa-efeito podem ser demonstradas de uma forma directa, já os mecanismos através dos quais o tabaco determina ou amplifica os efeitos sistémicos é bastante mais complexo.

O tabaco contém mais de 4700 compostos químicos [319] e é uma poderosa fonte de radicais livres e de outros agentes oxidantes, quer na fase gasosa, quer na condensada. Calcula-se que o fumo do cigarro contenha aproximadamente  $10^{15}$  moléculas oxidantes por *puff*, 500-1000 partes por milhão de óxido nítrico (NO) por *puff* e a pirrólise gera mais de três mil

compostos aromáticos, quinonas, semi-quinonas, ferro e óxidos de nitrogénio derivados dos nitratos, entre outros [320,321]. A natureza das *Espécies Reactivas de Oxigénio* (ROS) do fumo do cigarro varia entre os oxidantes de semi-vida curta, como o radical superóxido ( $O_2^-$ ) e o óxido nítrico (NO), e os radicais orgânicos de semi-vida longa, entre os quais se contam as semiquinonas, que sofrem um processo redox no fluido epitelial (ELF) das vias aéreas dos fumadores por períodos de tempo prolongados, uma vez que o condensado do tabaco que se forma no ELF se liga ao ferro, formando complexos (semiquinona+ $Fe^{2+}$ ) susceptíveis de produzir, de forma continuada, peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ) [322,323].

Num contexto mais amplo o tabaco produz ROS e espécies reactivas de nitrogénio (RNS) consideradas de origem ambiental ou exógenas, como o ozono, o dióxido de nitrogénio, o dióxido sulfúrico e o material particulado de dimensões inferiores a 10  $\mu m$  dos fumos de combustão, que não só podem formar ROS *in situ*, como espécies reactivas de oxigénio endógenas, estas produzidas enzimaticamente pelas células inflamatórias e epiteliais pulmonares no contexto da resposta imuno-inflamatória consecutiva à agressão por agentes nocivos, no caso vertente pelo tabaco [324].

Em condições fisiológicas assiste-se igualmente à formação de ROS intracelulares resultantes das reacções metabólicas normais que incluem o transporte de electrões durante a respiração mitocondrial, bem como através dos sistemas NADPH oxidase e xantina/xantina oxidase, geradores de quantidades substanciais do anião superóxido [325].

O pulmão, pelas suas características anatomo-fisiológicas, ocupa neste contexto uma situação muito particular, constituindo uma interface de grande superfície exposta ao meio externo, rico em oxigénio e em agentes potencialmente agressores, e ao meio interno através da circulação sanguínea, o que aumenta a sua vulnerabilidade às agressões, particularmente ao stress oxidativo.

Na verdade, se os efeitos do tabaco a nível pulmonar se encontram intimamente ligados à patogenia da DPOC, quer pelo excesso oxidativo [325]

condicionador dos mecanismos moleculares envolvidos na expressão génica pró-inflamatória, quer pela relação entre a extensão da história tabágica e a gravidade da obstrução das vias aéreas, não é menos verdadeira a constatação de que em relação aos seus efeitos se assiste a uma enorme variabilidade individual [326,327,328]. A corroborar este facto salienta-se o trabalho fundamental de Fletcher e Peto [329], o qual demonstrou que a média do declínio do volume expiratório máximo no primeiro segundo (FEV<sub>1</sub>) era mais rápido nos fumadores (60mL/ano) do que nos não fumadores (30 mL/ano), sendo essa queda superior a 60mL/ ano nos fumadores atingidos pela DPOC. É no entanto consensual a circunstância de que só 15 a 20% dos fumadores desenvolvem doença. As razões desta susceptibilidade não se encontram completamente esclarecidas; no entanto, o desequilíbrio entre a carga oxidativa e os antioxidantes tem vindo a ser considerado um aspecto fundamental na patogenia da DPOC, que pode estar relacionado com a susceptibilidade aos efeitos oxidativos do tabaco e consequentemente à resposta inflamatória que desencadeia [330,331].

Em termos sistémicos, a pesquisa dos efeitos do tabaco compreende metodologias diferentes na abordagem do stress oxidativo. Assim, este tanto pode ser evidenciado através da determinação directa da carga oxidativa presente nas células do sangue periférico como pela apreciação pontual dos seus efeitos em células ou moléculas alvo ou, ainda, por uma avaliação mais global das respostas do organismo à agressão oxidativa [325].

## **1- Exposição Crónica ao Tabaco**

Quanto aos efeitos do consumo crónico do tabaco relacionado com o *stress* oxidativo, vários estudos [332,333] têm assinalado nos fumadores e nos doentes portadores de DPOC o aumento dos níveis séricos da 8-iso-prostaglandina F<sub>2</sub> (PGF<sub>2α</sub>), uma elevação significativa da sua excreção urinária [332], assim como um aumento importante no condensado do ar exalado [334,335], tendo Reilly [336] detectado uma relação dose-resposta entre o

número de cigarros consumidos e as concentrações urinárias de cotinina e 8-epi-PGF<sub>2α</sub>. Com efeito, as ROS induzem a peroxidação lipídica [337,338] através da oxidação dos ácidos gordos polinsaturados das membranas celulares, com acumulação dos seus produtos, como: F<sub>2</sub>-isoprostanos, malondialdeído, 4-hidroxi-2-nonenal (4HE) e acroleína. Sob o ponto de vista químico, trata-se de uma reacção em cadeia, geradora de várias moléculas de hidroperóxidos lipídicos, que alteram funcionalmente a membrana celular, promovendo a inactivação dos receptores das enzimas e o aumento da sua permeabilidade [339]. Os F<sub>2</sub>-isoprostanos resultam da peroxidação lipídica não enzimática do ácido araquidónico [338], são inicialmente formados por oxidação e posteriormente, libertados pela acção das fosfolipases actuando através de receptores específicos das prostaglandinas. São produtos estáveis que circulam no plasma e têm excreção urinária [337]. Um dos membros desta família, o 8-isoprostano, é conhecido pela sua capacidade de constrição do músculo liso através da activação do receptor tromboxano A<sub>2</sub>, e pelo seu poder mitogénico [338]. *In vitro* estes compostos parecem ter ainda uma actividade moduladora sobre as plaquetas [333,340,341]. Aliás, têm sido encontradas concentrações elevadas deste produto nas placas ateroscleróticas, sugerindo um potencial papel no desenvolvimento destas [342]. Tal constatação apoia-se ainda na elevação da sua concentração urinária nos doentes portadores de patologia coronária, pelo que representam um marcador do risco de doença cardiovascular [343,344].

Outro dos produtos da peroxidação lipídica induzida pelo *stress* oxidativo é o aldeído, 4-hidroxi-2-nonenal (4HNE). Trata-se de um poderoso agente alquilante muito difusível, que pode reagir com o DNA e com proteínas [345, 346]. Com efeito, os níveis de proteínas modificadas encontram-se elevados nas vias aéreas, nas células epiteliais alveolares e endoteliais, assim como nos neutrófilos e macrófagos dos doentes com DPOC [347].

A determinação dos níveis séricos das substâncias reactivas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) demonstra que estas se encontram substancialmente mais elevadas nos fumadores, em relação àqueles que nunca fumaram,

existindo uma correlação negativa entre os níveis séricos e os valores do FEV<sub>1</sub> [348]. Esta ligação entre o stress oxidativo sistémico e a função pulmonar foi extensamente analisada num estudo de Ochs-Balcom [348], que demonstrou, nos homens, a presença de uma associação negativa entre os valores séricos da TBARS e as percentagens previstas do FEV<sub>1</sub> e da capacidade vital forçada (FVC), não se tendo verificado no entanto, essas associações no sexo feminino.

O fumo do cigarro é ainda responsável pelo aumento da formação de espécies reactivas de nitrogénio (RNS), os quais podem desencadear a nitração e a oxidação das proteínas plasmáticas [349], como o fibrinogénio, com conseqüente elevação das suas concentrações nos fumadores, comparativamente aos não fumadores. Por outro lado, os aldeídos, abundantes no fumo do cigarro, entre os quais se conta a acroleína e o acetaldeído, entre outros, reagem com o grupo sulfidril (SH) e NH<sub>2</sub> das proteínas levando à formação de ligações proteína-aldeído susceptíveis de converter a tirosina em 3-nitrotirosina e ditirosina, as quais se apresentam elevadas nos fumadores crónicos [350]. Tanto o óxido nítrico (NO), como o peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>), medeiam a formação de 3-nitrotirosina, tendo-se demonstrado a sua actividade no plasma dos fumadores [350].

Num estudo recente de Eleni [351], destinado à avaliação das lesões do DNA induzidas pelo *stress* oxidativo através do marcador 8-hidroxi-2-desoxiguanosina (8OHdG) e da presença de instabilidade microssatélite (MSI), como marcador das mutações somáticas, pôde-se verificar que nos fumadores sem DPOC os níveis séricos do 8OHdG se encontravam aumentados em relação aos doentes com DPOC MSI negativos, mas os portadores de DPOC MSI positivos apresentavam níveis séricos de 8OHdG significativamente aumentados em relação aos DPOC MSI negativos, ainda que sem diferenças estatísticas em relação aos fumadores sem DPOC. De facto só em 38% dos doentes com DPOC foram reconhecidas anomalias genéticas, tendo o autor concluído que esta disparidade de resultados poderia reflectir, tanto diferenças no *stress* oxidativo, como resultar de alterações na vertente antioxidante e/ ou

na capacidade de reparação nos doentes com DPOC.

Ainda neste contexto salienta-se a demonstração, por vários autores [352,353], do significativo encurtamento dos telómeros induzido pelo fumo do cigarro e da existência de uma relação dose-resposta entre a exposição tabágica cumulativa e as alterações daqueles nos linfócitos circulantes, enquanto que outros autores [354] procuraram correlacionar a disfunção dos telómeros e a senescência das células alveolares e endoteliais pulmonares com a persistência da inflamação na DPOC, tendo evidenciado no modelo animal, igualmente, o aumento da produção de citocinas associado a essa alteração [354].

O consumo crónico de tabaco reduz os níveis plasmáticos de antioxidantes. Com efeito, a capacidade total antioxidante equivalente Trolox (TEAC) encontra-se significativamente diminuída nos fumadores em relação aos não fumadores [355].

Pelo que diz respeito ao sistema antioxidante não enzimático, que inclui compostos de baixo peso molecular que actuam directamente sobre os radicais oxidantes e são consumidos durante o processo (tocoferóis, carotenóides, flavonóides, ascorbato, uratos etc.), apresenta redução dos seus níveis plasmáticos nos fumadores [356,357]. Há assim evidência de uma relação inversa entre o consumo tabágico e a diminuição da concentração da vitamina C e do  $\beta$ -caroteno [358,359].

Estas alterações condicionam, por isso, perturbações do equilíbrio dos sistemas oxidante/antioxidante dos fumadores, que como tem sido demonstrado apenas são passíveis de uma correcção parcial pelos suplementos dietéticos, como ficou demonstrado num estudo recente efectuado em portadores de DPOC no qual uma dieta rica em vegetais frescos e fruta não teve impacto significativo no *stress* oxidativo local e sistémico nestes doentes [360].

No âmbito do sistema antioxidante, a glutathiona (GSH) desempenha um papel importante na eliminação dos produtos da peroxidação lipídica e na manutenção funcional das vitaminas C e E. A exposição ao tabaco diminui os

seus níveis plasmáticos através da respectiva transformação na forma dissulfídica, ou seja, em glutathione oxidada [361].

O consumo tabágico crónico parece, assim, reflectir-se em diversas áreas sistémicas, expressando-se através da elevação do nível dos produtos da peroxidação lipídica (isoprostanos e TBARS), acompanhado por uma redução da capacidade antioxidante.

## **2-Tabaco e Inflamação Sistémica**

A exposição crónica ao tabaco é responsável por um processo inflamatório sistémico através da estimulação do sistema hematopoiético, particularmente da medula óssea. Com efeito, tem sido reconhecida a associação do consumo tabágico com a presença de inflamação sistémica desde a década de 70 do século passado, consubstanciada no aumento dos leucócitos circulantes [362,363] e do seu valor predictivo em relação às doenças cardiovasculares, cancro e DPOC [364,365,366]. Nesta última, a presença de obstrução brônquica está significativamente ligada ao aumento sanguíneo do número destas células, quando comparada com os fumadores portadores de um FEV<sub>1</sub> normal [367, 368]. Esta resposta inflamatória nos fumadores é acompanhada, não só pelo acréscimo do número das células presentes, como, igualmente, por alterações fenotípicas. A neutrofilia periférica é constituída por células imaturas (células em banda) que exibem, no entanto, um aumento da expressão da L-selectina, mais característica das células maduras [369], e que possuem também níveis mais elevados de mieloperoxidase, cuja produção ocorre nas fases iniciais da sua proliferação [369,370]. Na DPOC estas células parecem exibir alterações mais marcadas, como uma migração aberrante (aumento da migração, mas menos exacta) e uma diminuição da formação de pseudópodes, acompanhada de uma redução da sensibilidade quimiotáctica; estas alterações poderão estar relacionadas com as vias de sinalização da migração [371].

Em relação às células NK circulantes, tanto o seu número como a sua

actividade anti-tumoral, encontram-se reduzidas nos fumadores [372,373] sugerindo que o tabaco altera o sistema imunitário, permitindo que tanto as células tumorais como eventuais agentes patogénicos, escapem à acção das respostas imunes.

Quanto à participação dos linfócitos T na inflamação sistémica associada ao tabaco, indutora de doenças como a DPOC, tem sido realçado o aumento do número total destas células no sangue dos fumadores [374], relacionando-o com a eventual influência do tabaco nas subpopulações linfocitárias T. Tollerud [375] demonstrou a presença de níveis mais elevados de células T-CD4<sup>+</sup> no sangue de fumadores com conseqüente aumento da relação CD4/CD8. Estes resultados foram confirmados posteriormente por outros autores, como Glader [376], ao evidenciar a indução pelo tabaco de níveis mais elevados desta subpopulação em fumadores, por comparação com os não fumadores, e em fumadores portadores de DPOC. Já quanto à subpopulação T-CD8<sup>+</sup>, Koch [377] constatou que existia uma diminuição nas contagens totais dos linfócitos T-CD8<sup>+</sup>, com inevitável aumento da relação CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> nos fumadores em relação aos não fumadores, atingindo os valores mais elevados nos fumadores portadores de DPOC. Com efeito, estas células encontravam-se activadas expressando um aumento do receptor de superfície CD28. Este autor verificou ainda um aumento significativo da percentagem de células com o fenótipo CD27/CD45 RA<sup>+</sup> em relação ao número total de células T-CD8<sup>+</sup> nos fumadores sem doença, que atingia maior magnitude nos fumadores com DPOC. De facto, ao comparar a expressão do receptor quimiocínico CXCR3 nos linfócitos CD8<sup>+</sup>, apenas detectou diferenças estatisticamente significativas nos fumadores com DPOC; já em relação à actividade da proteína quimiotáctica dos monócitos (MCP-1), igualmente estudada, verificou que ela se encontrava diminuída tanto nos fumadores sem doença como naqueles com DPOC. Ainda neste contexto, outros autores [378] constataram que nesta afecção as células T circulantes, para além de se revelarem anormalmente activadas, produziam mediadores pro-inflamatórios que parece inscreverem-se num perfil misto entre as respostas Th<sub>1</sub> e Th<sub>2</sub>; no entanto, este aspecto continua a ser alvo de grande

controvérsia, com resultados bastante diferentes em vários estudos [378,379,380,381], os quais podem ter origem, tanto na dimensão das amostras, nas diferentes metodologias laboratoriais e na concorrência de outros cofactores, como igualmente na heterogeneidade e gravidade da própria doença. No entanto, a imunidade adaptativa deverá desempenhar um papel fundamental na patogenia e progressão da DPOC, apesar do efeito depressor exercido pelo tabaco em várias funções das células T [382,383].

O fumo activo parece induzir uma resposta imune adaptativa traduzida por níveis sanguíneos relativamente elevados de células B (células B memória), com predomínio da classe Ig A; já os portadores de DPOC, fumadores, possuem de igual modo níveis elevados de células B circulantes, sobretudo da classe Ig G, exibindo contudo valores mais elevados de células B memória a nível pulmonar [384]. Este facto está de acordo com o achado de um número elevado de folículos de células B nos doentes com DPOC [385,386], o que tem igualmente servido de suporte aos investigadores que defendem o contributo dos fenómenos autoimunes na patogenia da doença.

Por outro lado, a resposta imunológica induzida pelo tabaco parece ser diferente nos fumadores sem doença, em contraste com os portadores de DPOC. Com efeito, o predomínio da Ig A nos primeiros poderia resultar, segundo estes autores, da resposta imune da mucosa brônquica à estimulação crónica do fumo nas vias aéreas, enquanto que nos doentes a preponderância da Ig G seria o reflexo de uma resposta autoimune face aos neoantígenos induzidos pelo tabaco ou por agentes patogénicos. Neste contexto, o tabaco constitui um factor de risco no desenvolvimento de várias doenças autoimunes [387], como a artrite reumatóide [388], o lupus eritematoso sistémico [389], a cirrose biliar primária [390] e a esclerose múltipla [391], entre outras, reconhecendo-se igualmente nos portadores destas patologias um risco acrescido de desenvolvimento da DPOC [392]. Ainda neste âmbito, as células reguladoras Treg desempenham um papel importante na modulação do sistema imune: controlando a tolerância imunológica, prevenindo as reacções autoimunes através da inibição da resposta de células T, além de

uma inibição directa das respostas das células B, suprimindo, quer a produção de imunoglobulinas, quer a recombinação de classes [393,394]. Vários autores têm investigado a presença de células Treg na DPOC, com resultados diversos, tanto no tecido pulmonar como no LBA: diminuição do número de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> e dos níveis de mRNA Foxp3 no tecido pulmonar enfisematoso, quando comparado com os controlos [395], aumento das células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> no LBA de doentes com DPOC e nos fumadores saudáveis, por comparação com os sem patologia não fumadores [396]. Já outros investigadores têm relatado uma diminuição destas células no LBA de indivíduos atingidos por DPOC e de não fumadores, por oposição aos fumadores sem doença [397].

Num estudo de Isajevs [398], em que foram utilizadas técnicas imunohistoquímicas, este autor demonstrou o aumento de células Foxp3<sup>+</sup> nas vias aéreas de maior calibre de fumadores assintomáticos e de doentes com DPOC, comparado com as dos não fumadores, e uma diminuição destas células nas pequenas vias aéreas dos doentes com DPOC comparativamente aos fumadores assintomáticos e aos não fumadores.

Corry-Anke [399], ao estudar os linfócitos B e as células Treg apenas no sangue periférico de doentes com DPOC e de um grupo de indivíduos saudáveis (fumadores, ex-fumadores e não fumadores) verificou que os doentes com DPOC tinham percentagens mais baixas de células B, ao contrário do grupo de indivíduos saudáveis; a análise dos conjuntos relativamente ao consumo de tabaco demonstrou que os DPOC ex-fumadores tinham percentagens mais baixas de células B do que os fumadores saudáveis e que tanto os DPOC fumadores, como os assintomáticos fumadores, revelavam percentagens mais altas de células B memória do que os ex-fumadores e não fumadores.

Pelo que diz respeito aos subtipos de imunoglobulinas, os fumadores, tanto DPOC como os saudáveis, apresentavam níveis mais elevados de células Ig A positivas do que os ex-fumadores e os não fumadores. Ainda neste estudo, os doentes com DPOC fumadores mostravam, no sangue, percentagens mais

elevadas de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>Foxp3<sup>+</sup>T do que os fumadores saudáveis, existindo uma correlação negativa entre estas células e as células B no grupo portador de DPOC. Este resultado no sangue periférico é o oposto ao observado e descrito a nível pulmonar [395].

Assim, e apesar de alguns aspectos contraditórios, parece existir em relação à exposição crónica ao tabaco uma resposta imune adaptativa a antígenos *self* ou modificados, com desenvolvimento de níveis de tolerância eventualmente diversos que permitem explicar a variabilidade de respostas imunológicas à exposição tabágica.

### **3-Mediadores Inflamatórios Sistémicos na Exposição Crónica ao Tabaco**

Vários estudos efectuados ao longo dos anos têm realçado as variações de diversos mediadores inflamatórios, quer a nível pulmonar, quer sistémico, induzidas pela exposição ao tabaco, sobretudo no que diz respeito às proteínas da fase aguda, como a proteína C reactiva (PCR) e o fibrinogénio. Neste contexto, constitui uma referência clássica o estudo populacional alargado NHANES III (*Third National Health and Nutrition Examination Survey*), o qual evidenciou uma relação directa entre o consumo tabágico e o aumento dos níveis da PCR e do fibrinogénio [400,401]. As concentrações elevadas da PCR mantêm-se ao longo do tempo, mesmo após vários anos de cessação tabágica [402,403], encontrando-se a sua redução plasmática dependente da quantidade de cigarros consumida. Foi igualmente detectada uma relação dose-dependente entre a carga tabágica e os níveis plasmáticos de fibrinogénio [404]. Entretanto, a investigação NHANES III [400] demonstrou ainda que, para além da inflamação sistémica atribuída ao tabaco, a diminuição da função pulmonar se associava de *per se* à elevação da PCR, fibrinogénio e leucócitos sanguíneos, e que o tabagismo, assim como a presença de obstrução das vias aéreas, tinham um impacto aditivo na magnitude da inflamação sistémica. No mesmo sentido Gan [405] constatou que o fumo activo e a redução do FEV<sub>1</sub> contribuíam independentemente para o aumento

das taxas sistémicas dos marcadores inflamatórios; de facto, este autor pôde verificar que a diminuição da função pulmonar se correlacionava significativamente com os níveis elevados de vários marcadores inflamatórios: PCR, fibrinogénio, leucócitos, factor de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), IL6 e IL8, dando consistência ao pressuposto de que a evicção tabágica pode não resolver completamente o processo inflamatório sistémico subjacente à DPOC.

Outras investigações [406] demonstraram a associação da diminuição da capacidade vital forçada (FVC) aos valores plasmáticos elevados de  $\alpha_1$ -Pi, haptoglobulina, ceruloplasmina e da  $\alpha_1$ -glicoproteína ácida, com o aumento da incidência de enfarte do miocárdio e morte por acidente cardiovascular. Por outro lado, as concentrações séricas de várias proteínas da fase aguda (ceruloplasmina,  $\alpha_1$ -Pi,  $\alpha_1$ -glicoproteína ácida, haptoglobulina e fibrinogénio) aumentavam significativamente com o consumo tabágico em adultos saudáveis, independentemente da existência de outros factores de risco cardiovascular [407].

A detecção de níveis plasmáticos elevados das proteínas de fase aguda parece reflectir, em parte, o aumento das citocinas pro-inflamatórias, como a IL-6 e o TNF- $\alpha$ ; com efeito, os seus níveis encontram-se igualmente aumentados nos fumadores [408], razão pela qual têm sido apontados não só como factores de risco mas também como possuindo um valor preditivo em relação ao enfarte do miocárdio, à doença coronária e ao acidente vascular cerebral (AVC) [409,410].

A ligação entre o tabaco e a aterogénese responsável por algumas doenças cardiovasculares é complexa; o fumo do cigarro contribui em cerca de 36% para o risco de enfarte do miocárdio, cujo aumento é proporcional ao número de cigarros consumidos [411]. Sabe-se, entretanto, que para além da inflamação sistémica concorrem outros factores como a disfunção endotelial, distúrbios da coagulação - actividade procoagulante - e anomalias lipídicas. Em relação à disfunção endotelial, esta parece constituir a etapa inicial do processo aterosclerótico e resulta da diminuição da produção ou da biodisponibilidade do óxido nítrico (NO) [412]. Com efeito, nos fumadores tem-

se constatado uma diminuição da concentração sérica de metabolitos (nitratos e nitritos) do óxido nítrico [413], a par de um aumento significativo do factor activador do plasminogénio tissular (t-PA) [414,415], assinalando a existência de alterações da actividade fibrinolítica nesta população. De facto a elevação do t-PA tem sido associada ao aumento do risco de doenças cardíacas [416], de AVC isquémico [417] e de doença vascular periférica [418]. Acresce ainda que nos fumadores as lipoproteínas de baixa densidade estão mais sujeitas à oxidação devido à presença dos altos níveis de ROS e de RNS [419].

Os fumadores exibem ainda, sob o ponto de vista inflamatório, um aumento do número de leucócitos circulantes e uma elevação sistémica dos marcadores inflamatórios: PCR, IL6, molécula de adesão intercelular solúvel tipo I (ICAM-1), E-selectina e P-selectina [408, 415]. Por outro lado, os monócitos isolados de fumadores apresentam uma capacidade aumentada de aderência às células endoteliais [420]. Ainda neste âmbito, detectou-se nos fumadores uma elevação dos níveis plasmáticos do CD40 solúvel, a qual se acompanha de um aumento da expressão desta molécula na superfície dos monócitos, assim como do seu ligando CD40L nas plaquetas, contribuindo para a agregação monócito-plaquetar [421].

Consideradas no seu conjunto estas alterações induzidas pela exposição tabágica associam-se à disfunção endotelial, que ao perder a capacidade de aderência aos elementos celulares circulantes permite a entrada de células inflamatórias na parede arterial. Por outro lado, as lipoproteínas modificadas são incorporadas pelos macrófagos, promovendo a formação de células espumosas na sequência da acumulação de ésteres de colesterol, dando início ao processo de aterogénese.

As anomalias da hemostase são evidenciadas pelo aumento da viscosidade do sangue e do plasma dos fumadores, com repercussões sobre o hematócrito, fibrinogénio e lipoproteínas [422], responsáveis por uma maior actividade protrombótica.

A cessação tabágica parece associar-se a alguma variabilidade no comportamento dos vários marcadores hemostáticos e inflamatórios.

Assim, a redução dos níveis da PCR está ligada ao número de cigarros consumidos, parecendo ser igualmente influenciada pela existência de comorbilidades. Num estudo prospectivo efectuado numa população específica de sobreviventes de enfarte do miocárdio alguns autores [423] constataram, numa série de determinações seriadas, uma grande variabilidade de resultados, com variações mais amplas nos doentes mais idosos, nos portadores de valores de HDL mais altos, no sexo masculino, nos doentes com peptídeo natriurético tipo B (BNP) elevado e naqueles que utilizavam medicação anti-inflamatória. Já os obesos e os diabéticos apresentavam valores mais elevados que os doentes com peso normal, mas as concentrações mostravam-se menos variáveis ao longo do tempo. Por outro lado, este estudo revelou igualmente que existe uma contribuição genética substancial nos valores basais da PCR que pode explicar a variação inter-individual. No estudo Speedwell [424], a PCR permanecia significativamente elevada dez anos após a cessação tabágica. Já o hematócrito sofria uma redução para valores semelhantes aos dos não fumadores, cinco anos após deixar de fumar. No trabalho de Smith [425], a contagem dos leucócitos só retornava aos valores dos não fumadores após vinte anos.

Também os níveis do antigénio t-PA apenas se começam a reduzir nos ex-fumadores decorridos cinco anos, revertendo para os valores dos não fumadores ao fim de vinte anos. Em relação à viscosidade do sangue e do plasma, ela permanece elevada após dez anos, possivelmente devido à persistência do aumento das proteínas inflamatórias, como o fibrinogénio [426]. A cessação tabágica associa-se a uma redução significativa e relativamente precoce do risco de enfarte do miocárdio e de AVC [427], embora alguns estudos sugiram que o risco do evento coronário agudo só reverte para o de um não fumador após cinco anos [428]; outros autores realçam que o risco, apesar de minimizado, persiste mesmo para além dos dez anos [429].

Em relação aos marcadores inflamatórios o estudo de Reichert [430], efectuado em mulheres com risco cardiovascular incluídas num programa de desabitação tabágica, demonstrou uma diminuição significativa nos níveis

séricos de TNF, assim como dos seus receptores 1 e 2 (TNFR-I, TNFR-II) e do VCAM-1, marcador da activação celular endotelial, enquanto que os valores de IL-6 e da PCR, embora diminuíssem, não evidenciavam diferenças estatisticamente significativas; no entanto os resultados apontaram para uma diminuição consistente do risco cardiovascular [431]. De facto a cessação tabágica é a única intervenção, nos indivíduos portadores de DPOC, verdadeiramente responsável pela diminuição do declínio acelerado do FEV<sub>1</sub> [432]. Porém, no que diz respeito ao processo inflamatório local, vários estudos transversais efectuados, quer no parênquima pulmonar quer em amostras de biópsias brônquicas ou ainda através de marcadores da inflamação [433,434,435], evidenciaram a sua persistência nos ex-fumadores. Esta constatação foi igualmente confirmada por estudos longitudinais realizados a um e a quatro anos após cessação tabágica [436, 437]; neste último caso, envolvendo doentes com DPOC moderada e com fenótipo enfisematoso demonstrado por tomografia torácica, nos quais Miller [437] pôde evidenciar não só a persistência do processo inflamatório como o carácter evolutivo do enfisema pulmonar que atingia esses doentes.

## CAPÍTULO VI

### **A DPOC E O STRESS OXIDATIVO**

A DPOC caracteriza-se por um processo inflamatório crónico, local e sistémico, em que o *stress* oxidativo ocupa um lugar central [438,439,440] e para o qual contribuem, como principais fontes, quer o aumento da carga de oxidantes inalados, quer o excesso de ROS libertadas pelas células inflamatórias que actuando de forma directa ou indirecta sobre outras moléculas são responsáveis pela amplificação da resposta inflamatória.

O pulmão, devido às suas características anátomo-funcionais está exposto a elevadas concentrações de oxigénio, com pressões deste gás no ar inalado à volta de 20 KPa (150 mmHg), o que, associado à grande superfície e vascularização deste território orgânico, o torna altamente vulnerável à lesão induzida pelos oxidantes, razão pela qual é detentor de um vasto conjunto de defesas antioxidantes [441], pelo que, em condições fisiológicas, existe a nível pulmonar um delicado equilíbrio entre oxidantes e antioxidantes. Este equilíbrio pode ser quebrado tanto por um excesso dos primeiros como por uma diminuição dos segundos, resultando no *stress* oxidativo [442]. A nível celular,

no entanto, a ocorrência de ligeiros desvios nesse balanço tem um papel importante na activação da sinalização intracelular [443], enquanto que o aumento incontrolado das concentrações de oxidantes pode desencadear um ataque indiscriminado às proteínas [444], aos lípidos [445], aos polissacarídeos [446] e ao DNA [447, 448].

O pulmão está exposto essencialmente a duas fontes de ROS: a ambiental (exógena) e a celular (endógena). A primeira, representada pela poluição de gases e material particulado, compreende o fumo do tabaco e gases oxidantes como o ozono, o dióxido de nitrogénio e o dióxido sulfúrico; o material particulado com dimensão inferior a 10 µm abarca os fumos de exaustão do *diesel*, por exemplo, responsáveis pela produção de ROS *in situ* [449], os agentes infecciosos e as poeiras de natureza ocupacional. Quanto à segunda, resulta das reacções enzimáticas e não enzimáticas da transferência de electrões a nível das mitocôndrias e microssomas. As fontes enzimáticas incluem as NADPH oxidases localizadas na membrana celular dos polimorfonucleares, macrófagos e células endoteliais [450], as oxigenases citocromo P<sub>450</sub> dependentes [451,452] e o sistema citoplásmico xantina/xantina oxidase [453]. A produção não-enzimática inclui a transferência directa de um electrão para o oxigénio por coenzimas reduzidas, como por exemplo as flavinas ou *clusters* de sulfatos de ferro, através de xenobióticos ou, ainda, da fuga de electrões na cadeia de transporte mitocondrial [454].

### **1-Abordagem Bioquímica do Stress Oxidativo**

A produção de radicais oxidantes ocorre em todos os sistemas biológicos, como parte integrante dos processos fisiológicos envolvidos na produção de bioenergia e resultam do metabolismo do oxigénio (O<sub>2</sub>) [454]. Em condições fisiológicas o O<sub>2</sub> sofre uma redução catalítica de quatro electrões pela citocromo oxidase mitocondrial e após reacção com o hidrogénio transforma-se em água [455]. Durante o processo de transporte mitocondrial de electrões ocorre a formação de vários intermediários reactivos dos quais se destaca o

anião superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) que resulta da redução, com acréscimo de um electrão ao oxigénio, e que é o precursor da maior parte das ROS e um mediador das reacções oxidativas em cadeia [456]. Para além da sua produção pelo metabolismo mitocondrial outras reacções que envolvem hidroxilases, xantina, sulfitos e aldeído oxidases, o metabolismo do ácido araquidónico e/ou o sistema NADPH das células fagocitárias, são susceptíveis de originar este radical [449].

O peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ), menos reactivo que o anterior, pode originar-se a partir do anião superóxido pela adição de um electrão e dois átomos de hidrogénio, ou derivar da catalisação do  $O_2^{\cdot-}$  pela superóxido dismutase (SOD) [457]. Sob a acção da mieloperoxidase (MPO) neutrofílica, e na presença de iões de cloro ( $Cl^-$ ), o  $H_2O_2$  pode converter-se em ácido hipocloroso ( $HOCl$ ) [458] que é altamente reactivo e capaz de oxidar tióis, tioéteres, grupos heme, ferro e aminas [459]. O radical hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ ), um poderoso oxidante, resulta da redução directa do  $O_2^{\cdot-}$  sobre o  $H_2O_2$  pela reacção de Haber-Weiss, na qual se forma ainda  $O_2$  molecular e o ião hidroxilo ( $OH^-$ ). Alternativamente, na reacção de Fenton o  $O_2^{\cdot-}$  é susceptível de reduzir iões metálicos ( $Fe^{3+}$  ou  $Cu^{2+}$ ) para formar  $O_2$  [460]; ainda nesta reacção, o ião metálico reduzido pode reagir com o  $H_2O_2$ , regenerando o metal oxidado e produzir concomitantemente  $OH^-$  e  $OH^{\cdot}$ . Tanto o radical superóxido como o hidroxilo são susceptíveis de iniciar a peroxidação lipídica, levando à formação de peróxidos lipídicos [441].

Ainda neste contexto o óxido nítrico (NO) é igualmente um mediador importante dos efeitos fisiológicos de uma grande variedade de células (neurónios, músculos liso e estriado, hepatócitos, neutrófilos, macrófagos, células epiteliais, etc.). As espécies reactivas de nitrogénio (RNS) derivam da síntese do óxido nítrico produzido endogenamente pela acção da óxido nítrico sintetase (NOS), numa reacção que envolve a oxidação da L-arginina [461], convertendo-a em L-citrulina, na qual, quer o  $O_2$  quer a NADPH actuam como co-substratos [462], enquanto a tetrahydrobiopterina (H4B), os nucleótidos da flavina e os tióis funcionam como cofactores enzimáticos [463]. Das óxido nítrico sintetases endógenas: neuronal (nNOS, isoforma I), endotelial (eNOS, isoforma III) e

indutível (iNOS, isoforma II) [464], as duas primeiras encontram-se expressas nas células como monómeros e a sua actividade é regulada pela disponibilidade do cálcio/calmodulina no citoplasma celular, gerando NO em pequenas quantidades e por curtos períodos de tempo [465]. Já a iNOS depende da transcrição do gene *Nos 2* em macrófagos e neutrófilos através de uma larga variedade de estímulos pro-inflamatórios que incluem: a lesão oxidativa [466], o *stress* mediado por endorfinas [467], a diminuição da pressão de oxigénio [468] e endotoxinas bacterianas ou exotoxinas [468,469] e pelas citocinas INF- $\alpha/\beta$ , INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , entre outros [470]. A iNOS origina grandes quantidades de NO por períodos de tempo prolongados [471] e como pode ser induzida pelos estímulos inflamatórios a nível pulmonar, reflecte a inflamação das vias aéreas, constituindo por um lado um marcador dessa inflamação, e por outro um marcador do *stress* oxidativo.

Sob o ponto de vista estrutural o NO possui um par de electrões desemparelhados, pelo que pode reagir com outros radicais livres. Assim, o óxido nítrico resultante da acção da óxido nítrico sintetase é rapidamente inactivado na corrente sanguínea pela interacção com a oxi-hemoglobina (HbO<sub>2</sub>), produzindo metahemoglobina (MetHB) e nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) [462, 472]. Já a reacção do NO com a molécula de O<sub>2</sub> dá origem ao dióxido de nitrogénio (NO<sub>2</sub>), que possui uma elevada toxicidade e constitui o substrato para a acção da mieloperoxidase (MPO) e peroxidase eosinofílica (EPO) responsáveis pela oxidação e cloração [441]. No entanto, a maior toxicidade tem sido associada à reacção com o O<sub>2</sub><sup>-</sup> através da formação do peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>). Este possui uma elevada capacidade de oxidação e nitração de várias moléculas, como é o caso do aminoácido tirosina, convertendo-o por esta via em 3-nitrotirosina, considerado um marcador da formação de RNS [462] e do ácido peroxinitroso (ONOOH), que por isomerização origina o dióxido de nitrogénio (NO<sub>2</sub>) e um intermediário semelhante ao radical OH<sup>-</sup> capaz de oxidar os grupos tiol em S-nitrosotióis (SNO) inibindo enzimas como a glutathiona (GSH), a glutathiona peroxidase (GPx), a GSH redutase, e a glutathiona transferase (GST) [462], para além de induzir modificações nas proteínas do DNA.

Entre os efeitos citotóxicos dos RNS salienta-se a inibição da expressão genética celular, através de vários mecanismos: desaminação de nucleótidos, originando quebras na cadeia do DNA, redução da síntese proteica e inibição de enzimas necessárias à síntese do DNA, entre outros [473,474,475].

O NO tem ainda a capacidade de modular a actividade de factores de transcrição redox-sensíveis, como o NF- $\kappa$ B e os componentes AP-1 [476]. Já o peroxinitrito pode iniciar a peroxidação lipídica dos ácidos gordos, o que resulta na lesão das membranas celulares [477]. O NO tem no entanto a capacidade de neutralizar os radicais lipídicos e inibir a oxidação membranar e das lipoproteínas pondo fim à reacção em cadeia que leva à formação de radicais [477]. Este facto é relevante, na medida em que o óxido nítrico se concentra preponderantemente nos compartimentos celulares lipofílicos [478]. Alguns estudos em modelos animais têm realçado o papel antimicrobiano das RNS sobretudo em relação a agentes patogénicos intracelulares [479].

Em relação à peroxidação lipídica, esta inicia-se pelo ataque através de espécies reactivas aos ácidos gordos polinsaturados [339]. Estas reacções podem ser quimicamente de dois tipos: não enzimáticas e enzimáticas. Nas primeiras, qualquer radical livre com energia suficiente para retirar um átomo de hidrogénio ( $H\bullet$ ) ao grupo metileno ( $-CH_2-$ ) de um ácido gordo polinsaturado [339] pode iniciar a reacção em cadeia da peroxidação, até que dois radicais livres se aniquilem mutuamente pondo fim a esta. Já a peroxidação enzimática envolve a geração de peróxidos lipídicos no centro activo de uma enzima; encontram-se neste caso a cicloxigenase e a lipoxigenase [339].

As espécies reactivas com essa capacidade incluem os radicais: hidroxilo, peroxil e alcoxil ( $RO\bullet$ ), sendo este último produzido a partir dos metais reduzidos, como o ferro ou o cobre. Os fosfolípidos das membranas celulares são particularmente vulneráveis à peroxidação, o que tem consequências nas suas funções e estrutura, determinando: alterações da permeabilidade membranar, com perda da selectividade no transporte iónico; inactivação de receptores de membrana e enzimas; libertação do conteúdo dos organelos (hidrolases dos lisossomas); e formação de produtos citotóxicos, como os

aldeídos, que ao contrário do que acontece com os radicais livres são quimicamente mais estáveis, podendo difundir-se através das células e exercer os seus efeitos à distância, em células alvo [347]. Têm além disso um papel importante na sinalização de uma série de processos envolvidos na resposta inflamatória pulmonar [480], para além de interagirem com moléculas antioxidantes, como o alfa-tocoferol, e de sofrerem decomposição por reacção com os iões metálicos ou com proteínas contendo ferro, como a hemoglobina, levando à formação de gases hidrocarbonados de que são exemplos o etano e o pentano e, igualmente, de aldeídos insaturados como o malondialdeído [481]. Os principais produtos finais da peroxidação lipídica incluem: os isoprostanos, o 4-hidroxinonenal (4HNE), a acroleína e o malondialdeído. O isoprostano mais extensivamente estudado como marcador do *stress* oxidativo pulmonar e sistémico, é o 8-isoprostano (8-isoprostaglandina-F<sub>2</sub>α) [482]. Trata-se, como já foi referido, de um composto *prostaglandina-like* resultante da peroxidação do ácido araquidónico. As concentrações de 8-isoprostano no condensado do ar exalado nos ex-fumadores e fumadores com DPOC encontram-se mais elevadas 1,8 vezes do que nos fumadores sem patologia, que por sua vez atingem valores 2,2 vezes mais altos que os não fumadores saudáveis [334]. Do mesmo modo, os níveis do 8-isoprostano são mais elevados na DPOC grave em relação às situações ligeiras e moderadas [483], constatando-se os mesmos resultados durante os processos de exacerbação infecciosa da doença [484]. Estes factos são relevantes no contexto da DPOC, na medida em que estas substâncias parecem desempenhar importantes papéis em diversas áreas, como a expressão citocínica, a constrição das vias aéreas, a vasoconstrição pulmonar, a inflamação, a permeabilidade endotelial, a vasoconstrição arterial brônquica, a permeabilidade epitelial e a secreção de muco [485].

O 4-HNE é um dos principais produtos da peroxidação lipídica, sendo muito reactivo e difusível e com alta afinidade para as proteínas com as quais forma complexos através dos resíduos de cisteína, histidina e lisina, alterando as suas funções [486]. Pode actuar como agente quimiotáctico para neutrófilos,

parecendo ainda ser capaz de activar a síntese de glutathione a partir da indução genética da glutamato cisteína ligase (GCL) e também de genes pro-inflamatórios, como a IL-8, a proteína quimiotática de monócitos (MCP-1), a ciclooxigenase, o receptor do factor de crescimento epidérmico e a mucina 5AC [346,487,488].

Rahman [489] demonstrou, através de técnicas imunohistoquímicas, o aumento de proteínas modificadas nas vias aéreas, nas células epiteliais alveolares e endoteliais assim como nos neutrófilos de doentes portadores de DPOC, em relação aos indivíduos sem doença. O mesmo autor pôde ainda constatar a existência de uma correlação inversa entre o FEV<sub>1</sub> e os níveis dos complexos 4-HNE/proteína no epitélio alveolar, no endotélio e nos neutrófilos. Estes achados foram igualmente confirmados em modelos animais; com efeito, Aoshiba [490] verificou a presença de concentrações aumentadas dos complexos 4-HNE/proteínas nos epitélios bronquiolar e alveolar de ratos, uma hora após a exposição ao fumo do cigarro.

A acroleína é um aldeído insaturado presente em vários poluentes ambientais, particularmente no fumo do tabaco, que, como outras substâncias alquilantes, tem potencial mutagénico e/ou carcinogénico, reagindo com as bases das cadeias de ADN [491]. Parece também induzir *in vitro* a transcrição de genes através da activação do Nrf2 [492]; ora, este representa um dos principais factores de transcrição antioxidante, que uma vez activado se transloca para o núcleo ligando-se a um elemento de resposta oxidante (ARE) localizado no DNA de vários genes antioxidantes. A indução deste elemento vai permitir a transcrição de várias proteínas antioxidantes como a heme-oxigenase-1 (HO-1), a glutatião reductase, a glutatião peroxidase, a GCL [493], etc. O Nrf2 activa, portanto, vias importantes da protecção antioxidativa bem como da inflamação, da apoptose e da carcinogénese, tendo-se demonstrado que as alterações no gene Nrf2 induzidas pela acroleína determinam no animal, o desenvolvimento precoce de um extenso enfisema em resposta à exposição ao fumo do tabaco [494].

Os oxidantes, embora responsáveis pela toxicidade exercida sobre as células e

o DNA, desempenham um papel na regulação da homeostasia celular e modulam diferentes vias associadas ao crescimento celular e à proliferação. Activam reacções envolvidas na regulação de factores de transcrição, tais como o NF- $\kappa$ B ou o Nrf2 importante na indução de antioxidantes.

## 2-Antioxidantes

Face à concepção do papel fundamental do *stress* oxidativo na patogenia da DPOC assumem particular relevância os mecanismos de defesa antioxidante. Com efeito, em 1986 Taylor [495] levantou a questão da possível interacção entre a deficiência de antioxidantes e a afecção, ao verificar que existia uma relação entre a diminuição da actividade antioxidante do plasma e valores anormais do índice de Tiffeneau nos doentes portadores da doença.

De acordo com a sua estrutura, os antioxidantes podem ser classificados em enzimáticos e não enzimáticos [441].

Os principais componentes do sistema antioxidante enzimático [Fig.4] incluem a superóxido dismutase (SOD), a catalase, os sistemas glutatião (GSH) e a tioredoxina [496, 497], cuja activação impede a acumulação de radicais e moléculas oxidantes.

As superóxido dismutases (SODs) são o único sistema enzimático que decompõe os radicais superóxido em  $H_2O_2$  e  $O_2$ , desempenhando portanto um papel importante na protecção contra o *stress* oxidativo, sobretudo a nível pulmonar [498]. Existem três tipos de SODs: a SOD cobre-zinco intracelular (CuZnSOD), que é um homodímero de 32-KD, constitui a maior SOD intracelular e encontra-se presente no citoplasma e no núcleo; a SOD manganésio mitocondrial (MnSOD) representa um homotetrâmero de 93-KD que é sintetizado no citoplasma e translocado para o interior da mitocôndria; e a SOD extracelular (ECSOD), particularmente abundante nas vias aéreas e nos vasos [499,500,501,502]. Técnicas de imunohistoquímica e de microscopia electrónica permitiram demonstrar que a ECSOD é detectável nas áreas ricas em colagénio de tipo I, na superfície das células musculares lisas e na matriz

extracelular associada às células musculares lisas das vias aéreas e vasculares [499,500].

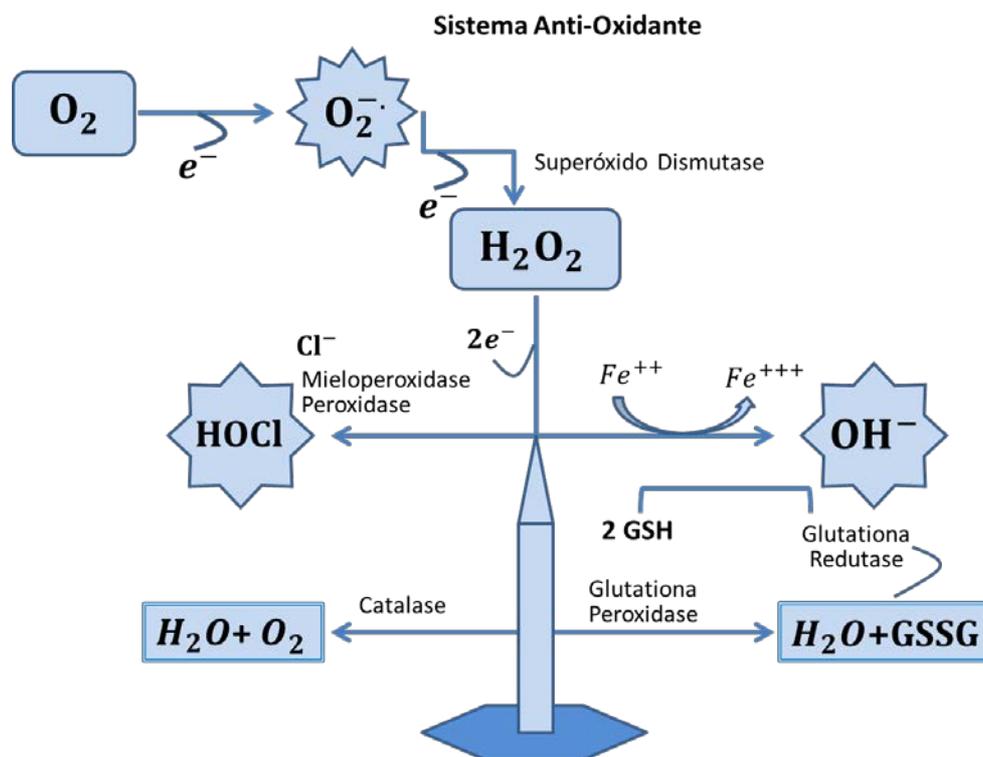


Fig. 4-Representação esquemática dos principais componentes do sistema antioxidante enzimático na DPOC

Estas enzimas encontram-se a nível pulmonar em diversos tipos de células; no entanto, evidenciam uma variabilidade significativa na sua localização e expressão celular, conferindo-lhes diversas resistências oxidativas. As células epiteliais alveolares tipo II, por exemplo, expressam CuZnSOD, MnSOD e catalase [501,502] pelo que são mais resistentes ao *stress* oxidativo do que as células epiteliais alveolares tipo I, que exibem baixos níveis de antioxidantes, sendo por isso mais sensíveis e vulneráveis ao *stress* oxidativo. A MnSOD encontra-se altamente expressa nos macrófagos alveolares e nas células epiteliais alveolares tipo II, células que têm uma elevada capacidade

metabólica [503,504,505]. A CuZnSOD localiza-se fundamentalmente no epitélio brônquico, nas células epiteliais ciliadas, nos macrófagos alveolares e nas células epiteliais alveolares tipo II, enquanto que a ECSOD predomina na matriz extracelular, paredes das vias aéreas, macrófagos alveolares e vasos pulmonares [505]. Tanto a CuZnSOD como a MnSOD actuam principalmente sobre os radicais superóxido no citoplasma e nas mitocôndrias das células enquanto que a ECSOD parece constituir um mecanismo protector das proteínas da matriz face aos oxidantes extracelulares, para além de exercer uma regulação do óxido nítrico através do espaço extracelular [506].

A glutathione (GSH) é constituída quimicamente por um tripeptídeo (L- $\gamma$ -glutamil-L-cisteinil-glicina). É um antioxidante importante com actividade sobre radicais e outros oxidantes, para além de exercer acções, quer no âmbito imunomodulador, quer a nível da resposta inflamatória [507,508], como: modulação da regulação redox das células e da proliferação celular, *remodeling* da matriz extracelular, protecção antiproteásica, apoptose e respiração mitocondrial [509,510]. A sua actividade antioxidante é particularmente importante a nível do epitélio das vias aéreas protegendo-o da oxidação e da inflamação provocada por radicais livres [511]. Com efeito, foram encontradas concentrações aumentadas no fluido epitelial (ELF) de fumadores crónicos [512]. Também o ELF alveolar apresenta a mais alta concentração de glutathione (100 vezes maior que a do plasma) apresentando-se, em cerca de 90%, na forma reduzida. Este meio biológico contém ainda outros antioxidantes, como a SOD, a catalase e a glutathione peroxidase, e antioxidantes não enzimáticos entre os quais se destaca a ceruloplasmina, a transferrina, o ascorbato, a vitamina E, a ferritina, a albumina e a bilirrubina [441].

Na biosíntese da glutathione intervêm duas enzimas e os aminoácidos glicina, cisteína e ácido glutâmico, constituindo a taxa de cisteína no interior das células o substrato limite da formação. Assim, o tripeptídeo resulta das acções consecutivas da glutamato cistenil ligase (GCL) e da glutathione sintetase [513], tendo-se constatado que a actividade da GCL determina a taxa de síntese da

glutathione e que a reacção catalisada por esta enzima é inibida pela GSH [514]. A GCL é um heterodímero constituído por duas subunidades- $\gamma$ -GCS-HS e  $\gamma$ -GCS-LS- no qual a primeira tem uma actividade catalítica, que pode no entanto ser modulada pela associação com a  $\gamma$ -GCS-LS; esta tem sobretudo uma actividade reguladora, na medida em que a sua estrutura química (ponte dissulfídica) lhe permite alterar a conformação do local activo, dependente do estado oxidativo das células [515]. Desta circunstância resulta a possibilidade do aumento da síntese no caso de depleção da GSH. Ambas as subunidades se localizam no citoplasma das células, tendo uma expressão particularmente relevante no epitélio brônquico e nos macrófagos [507]. O processo de transporte da cistina, forma oxidada da cisteína, para o interior da célula ao mesmo tempo que o glutamato é libertado extracelularmente, constitui uma forma alternativa de regulação dos níveis intracelulares de glutathione pulmonar face ao stress oxidativo, incluindo o NO, o qual aumenta o transporte da cistina e do glutamato através da membrana, elevando assim o nível da síntese de GSH [515,516].

Este sistema da glutathione é fundamental para a manutenção da homeostasia intracelular da GSH/GSSG através do controlo da expressão de certas enzimas envolvidas na destoxificação de radicais livres. Como se sabe a GSH é utilizada na neutralização de peróxidos, como o  $H_2O_2$ , e de peróxidos lipídicos, envolvendo a glutathione peroxidase (GP) e gerando a glutathione dissulfido (GSSG) que é então novamente reduzida em GSH pela acção da glutathione dissulfido redutase e da NADPH [513].

A glutathione peroxidase (GP) é uma enzima que contém selénio, está presente no ELF e necessita da presença de GSH reduzida, a qual proporciona a doação de electrões, dando origem à GSH oxidada que, por sua vez, é reduzida pela glutathione redutase para formar de novo a GSH [508,514]. Esta possui ainda a capacidade de funcionar de forma não enzimática, como um antioxidante hidrossolúvel através da interacção directa com espécies reactivas de oxigénio, destruindo-as. A determinação dos níveis plasmáticos da glutathione ou da sua forma oxidada (GSSG), bem como da relação GSH/

GSSG, é genericamente aceite como um método de detecção do *stress* oxidativo. De facto, ela reflecte não só o estado oxidativo sistémico mas constitui igualmente um indicador útil do risco de doença, pelo que tem sido utilizada em vários estudos como marcador da produção de radicais livres, nomeadamente durante o exercício [517].

A catalase é uma enzima que se encontra presente sobretudo nos macrófagos alveolares e nos neutrófilos e que possui uma capacidade antioxidante sobre o peróxido de hidrogénio [518]. Encontra-se diminuída no epitélio bronquiolar e nos macrófagos alveolares dos fumadores com DPOC, como foi demonstrado por Inomata [519], o qual viria ainda a constatar, em modelos animais, que a deficiência de actividade da catalase tinha como consequência, no animal exposto ao fumo de tabaco, o aumento da inflamação neutrofílica com subsequente progressão do enfisema.

O sistema da tioredoxina comporta um conjunto enzimático que compreende: tioredoxinas, redutases, peroxiredoxinas e glutaredoxinas [520]. Estas enzimas têm como principal actividade a redução de dissulfitos das proteínas, podendo apresentar ainda outras capacidades antioxidantes. Estão presentes, sobretudo, nos epitélios brônquico e alveolar, bem como nos macrófagos alveolares [521].

Quanto aos antioxidantes não enzimáticos, eles actuam directamente sobre os radicais oxidantes, neutralizando-os. A vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol), lipossolúvel, é um antioxidante da membrana que exerce a sua acção sobre os peróxidos lipídicos pondo fim à reacção em cadeia [522]. No homem, cerca de 90% da vitamina E encontra-se sob a forma de  $\alpha$ -tocoferol.

A vitamina C (ácido ascórbico ou ascorbato), hidrossolúvel, pode neutralizar directamente os radicais  $O_2^-$  e  $OH^-$ .

Também o  $\beta$ - caroteno é susceptível de neutralizar o  $O_2^-$  e outros radicais. O ácido úrico actua, particularmente, sobre o  $OH^-$ ; a bilirrubina exerce a sua actividade nos peróxidos lipídicos, e a albumina tem a capacidade para se ligar a iões metálicos [441,523].

As mucinas (MUCs) são glicoproteínas que contêm um núcleo rico em resíduos

de serina/treonina ao qual se ligam grupos sulfidril, o que lhe confere propriedades antioxidantes, podendo, assim, neutralizar o  $\text{OH}^-$  [441]. Existem pelo menos 12 genes humanos das mucinas. As células caliciformes expressam as MUCs 5AC e 2 e as células mucosas glandulares as MUCs 5B, 8 e 19. A MUC 7 encontra-se nas glândulas serosas, tem baixo peso molecular e não possui cisteína [523]. Na DPOC há um aumento da expressão da MUC 5B no lúmen bronquiolar e da MUC 5AC no epitélio bronquiolar [524].

A manutenção do equilíbrio oxidantes/antioxidantes pode ser influenciado não só pela carga oxidativa excessiva como por polimorfismos genéticos com impacto nos sistemas antioxidantes, de que são exemplo os polimorfismos da EC-SOD, que no homozigótico, está associada a uma diminuição da capacidade vital forçada prevista [525] ou resultar, ainda, das alterações oxidativas induzidas pelo fumo do cigarro em moléculas críticas, como é o caso da instabilidade do factor de transcrição Nrf2 originado por uma diminuição da expressão da sua proteína estabilizadora (DJ-1), com consequente redução de enzimas antioxidantes fundamentais na defesa contra o *stress* oxidativo a nível pulmonar [526].

### **3-Células e Oxidantes**

Neste contexto, os oxidantes presentes no fumo do tabaco estimulam os macrófagos alveolares a produzir ROS, tais como:  $\text{O}_2^-$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$  [441,527]. De facto o LBA dos fumadores evidencia não só um número aumentado de macrófagos, como um acréscimo do seu conteúdo em ferro, sobretudo naqueles que desenvolvem bronquite crónica [528,529]. Em relação aos monócitos dos fumadores parece existir uma libertação espontânea de  $\text{H}_2\text{O}_2$  relacionada com a maturação acelerada e com a activação [530]. O *stress* oxidativo pode gerar igualmente, através das células epiteliais, a libertação de factores quimiotácticos para neutrófilos [527], os quais, por sua vez, sintetizam oxidantes e elastases. Na verdade, foi demonstrada a retenção pulmonar de neutrófilos activados após exposição ao fumo do tabaco [530,531], os quais

constituiriam uma fonte de ROS, particularmente de  $O_2^-$ , cuja produção se elevaria durante as exacerbações infecciosas [532, 533]. Ainda neste âmbito, o fumo do tabaco condiciona um aumento da mieloperoxidase (MPO) dos neutrófilos, aliás correlacionável positivamente com o grau de disfunção pulmonar e negativamente com o FEV<sub>1</sub> nos doentes com DPOC [534]. Igualmente, os produtos da peroxidação lipídica presentes no plasma revelam uma correlação inversa com a percentagem prevista para o FEV<sub>1</sub> [535].

A produção de ROS encontra-se aumentada no ELF pela presença de um excesso de ferro nos espaços aéreos dos fumadores [536]. Assim, os pneumócitos tipo II podem produzir  $O_2^-$  e  $H_2O_2$ , os quais, na presença da MPO, promovem a inactivação *in vitro* da  $\alpha_1$ -Pi [537].

A produção de NO associada ao processo inflamatório, bem como de RNS pelo epitélio e por macrófagos activados na presença de  $O_2^-$ , conduz à formação do peroxinitrito [441].

Os eosinófilos estão presentes nas vias aéreas nas fases de estabilidade e de agudização da doença [538], encontrando-se no LBA dos doentes com DPOC níveis aumentados da proteína catiónica eosinofílica (ECP) [539]; por outro lado, a eosinofilia periférica tem sido associada ao risco de desenvolvimento de obstrução brônquica [540].

Alguns destes aspectos, contudo, não são consensuais. De facto, a relação entre o declínio funcional e a inflamação eosinofílica não está clarificada. Lams [541], por exemplo, encontrou uma correlação negativa entre o FEV<sub>1</sub> e o quociente entre o número de eosinófilos activados/número total destas células no material obtido através de biópsias brônquicas; o mesmo tipo de correlação foi reconhecido por Balzano [542] face ao número de eosinófilos e de ECP na expectoração induzida. Entretanto, outros autores, como Hogg [543], não observaram qualquer relação entre a eosinofilia das pequenas vias aéreas e a gravidade da DPOC.

De igual modo permanece por esclarecer a etiologia da inflamação eosinofílica na DPOC. Barnes [544] procurou analisá-la através da presença de uma componente asmátiforme associada à obstrução fixa das vias aéreas. Esta

explicação não parece, no entanto, consentânea com os vários estudos em que foram excluídos os doentes com quadros obstrutivos variáveis ou que clinicamente sugerissem a presença de asma. Outras explicações possíveis têm colocado uma ênfase particular sobre o tabaco, ou noutros mecanismos responsáveis pelo recrutamento de neutrófilos para a mucosa das vias aéreas e que poderiam induzir igualmente o afluxo, embora em menor grau, de eosinófilos [545].

Outra hipótese alternativa, referida por alguns autores, é a da DPOC se iniciar por um bronquite eosinofílica, responsável pela tosse crónica e eosinofilia da expectoração mas sem a presença de hiperreactividade ou de obstrução variável [546] e que, apesar da normalidade funcional na altura do diagnóstico, evoluísse rapidamente, com um declínio acentuado do FEV<sub>1</sub>, conduzindo ao desenvolvimento da DPOC [547,548,549].

#### **4-Oxidantes e Inflamação na DPOC**

A inflamação ocupa um aspecto central na DPOC [441,449,550,551] constituindo o *stress* oxidativo não só um mecanismo desencadeante como amplificador desse processo [325] através do aumento da activação dos factores de transcrição, tais como o NF- $\kappa$ B, e da proteína de activação 1 (AP-1), assim como de outras vias de sinalização da transcrição [325]. Com efeito, a inflamação crónica na DPOC encontra-se associada ao aumento da produção de vários mediadores e proteínas pro-inflamatórias, incluindo as citocinas, quimiocinas, moléculas de adesão, enzimas e receptores regulados pelos factores de transcrição génica [552,553]. Do conjunto de mediadores salientam-se, pela sua importância no processo inflamatório, o leucotrieno B<sub>4</sub> e a IL-8 face às suas capacidades quimiotácticas, assim como as citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6, mas igualmente a participação de factores de crescimento com um destaque especial para o *transforming growth factor- $\beta$*  (TGF- $\beta$ ), o qual parece ser responsável pela indução de fibrose a nível das pequenas vias aéreas [554]. Na activação celular estão envolvidos

mecanismos complexos de sinalização em que o estímulo do meio extracelular é transmitido intracelularmente através de cadeias de reacções organizadas que dependem, pelo menos parcialmente, das reacções redox [555,556]. Em condições fisiológicas o controlo da sinalização dessas reacções comporta um ligeiro desvio no sentido do aumento transitório dos oxidantes, os quais geram baixas concentrações de ROS em resposta a vários estímulos, como citocinas, factores de crescimento, angiotensina II, etc. [556], promovendo a expressão de genes envolvidos em várias funções biológicas, funcionando as ROS, neste contexto, como um segundo mensageiro.

Vários genes relacionados com os mediadores inflamatórios são regulados pelo complexo NF- $\kappa$ B (IL-1 $\beta$ , IL-8, TNF- $\alpha$ , iNOS, etc.); este faz parte da família de factores de transcrição redox sensível que controla a expressão de vários genes envolvidos nas respostas inflamatórias e de *stress* oxidativo. Na sua composição inclui um heterodímero complexo composto por duas subunidades proteicas (p50, p65). Nas células não activadas encontra-se no citoplasma, associado a uma proteína inibitória-I $\kappa$ B que impede a transmissão nuclear do sinal, prevenindo assim que o factor nuclear penetre no núcleo das células [554]. Sob o efeito de vários estímulos (citocinas e oxidantes) o I $\kappa$ B é fosforilado em dois resíduos de serina, sofre ubiquinação e é degradado no proteosoma [555,556]; o NF- $\kappa$ B é então translocado para o núcleo e liga-se a promotores de alta afinidade, iniciando-se a activação de genes alvo pro-inflamatórios.

Por esta via gera-se um aumento da inflamação, que por sua vez vai condicionar um incremento do stress oxidativo, auto perpetuando este ciclo. Neste contexto Di Stefano [557] constatou o aumento de uma das subunidades do NF- $\kappa$ B, a proteína p65, no epitélio brônquico de fumadores e de doentes com DPOC, correlacionável com o grau de obstrução. Mais recentemente, Torres [558] demonstrou o aumento da p65, mas não da subunidade p50 do NF- $\kappa$ B, no músculo esquelético de doentes com DPOC.

A inflamação sistémica crónica observada na DPOC, tanto em fumadores como ex-fumadores, tem sido implicada não só nas suas manifestações sistémicas

como igualmente no aumento do risco de mortalidade que ela comporta. Neste enquadramento, e face à importância do factor de transcrição NF- $\kappa$ B, particularmente do papel do seu repressor-*nuclear factor (NF)-repressing factor (NRF)* proteína ligada ao DNA que inibe o NF- $\kappa$ B, Lee [559] pôde demonstrar que a expressão deste factor regulador negativo se encontrava reduzida nas células mononucleares do sangue periférico dos doentes com DPOC estável, sendo esta circunstância, responsável pela produção excessiva de IL-8 /CXCL8 e, por conseguinte, pela inflamação sistémica crónica.

Ainda neste âmbito, a complexidade dos mecanismos de transcrição pode ser influenciada por vários factores (sequências de DNA, histonas, activadores, repressores, etc.) [556]. Em condições fisiológicas o DNA encontra-se condensado e firmemente ligado à volta de um octâmero que contém duas cópias de cada histona do *core* proteico do nucleosoma (H2A, H2B; H3 e H4), as quais diminuem a acessibilidade dos factores de transcrição redox sensíveis, como o NF- $\kappa$ B e a AP-1, aliás já referido. Porém, a acetilação, sob o efeito dos oxidantes, das histona-acetiltransferases (HATs) e das histonas, promove uma alteração nas cargas electrostáticas que mantêm a ligação dos aminoácidos ao DNA e uma modificação pós-translacional da molécula com exposição do genoma e relaxamento da cromatina, facilitando deste modo a acessibilidade dos factores de transcrição e da RNA polimerase II, resultando no aumento da transcrição dos genes [560]. Entretanto, este processo pode ser revertido pelas enzimas histona desacetilases (HDACs), cuja família compreende 17 isoformas [561] subdivididas em 3 famílias: a classe I inclui as HDACs (1, 2, 3, 8 e 11), que se encontram no núcleo; as da classe II compreendem as HDACs (4-7, 9, e 10) com capacidade de se deslocarem entre o núcleo e o citoplasma em resposta a estímulos; e a classe III que depende da nicotinamida adenina dinucleótido (NAD<sup>+</sup>) e é composta pelas sirtuínas de 1 a 7, as quais desempenham um importante papel nos processos de envelhecimento/senescência. Alguns dos componentes das classes I e II exercem funções nos processos de diferenciação e regulação da proliferação celular [344,349,350], com especial relevância na regulação das respostas pro-

inflamatórias na medida em que não só determinam a inibição da transcrição genética como afectam a actividade dos factores de transcrição. A tricostatina A, que é um inibidor da HDAC, aumenta a actividade do factor NF- $\kappa$ B com transcrição de genes inflamatórios em várias linhas celulares [552,560]. Neste âmbito, os processos de acetilação/desacetilação influenciam a libertação de citocinas e de factores pro-inflamatórios, como foi demonstrado por Ito [563] em relação à produção de IL-1 $\beta$  e do TNF- $\alpha$  pelos macrófagos alveolares de fumadores, sugerindo este autor um efeito modulador dos oxidantes nas HDACs e na transcrição de genes de algumas citocinas.

O desequilíbrio do balanço acetilação/desacetilação a favor do primeiro, pode conduzir ao aumento da resposta inflamatória em fumadores susceptíveis que desenvolvem DPOC, como foi demonstrado por Szulakowski [564] no tecido pulmonar de fumadores com DPOC e em fumadores sem patologia, assinalando os efeitos do tabaco na significativa degradação do I $\kappa$ B, com translocação para o núcleo do NF- $\kappa$ B e acetilação da histona H4, marcador da condensação cromatínica, da qual resulta o aumento da acessibilidade do genoma à transcrição, com o conseqüente incremento do *stress* oxidativo intracelular nos fumadores. Este autor pôde ainda constatar que nos ex-fumadores portadores de DPOC se observava um aumento na depleção do I $\kappa$ B, mas, curiosamente, não acompanhado pelo aumento da actividade de transcrição do NF- $\kappa$ B, o que é manifestamente intrigante atendendo à persistência do processo inflamatório neste grupo de indivíduos, mesmo após a cessação tabágica [565]. Ora, a exploração de outras vias de activação permitiu-lhe concluir que nos ex-fumadores a inflamação estava associada ao aumento da acetilação da histona H3 (onde se localizam os genes promotores dos mediadores pró-inflamatórios como a IL-6, o TNF- $\alpha$ , a cicloxigenase 2, etc.), explicando assim que a persistência do processo inflamatório nos ex-fumadores seria regulada pela acetilação desta, mas igualmente que a acetilação de certas classes de histonas pode desencadear um determinado tipo específico de transcrição; esta conclusão é aliás corroborada pelos trabalhos de Ito [566] que demonstrou um aumento significativo da H4 e da IL-8

em amostras do parênquima pulmonar de indivíduos fumadores e em DPOC na classe IV, demonstrando por um lado que a carga oxidativa e a hiperacetilação se correlacionavam com os maiores graus de gravidade da doença e, por outro, que eram acompanhados por uma diminuição significativa dos níveis da HDAC2 presente igualmente nos ex-fumadores com doença.

Os oxidantes parecem ter um papel relevante na modulação das HDAC e na transcrição dos genes de citocinas inflamatórias. Com efeito, em modelos animais a exposição ao fumo do cigarro revelou, a nível pulmonar, um aumento da actividade das histona-acetil transferases (HATs), a par de uma consequente diminuição da actividade das HDACs [567, 568].

A DPOC encontra-se associada a uma resposta inflamatória pulmonar anormal que persiste mesmo após a cessação tabágica [565]. Este facto constituiu uma das bases de investigação do estudo da activação de eventuais circuitos inapropriados de auto-amplificação da resposta inflamatória, os quais, ao perpetuá-la, impediriam a sua resolução em indivíduos susceptíveis ao desenvolvimento da doença.

Neste contexto assume particular relevância a participação de uma outra via pro-inflamatória representada por uma família de enzimas bem conservadas sob o ponto de vista evolutivo e que são activadas por fosforilação de resíduos específicos de treonina e tirosina em resposta a estimulações celulares - *Mutagen-Activated Protein Kinases* (MAPKs) [552,569]. Esta via pode ser activada por diversos estímulos ambientais (toxinas, oxidantes, incluindo o fumo do cigarro, luz ultra-violeta, hormonas, mitogénios, alterações do pH, osmolaridade, etc.), bem como por outros de natureza endógena (citocinas, factores de crescimento, oxidantes derivados da inflamação, etc.) [570]. Existem 3 subfamílias de MAP-cinases bem caracterizadas: as *Extracelular Signal-Regulted Kinases* (ERK1 e ERK2), as *Stress Activated Protein Kinase*, *c-Jun NH2-Terminal Protein Kinase* (JNK1, JNK2 e JNK3) e as *p38 cinases* (p38 $\alpha$ , p38 $\gamma$  e a p38 $\delta$ ) [569,570]. Genericamente, estas moléculas actuam através da fosforilação de proteínas nucleares ou citoplásmicas, regulando a expressão celular de genes; amplificam e transmitem sinais extracelulares

mediados pelos receptores ao citoplasma das células activando os factores de transcrição nuclear aos quais se ligam, induzindo a expressão de genes alvo; exercem portanto um controlo estreito de vários eventos celulares, bem como das respostas celulares rápidas a estímulos externos. Com efeito, foi identificada a interacção entre as MAP cinases e o NF- $\kappa$ B na regulação de muitos genes que medeiam a inflamação [571].

Sob o ponto de vista funcional a cascata ERK é activada pela ligação de uma proteína aos receptores e factores de crescimento implicados na proliferação, diferenciação e sobrevivência celulares. Já a JNK e a p38 são estimuladas por várias citocinas comprometidas na inflamação e na apoptose [572]. A via ERK é activada por estímulos mitogénicos, como os factores de crescimento, epidérmico (EGF) e derivado das plaquetas (PDGF). Sob o ponto de vista biomolecular desencadeia a fosforilação de uma variedade de factores de transcrição, como o *Ternary Complex Factor*-TCF do ELK-1 que se liga ao DNA, iniciando assim a transcrição de genes que como já foi referido conduzem à proliferação celular [572]. Num contexto diverso, ainda que relacionado com a DPOC, esta via desempenha um papel importante no desenvolvimento tumoral. Com efeito, estudos efectuados, quer *in vitro* quer no ser humano, demonstraram que existia uma correlação entre a incidência de cancro e a activação Ras/ERK1/2 [573,574,575].

A via JNK encontra-se principalmente envolvida no controlo da apoptose [576]. É activada pelos raios ultra-violeta, *stress* celular, TNF- $\alpha$ , IL-1, choque osmótico, factores de crescimento, variações de temperatura, etc., levando, nestas condições, à fosforilação de vários substractos, um dos quais pertence à família dos proto-oncogenes (c-fos), dando lugar a heterodímeros Jun-fos, ou homodímeros Jun, para formar o factor de transcrição AP-1 [577]. As proteínas JNK induzem ainda a fosforilação de vários substractos entre os quais o Bcl-2 mitocondrial [577].

Grande parte da informação sobre esta MAPK advém de estudos animais; neste contexto parece relevante a demonstração de que no rato *null* para JNK1 se tenham observado alterações na proliferação e diferenciação dos linfócitos

T [578] e que os linfócitos T-CD4 produzam citocinas Th2 (IL-2, IL-4), mesmo na ausência de estímulos Th2 [579].

A via MAPK p38 é constituída por uma proteína que contém uma sequência conservada dos aminoácidos prolina/serina/treonina. As quatro isoformas - p38  $\alpha$ , p38  $\beta$ , p38  $\gamma$  e p38  $\delta$  - possuem padrões funcionais e perfis celulares diferentes [570]. Os macrófagos pulmonares, por exemplo, expressam preponderantemente a isoforma  $\alpha$ , para além da  $\beta$ , não exibindo nenhuma das duas restantes [580]. Sob o ponto de vista funcional esta MAPK estabiliza os mRNAs das citocinas e quimiocinas intervenientes na patogénia da DPOC, como o TNF- $\alpha$  e as IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8 [580]. Pode ser activada não só pelo *stress* celular, mas também por factores de crescimento, ultra-violetas, hormonas, ligandos, etc. A sua activação inicia-se pela fosforilação dupla da tirosina (Tyr 182) e da treonina (Thr180) da sequência activadora, facilitando a ligação da p38 à adenosina trifosfato (ATP), com transferência do grupo fosfato da ATP à proteína alvo da fosforilação. Outro mecanismo de activação é a autofosforilação, a qual passa pela interacção da p38 com a proteína de activação-1 do TGF- $\beta$  e activação das tirosina cinases, de forma semelhante à que ocorre com a activação do TCR dos linfócitos T [582]. Estas MAPKs parecem desempenhar um papel importante na patogénia da DPOC, dado que a sua activação em determinadas grupos celulares se encontraria presente desde as fases iniciais às mais avançadas desta doença [583].

Alguns aspectos importantes desta via das MAPKs no âmbito da DPOC têm sido consubstanciados, tanto em modelos animais como em tecidos humanos, pelo reconhecimento da sua importância na patogénia do enfisema pulmonar através da demonstração do aumento da actividade da ERK1/2 nas células epiteliais e alveolares dos doentes com enfisema [584].

A capacidade de interacção entre as diferentes MAPKs foi demonstrada em vários estudos: quer através da constatação de que tanto a cascata ERK1/2 como a JNK podiam activar o NF- $\kappa$ B em monócitos e em células epiteliais das vias aéreas [585,586], quer no trabalho de Lemjabbar [587] ao reconhecer que a activação do *Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR) era necessária para

a indução do gene MUC5AC pelo tabaco e que a sua expressão podia ser desencadeada tanto pelas ROS que atravessavam a membrana e activavam a via JNK, através de um mecanismo independente do EGFR, como a partir da activação da via ERK1/2. Estas duas vias convergiam no núcleo, na AP-1, promovendo a transcrição do gene MUC5AC [588]. De facto Renda [589], ao avaliar a expressão da p38 em peças cirúrgicas de doentes com DPOC em diferentes estadios da doença, fumadores sem DPOC e em não fumadores, identificou um aumento da expressão da p38 nos macrófagos alveolares e nas paredes alveolares dos doentes com DPOC grave e nos estadios ligeiro e moderado, por comparação com os outros grupos, a qual se relacionava inversamente com a obstrução, tendo ainda observado uma correlação positiva entre o número de células p38 positivas e as células CD8<sup>+</sup> presentes nas paredes alveolares, salientando a importância da interacção entre as vias de activação dos linfócitos T e a p38.

Ainda no âmbito da inflamação que acompanha a DPOC tem sido alvo de interesse o *Receptor for Advanced Glycation End-Products* (RAGE). Trata-se de um receptor transmembranar pertencente à família das imunoglobulinas [590] que medeia as respostas à lesão celular induzida por vários estímulos, como: hiperglicemia, stress oxidativo, hipóxia, envelhecimento, etc. [591,592]. Encontra-se largamente expresso a nível pulmonar, parecendo ter uma função homeostática [593]. Liga-se a várias *Damage-Associated Molecular Patterns* (DAMP), também conhecidas por alarminas. Estas são libertadas no contexto da lesão celular (infecciosa, traumática, necrose celular, etc.). Outros exemplos de alarminas são representados pelo ácido úrico, DNA, proteínas de choque térmico (HSP), etc. [594]. A proteína nuclear *High Mobility Group Box 1* (HMGB1) regula a transcrição e constitui um dos ligandos da RAGE; outros exemplos desses ligandos integram os membros da família das proteínas S100, os *Advanced Glycation End Products* (AGEs) e a amiloide sérica A (SAA) [595]. Quando estes ligandos se unem ao RAGE inicia-se uma cadeia pró-inflamatória. O RAGE intervém na diabetes complicada, na aterosclerose e na artrite reumatoide [596,597]. Parece ter uma importante função na

organização tecidual, bem como na proliferação e migração de fibroblastos e células alveolares epiteliais. É por isso considerado um marcador das células epiteliais alveolares de tipo I [598,599,600]. Possui várias isoformas, incluindo uma solúvel (sRAGE) que funciona como um *receptor isco*, promovendo a união dos ligandos do RAGE no líquido extracelular e protegendo assim os tecidos da inflamação e da lesão. No homem, a doença coronária [601] e a artrite reumatoide [602] estão associadas à diminuição da concentração da sRAGE, pelo que esta tem sido proposta como um marcador do deficiente controlo inflamatório [602]. Na DPOC tanto a expressão do RAGE como da HMGB1 estariam aumentadas nas vias aéreas dos fumadores com e sem doença [603]; esta última parece correlacionar-se com a percentagem de neutrófilos, sugerindo uma capacidade quimiotáctica para estas células. Destaca-se ainda, nestas circunstâncias, o facto de os níveis de SAA se apresentarem igualmente elevados na DPOC [604] em franco contraste com os níveis do receptor solúvel do RAGE, o qual tem propriedades anti-inflamatória e se encontra diminuído no soro destes doentes, parecendo correlacionar-se fortemente com a gravidade da obstrução aérea [605].

### **5-Oxidantes/ Sensibilidade do Receptor dos Glucocorticoides**

O *stress* oxidativo pode interferir com a via de activação do receptor dos glucocorticoides. Na verdade, é reconhecida a fraca resposta do processo inflamatório aos corticosteróides na DPOC, pois tanto a expressão como a actividade da HDAC-2 se encontram diminuídas nos portadores da doença sem que se verifique qualquer alteração na actividade das acetiltransferases. A supressão induzida pelos glucocorticoides na transcrição dos genes inflamatórios requer o recrutamento da HDAC-2 na activação do complexo de transcrição do receptor do glucocorticoide [560,563], do qual resulta a desacetilação das histonas e a diminuição da transcrição de genes inflamatórios. Tanto o fumo do tabaco como o *stress* oxidativo em geral alteram a função da HDAC2 [563]. Pensa-se, pois, que um dos mecanismos possíveis

para explicar essa resistência reside na baixa concentração de HDAC2 devida à degradação oxidativa induzida pelas ROS/RNS como o peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ), a acroleína e o 4-HNE [568]. Esta resistência pode no entanto ser revertida, através da activação selectiva da HDAC2 pela teofilina, que permite restaurar os níveis de HDAC2 nos macrófagos dos doentes com DPOC, por um mecanismo que envolve a inibição selectiva da enzima PI 3K $\delta$ , a qual é activada pelo *stress* oxidativo nos doentes com DPOC [606]. Alguns antioxidantes, como os polifenóis naturais, a curcumina e o resveratrol, podem restaurar a função dos glucocorticoides através da protecção da HDAC2 [607]. Outras estratégias advêm do reconhecimento da importância, por exemplo, da proteína transmembranar designada por P-glicoproteína (P-gp) que promove a extrusão dos glucocorticoides das células, influenciando assim, as concentrações intracelulares destes, tendo-se constatado que o gene que codifica a Pgp - o *Multidrug Resistance Gene* (MDR1) - que na circunstância de se encontrar altamente expresso, explicaria a resistência nas doenças inflamatórias [608]; daí, portanto, o interesse na utilização de potenciais inibidores da Pgp. Por outro lado salienta-se ainda o contributo do *Macrophage Migration Inhibitory Factor* (MIF), o qual, para além de citocina pro-inflamatória, tem efeitos anti-glucocorticoides podendo vir a constituir um alvo de eventuais inibidores ou de anticorpos monoclonais [609].

## **6-Stress Oxidativo e Balanço Proteases/Antiproteases**

O desequilíbrio da relação proteases/antiproteases a nível pulmonar constitui um aspecto central da patogenia do enfisema pulmonar em fumadores. Esta concepção tem por base a constatação do desenvolvimento precoce desta patologia em doentes portadores de défice em  $\alpha_1$ -Pi, enquanto principal inibidor da elastase neutrofílica [610]. No caso dos fumadores com níveis normais desta antiprotease a carga elastolítica resultaria do aumento de recrutamento de leucócitos ao pulmão, com inactivação oxidativa funcional da  $\alpha_1$ -Pi. Esta deficiência funcional seria assim, uma consequência da inactivação da

antiprotease com origem na oxidação do resíduo de metionina pelos oxidantes, tornando-a inactiva.

Os macrófagos dos fumadores libertam quantidades acrescidas de ROS que promovem a inactivação da anti-protease *in vitro* [611]. Aliás, estudos iniciais revelaram que a função da  $\alpha_1$ -Pi no LBA se encontrava diminuída em cerca de 40% nos fumadores em relação aos não fumadores [611] e, por isso, a degradação da elastina seria o mecanismo fundamental da destruição alveolar do pulmão. Contudo, tem-se reconhecido o aumento da expressão das metaloproteinases nos pulmões enfisematosos [612, 613] provenientes das células inflamatórias (neutrófilos e macrófagos). As metaloproteinases são uma família que compreende pelo menos 20 enzimas proteolíticas, as quais têm uma participação essencial no *remodeling* tecidual e na reparação associada ao desenvolvimento e inflamação [612]. Promovem a degradação do colagénio, da laminina e da elastina. Consoante a especificidade do substracto e a semelhança dos aminoácidos, entre outros factores, podem ser subdivididas nas seguintes classes: as collagenases (MMP-1,-8,-13), as gelatinases (MMP-2,-9), as estromalinas (MMP-3,-10,-11), as do tipo membranas (MMP-14 a MMP-25), as matrilisinas (MMP-7) e a metaloelastase macrofágica (MMP-12) [614].

Como a MMP12 é produzida predominantemente pelos macrófagos alveolares e degrada a elastina, tem sido considerada importante no enfisema pulmonar, podendo ser isolada na expectoração, LBA, biópsias brônquicas e no tecido pulmonar periférico de doentes com enfisema avançado [615,616]. Para além dos macrófagos alveolares a MMP-12 expressa-se também nas células dendríticas pulmonares e nas derivadas da medula óssea, como foi constatado no modelo animal após estimulação com LPS ou extrato do cigarro [617], desconhecendo-se o seu significado. Outras metaloproteinases, como a MMP-9 e a MMP-2, encontram-se expressas no pulmão com DPOC; no entanto o papel da MMP-9 no estabelecimento do enfisema não está clarificado, já que o rato sem MMP-9 não se encontra protegido do desenvolvimento do enfisema [612]. Aliás, a evidência do envolvimento da MMP-9 na DPOC advém mesmo

do aumento da sua expressão no tecido pulmonar dos doentes [618]. Quanto às colagenases, a MMP-1 parece ter influência no desencadeamento do enfisema, dado o aumento da sua expressão nos pulmões dos doentes com DPOC, comparativamente aos dos controlos [619], existindo até alguma evidência da participação desta colagenase na patogenia do enfisema [620], pois apesar da definição histopatológica desta afecção não comportar a fibrose [621] parece ocorrer no enfisema avançado uma deposição de colagénio [622]. Um outro aspecto a ter em consideração é o impacto que os efeitos do *remodeling* da matriz extracelular pode ter no processo inflamatório alveolar, dado que a elastina fragmentada pela acção da MMP-12 tem propriedades quimiotácticas para os monócitos, assim como o peptídeo derivado do colagénio da destruição da matriz extracelular, que induz uma chamada de neutrófilos, produzindo assim um aumento do processo inflamatório pulmonar dependente da activação do receptor quimioquinético CXCR2 [623]. Outro mecanismo envolvido no estabelecimento do enfisema está associado à libertação de substâncias líticas, como as perforinas e a granzimas provenientes dos linfócitos T-CD8, como foi evidenciado no LBA de doentes com DPOC [624]. Ainda neste contexto, salienta-se a ineficácia dos processos de reparação, pois o fumo do cigarro parece inibir, quer a síntese, quer a deposição, tanto da elastina como do colagénio [625], assim como a capacidade proliferativa em cultura dos fibroblastos dos doentes com enfisema [626].

Mas o fumo do tabaco tem igualmente efeitos nefastos tanto sobre as células endoteliais como nos seus precursores, aos quais acresce ainda a indução de senescência nas células epiteliais alveolares [627,628]; considerados no seu conjunto, existe uma multiplicidade de factores que conduzem à irreversibilidade do estabelecimento das lesões enfisematosas. Entretanto, e apesar da inibição da reparação fibroblástica induzida pelo tabaco, observa-se a presença de uma fibrose peribronquiolar, a qual tem sido atribuída à produção de factores de crescimento libertados na parede das pequenas vias aéreas, particularmente do TGF- $\beta$  [629], e que parece surgir como uma

reação paradoxal ao desaparecimento do parênquima pulmonar.

## 7-Apoptose

A apoptose constitui um processo estritamente regulado de morte celular através do qual são removidas as células nocivas ou indesejáveis permitindo a resolução do processo inflamatório [630]. Na sua regulação encontram-se envolvidas as caspases [631]. Este processo é fundamental para a manutenção da homeostasia tecidual, estando em equilíbrio com a proliferação e diferenciação, sendo importante para a manutenção da homeostasia tecidual.

Na DPOC o balanço entre a apoptose e a proliferação encontra-se perturbado, como foi demonstrado por vários autores ao constatarem, quer um aumento da apoptose das células endoteliais em amostras de pulmão provenientes de indivíduos com DPOC [632], quer das células epiteliais alveolares, endoteliais e mesenquimatosas no enfisema, a par de um aumento da actividade das caspases e da expressão das proteínas pró-apoptóticas, Bax e Bad, enquanto que a proteína anti-apoptótica Bcl-2 era indetectável no tecido pulmonar enfisematoso [633]. Também a expressão do *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), que tem um papel importante na manutenção das estruturas alveolares, bem como do seu receptor VEGF R2, encontram-se significativamente diminuídos no enfisema pulmonar [634].

Neste contexto Hodge [635] descreveu um aumento da apoptose das células epiteliais alveolares e das células T no escovado brônquico e no LBA de doentes com DPOC. Este autor pôde ainda demonstrar não só a persistência da apoptose das células epiteliais das vias aéreas, mesmo após a cessação tabágica, como um aumento da mesma nos linfócitos T do sangue periférico dos doentes.

Outros investigadores [636,637] procuraram estudar indirectamente a citotoxicidade dos linfócitos T-CD8, particularmente da perforina, na indução da lise e apoptose das células epiteliais, constatando que a apoptose das células

alveolares nos fumadores com enfisema aumentava com a carga tabágica e com o número de linfócitos T-CD8.

No seu conjunto, estas investigações assinalam a preponderância do processo apoptótico das células estruturais pulmonares nos doentes com DPOC e a sua importância no desenvolvimento do enfisema. A associação, quer a uma proteólise excessiva e ao *stress* oxidativo, quer à inflamação, permitem explicar a destruição observada nesta patologia [638]. Por outro lado, a apoptose das células endoteliais é responsável pela diminuição da expressão do VEGF e as alterações da microcirculação que resultam dos danos endoteliais apontam para a promoção da apoptose dos pneumócitos perpetuando este ciclo. A diminuição da expressão do factor de crescimento vascular endotelial parece ser mediada indirectamente pelo *stress* oxidativo, como apontam os resultados do trabalho de Tuder [639] que demonstrou que a apoptose predominava nas áreas de *stress* oxidativo e que o bloqueio da primeira, através dum inibidor da caspase, reduzia a expressão dos marcadores da oxidação, sugerindo a interacção entre a apoptose das células alveolares e o *stress* oxidativo.

Por outro lado, o aumento da actividade elastolítica detectado nas células epiteliais apoptóticas [638] favorece e amplifica a destruição da elastina.

A função de manutenção do equilíbrio da apoptose encontra-se assim extensivamente alterada na DPOC, dado que os seus efeitos se encontram ainda amplificados pela diminuição da *clearance*, com persistência das células apoptóticas e dos seus produtos, contribuindo para a amplificação da inflamação, como foi demonstrado por Hodge [640].

A DPOC acompanha-se igualmente de perturbações sistémicas. Neste contexto vários autores têm descrito alterações da apoptose, quer na circulação sistémica, quer nos músculos esqueléticos dos doentes com esta afecção. São disso exemplos o aumento da propensão para apoptose dos linfócitos T periféricos nos doentes com DPOC [635] acompanhada pelo aumento da expressão de mediadores implicados na indução da apoptose

destas células, como o TNF- $\alpha$ /TNFR, Fas e TGFR. Para estes autores, a apoptose excessiva associava-se a uma *clearance* deficiente, contribuindo para a manutenção da inflamação. Outros investigadores [641] destacam a elevação significativa dos níveis de TNF- $\alpha$ , bem como dos receptores TNF - R55 e R75, no sangue dos doentes com DPOC.

Ainda neste âmbito, Noguera [642] demonstrou uma activação anormal dos neutrófilos apoptóticos circulantes nos doentes com DPOC; este achado sugere que mesmo durante o processo da apoptose estas células podem danificar os tecidos, dificultando o reconhecimento e a sua remoção por parte dos macrófagos. Neste contexto Brown [643] demonstrou que a apoptose destas células estava diminuída na DPOC estável e no grupo controlo de fumadores sem doença, devido à activação do NF- $\kappa$ B.

A perda de peso e a fraqueza muscular devida à atrofia é comum nos doentes com DPOC, afectando seriamente a qualidade de vida dos doentes. Um dos mecanismos assinalados é a diminuição do número das fibras musculares por activação da via apoptótica. De facto, Agusti [644] referenciou um aumento da apoptose dos músculos esqueléticos dos portadores de DPOC, sobretudo nos doentes com baixo índice de massa corporal (IMC), quando comparados com os portadores de um IMC normal. Por outro lado, pôde ainda constatar que a apoptose dos músculos esqueléticos se associava a uma baixa tolerância ao exercício, para níveis similares de obstrução. Têm sido detectadas anomalias mitocondriais no músculo esquelético na DPOC [645,646,647]: o aumento da actividade da citocromo oxidase e a presença de alterações bioenergéticas significativas. Assim, a perda de massa muscular parece estar na dependência da citocina TNF- $\alpha$  consecutiva à estimulação da apoptose através da sua interacção com o receptor presente no músculo [648].



## CAPÍTULO VII

### **ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS E INFLAMATÓRIAS DAS VIAS AÉREAS E DO PARÊNQUIMA PULMONAR**

A complexa natureza multifactorial e poligénica da DPOC, a par da heterogeneidade da sua expressão clínica, tem dificultado um completo conhecimento da sua patogenia.

As alterações estruturais e funcionais pulmonares parecem resultar das interações de um conjunto de mecanismos patogénicos que compreendem os desequilíbrios no balanço oxidantes/antioxidantes, proteases/antiproteases, alterações imunológicas e dos processos de reparação, constituindo redes complexas e interligações das quais conhecemos apenas algumas vias. Esta aparente complexidade a nível local é ainda dificultada pela presença de uma inflamação sistémica que pode não só modular a doença, como ser responsável pelo desenvolvimento de manifestações sistémicas, e/ou eventualmente agravar comorbilidades, com impacto importante tanto na sobrevida como na qualidade de vida destes doentes e nas opções terapêuticas.

Sob o ponto de vista fisiopatológico as alterações pulmonares nos fumadores com DPOC estável compreendem a inflamação das vias aéreas centrais e

periféricas bem como a inflamação e destruição dos espaços aéreos para além dos bronquíolos terminais (enfisema) [649,650]. As consequências funcionais destas alterações traduzem-se nas vias aéreas de maior calibre por uma hipersecreção de muco, circunstância que originou a definição clínica da bronquite crónica expressa por tosse e expectoração pelo menos três meses no ano durante dois anos consecutivos [650,651]. Já as consequências funcionais das alterações das pequenas vias aéreas e do parênquima pulmonar, consideradas as principais responsáveis pela limitação do fluxo aéreo, resultantes quer da obstrução quer do aumento das resistência das pequenas vias (bronquiolite crónica), do colapso expiratório precoce durante a expiração destes canais aéreos devido à perda das ligações bronquíolo-alveolares [652] e ao nível do parênquima pulmonar pela perda da capacidade de retracção elástica, subjacente ao enfisema [653], que para Fry [654] seria responsável pela limitação aérea numa minoria de doentes, já que a maioria apresentaria anomalias tanto a nível das vias aéreas como do parênquima. A perda da retracção elástica e a diminuição da condutância parecem correlacionar-se com a destruição tecidual e com a diminuição de calibre das vias aéreas nos portadores de doença avançada [655].

### **1- Alterações Estruturais e Inflamatórias das Vias Aéreas e do Parênquima Pulmonar**

As alterações das células estruturais do aparelho respiratório sob a acção do fumo do tabaco podem representar, numa visão simplista, o resultado final da agressão do aparelho respiratório, reduzindo-a ao binómio causa-efeito, ou introduzir nesta premissa as interacções complexas da dinâmica biológica, constituindo, segundo Puchelle [656], uma forma de autoprotecção e de reparação das lesões induzidas pelo tabaco.

Nas vias aéreas centrais a resposta do epitélio à agressão traduz-se pela transformação do epitélio cilíndrico ciliado numa metaplasia escamosa, com comprometimento da *clearance* mucociliar e com o aumento do risco de

desenvolvimento do carcinoma [657]. A este nível as alterações estruturais observadas pela maioria dos autores foram correlacionadas com a intensidade do consumo tabágico (maços/dia) [658]; com efeito, no estudo de Laperre [659], a metaplasia escamosa encontrava-se presente em 46 % dos fumadores activos e em 23% dos ex-fumadores.

Nas pequenas vias aéreas a metaplasia escamosa parece não só aumentar com a gravidade da doença, como contribuir para a fibrose peribronquiolar através da secreção da interleucina-1 $\beta$  e da activação dos fibroblastos, com aumento de produção do *Transforming Growth Factor* (TGF- $\beta$ ), que amplifica a transformação patológica epitélio-mesenquimatosa [660].

A hipertrofia do músculo liso correlacionar-se-ia inversamente com a função pulmonar [661], encontrando-se significativamente aumentada (cerca de 50%) nos portadores de doença grave e muito grave [662]. Para além da função contráctil, esta estrutura pode expressar citocinas, quimiocinas, factores de crescimento e proteases, pelo que participa activamente nos processos de inflamação e *remodeling* [663, 664, 665].

A hiperplasia das glândulas mucosas, com manutenção da estrutura da membrana basal epitelial, ocorre na maioria dos doentes com obstrução fixa [666,667], embora existam relatos do aumento da espessura da membrana basal num subgrupo de doentes portadores de DPOC que exibiam um perfil inflamatório marcadamente eosinofílico, como foi salientado por Chanez [668]. A hiperplasia glandular está na base da hipersecreção mucosa crónica que tem sido responsabilizada, quer pelo excessivo declínio anual do FEV<sub>1</sub>, quer pelo risco de agudizações e ainda pelo desenvolvimento da própria DPOC [669], encontrando-se presente tanto nas vias aéreas de maior calibre como nas pequenas vias dos doentes com bronquite crónica [670] e traduzida por um aumento da expressão da mucina MUC5AC acompanhada de uma diminuição da expressão da MUC5B [671] nas primeiras, enquanto que ao nível das pequenas vias aéreas ocorre um aumento da expressão da MUC5B no lúmen e da mucina MUC5AC no epitélio bronquiolar [672].

As células caliciformes têm sido associadas à inflamação por neutrófilos,

através da qual a elastase neutrofílica e a catepsina G actuariam como secretagogos ao promoverem a desgranulação dessas células [673]. Com efeito, os genes das mucinas parecem estar sob os efeitos regulatórios, tanto da inflamação (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) e de estímulos oxidantes (tabaco, biomassa) como de agentes patogénicos infecciosos respiratórios através, sobretudo dos seus componentes lipídicos [674].

A obstrução das pequenas vias aéreas por exudatos muco-inflamatórios foi considerada inicialmente como um artefacto *post mortem*; no entanto, estudos efectuados em peças operatórias de ressecção *in vivo* confirmaram não só a sua existência como a sua associação de forma independente, com a redução do fluxo aéreo nos doentes com DPOC submetidos a cirurgia [675]. Ainda neste âmbito salienta-se o facto de também estes canais aéreos sofrerem a perda de fibras elásticas, fenómeno bem reconhecido a nível estritamente alveolar no enfisema, e do qual se pôde inferir que também estas vias podiam vir a desaparecer [676]. Este facto foi demonstrado por Hogg [677] ao constatar a existência de uma diminuição do número das pequenas vias de condução nos portadores de enfisema centrolobular através da microtomografia computadorizada, e que esta redução numérica contribuía, sob o ponto de vista funcional, para o aumento da resistência das vias aéreas, expresso através de modelos matemáticos computacionais que lhe permitiram concluir que uma perda de 50% destas vias tinha como consequência imediata uma duplicação da resistência. Este importante achado anátomo-funcional pode ainda conduzir à assunção de que esta alteração das pequenas vias venha preceder o desenvolvimento do enfisema e recentrar o problema da detecção precoce desta afecção.

A presença de folículos linfóides nas vias aéreas dos doentes portadores de DPOC, já reconhecida desde a década de noventa [678], veio despertar um novo interesse pela eventual participação patogénica destas estruturas, detectadas tanto nas formas ligeiras e moderadas [679] como nas formas mais graves [680] da doença, distribuindo-se não só ao nível das pequenas vias aéreas mas igualmente no parênquima pulmonar e reproduzidas no modelo

murino quando exposto cronicamente ao fumo do tabaco [681]. Estruturalmente, estes folículos [681,682,683] são constituídos por agregados de células B rodeados por linfócitos T-CD4 (80 a 90%), por CD8 e por células dendríticas foliculares. Uma parte importante do infiltrado é composto por células CD27 positivas, que são um marcador de memória das células B [684], e sabe-se que estes folículos possuem um centro germinativo [685]. Estas estruturas são reconhecidas por alguns autores como órgãos linfóides terciários (TLOs) [686, 687] resultantes de uma neogénese linfóide e portanto considerados como um tecido linfóide ectópico, que se desenvolveria em situações de inflamação crónica associada a infecção ou a autoimunidade [686, 688], e que no caso da DPOC envolveriam tanto as vias aéreas como o parênquima pulmonar. Sob o ponto de vista da sua arquitectura assemelham-se aos órgãos linfóides secundários, com uma área B distinta (folicular), áreas de células T (paracórtex) e vénulas endoteliais que regulam o extravasamento das células; no entanto, não são capsulados nem possuem vasos linfáticos aferentes [680]. Os linfócitos B isolados dos folículos apresentam características de oligoclonalidade, o que sugere uma indução antigénio-específica [681].

A presença em maior número e a distribuição destas estruturas nos portadores de DPOC sugerem que elas desempenhem um papel importante na resposta imune adaptativa [689] face à colonização/infecção das vias aéreas inferiores, tão frequentes nestes doentes [690]. De facto, parece admissível que a reactividade das células B e T se dirija preferencialmente contra os antigénios bacterianos/virusais que colonizam e/ ou infectam a maioria destes pacientes; por outro lado, o aumento das exacerbações nas fases mais graves da doença parece consentâneo com o aumento paralelo dos folículos linfóides observados no *end stage* da DPOC. Outro dos mecanismos apontado na génese destes folículos linfóides é a autoimunidade. Com efeito, o ambiente inflamatório crónico que acompanha a doença, traduzido pelo recrutamento de células inflamatórias e pela lesão tecidual, favoreceria a iniciação e/ou manutenção de respostas imunes locais, quer contra os componentes resultantes da

degradação da matriz extracelular (ácido hialurónico, colagénio, elastina, etc.), como foi demonstrado por Lee [691] através da presença de anticorpos anti-elastina no plasma e de células B produtoras de anticorpos anti-elastina no tecido pulmonar de doentes enfisematosos, quer ainda contra componentes do tabaco susceptíveis de desencadear uma acção imunogénica, através da sua ligação à matriz extracelular que desencadearia uma resposta mediada por anticorpos; estes, ao ligarem-se a antigénios presentes constituiriam complexos imunes que se estiverem unidos à matriz serão envolvidos no processo inflamatório tendente à sua remoção, embora esta reacção possa atingir igualmente outros componentes. Assim, a degradação directa ou indirecta da matriz mediada por anticorpos pode resultar na formação de *novos antigénios*, perpetuando o processo inflamatório e a destruição tecidual [691,692].

A nível do parênquima pulmonar, o alargamento dos espaços aéreos com destruição das paredes alveolares, não associado a fibrose significativa, configura sob o ponto de vista patológico o enfisema pulmonar [693]. Desta definição ressaltam dois aspectos centrais: a destruição e a irreversibilidade do processo patológico. De facto, comparativamente às vias aéreas e sob o mesmo estímulo tabágico, existe uma divergência de comportamentos nestes dois territórios: enquanto que no primeiro se assiste a uma proliferação celular, no segundo o tecido alveolar vai desaparecendo sob o efeito de vários mecanismos que convergem na destruição estrutural alveolar. Neste âmbito têm sido assinalados como particularmente relevantes: o *stress* oxidativo, a proteólise da matriz extracelular, a apoptose das células alveolares, a inflamação e a senescência, entre outros [694,695,696,697].

A matriz pulmonar compreende duas componentes principais: a de compartimento de suporte, constituída por uma estrutura complexa de proteínas e glicoproteínas, da qual fazem parte os vários tipos de colagénio, a elastina, a fibronectina, a laminina, a heparina e os proteoglicanos, onde habitam células e vasos; e a componente funcional, que alberga factores de crescimento - citocinas e quimiocinas - que participam activamente tanto nos

processos fisiológicos como patológicos que ocorrem neste território [698], conferindo a esta estrutura uma composição complexa e dinâmica.

Os vários constituintes da matriz extracelular podem sofrer degradação sob a acção das metaloproteinases [699]. Estas enzimas proteolíticas, que geralmente actuam em conjunto e que foram associadas sobretudo à degradação e ao *remodeling* (angiogénese, desenvolvimento ósseo, cicatrização, etc.) [700], são presentemente consideradas como proteases multifuncionais [701], desempenhando papéis importantes nas doenças inflamatórias crónicas e no cancro [702]. No contexto da DPOC, e particularmente no desenvolvimento do enfisema pulmonar, a reformulação da teoria do balanço proteases/antiproteases veio a incluir as metaloproteinases [703]. Esta inclusão ficou a dever-se a um conjunto alargado de dados provenientes de modelos animais [704, 705] que demonstraram a importância destas enzimas, não só na destruição do parênquima pulmonar, como na iniciação, manutenção e modulação do processo inflamatório desencadeado pelo tabaco.

Neste contexto, a MMP-1 ou colagenase intersticial-1, segregada a nível pulmonar pelas células epiteliais brônquicas, pelos pneumócitos tipo II e pelos macrófagos alveolares, tem actividade alargada contra os colagénios tipos I, II, III, VII, X, gelatina, pró-MMP-2 e pró-MMP-9 [698]. No animal transgénico (rato) que expressava a nível pulmonar um aumento da MMP-1 humana [706] constatou-se o desenvolvimento precoce de enfisema, o mesmo se verificando, embora mais tardiamente, no heterozigoto do mesmo modelo que apresentava igualmente uma diminuição do colagénio tipo III associado a um aumento da *compliance* pulmonar [706]. Estes achados vieram assinalar a importância de outros componentes da matriz, para além da elastina, e da influência da perda do colagénio tipo III no enfisema. Na DPOC, a expressão génica da MMP-1 parece aumentar no parênquima pulmonar a par da gravidade da doença (GOLD) [707].

A MMP-9 é uma gelatinase segregada pelas células epiteliais brônquicas, pelos neutrófilos, eosinófilos, mastócitos e macrófagos alveolares; possui uma

actividade alargada contra vários substratos, como os colagénios IV, V, VII, X e XIV, a gelatina, a elastina e as pró-MMP-9 e pró-MMP-13 [701]. A sua expressão pode ser induzida pelas interleucinas IL-13 e IL-8 [698, 708]. Ainda neste âmbito, a MMP-9 pode activar o TGF- $\beta$  que por sua vez irá activar a produção e a secreção da MMP-9 [709,710]. A pesquisa da participação desta metaloproteinase na DPOC permitiu coligir um conjunto de dados que se estende desde o aumento dos seus níveis plasmáticos nos portadores de enfisema associado à deficiência em  $\alpha_1$ -Pi, correlacionando-se esses valores negativamente com o FEV<sub>1</sub>, com a DLCO e com saturação [711]. Outros estudos [708,712] reportaram o seu aumento na expectoração induzida de fumadores, com e sem obstrução brônquica, assistindo-se à manutenção de valores elevados mesmo após a cessação tabágica. Atkinson [713] demonstrou que em pulmões humanos afectados por enfisema a principal fonte da MMP-9 residia nos macrófagos alveolares.

A MMP-2 é uma gelatinase cujos substratos são os colagénios I, II, III,IV, V, VII, X, XI e XIV, para além da gelatina, elastina e fibronectina [701]; é segregada fundamentalmente pelas células epiteliais brônquicas e pelas células musculares lisas das vias aéreas onde desempenha um importante papel na proliferação celular [701,710]. A participação na DPOC foi demonstrada pela sua presença em valores aumentados nos pulmões de doentes, sobretudo a nível dos macrófagos alveolares e das células epiteliais das vias aéreas [714].

Quanto à participação da MMP-12 (metaloproteinase da matriz), cuja expressão se encontra aumentada em animais expostos ao fumo do tabaco [715,716], para além da destruição da matriz promove um aumento de citocinas pro-inflamatórias, como a IL-8 (em cultura de células epiteliais) [717], e do TNF- $\alpha$  [718]. Ainda no modelo animal, Le Quément [719] demonstrou que a inibição selectiva da MMP-12 reduzia o número de neutrófilos e de macrófagos na lavagem alveolar, associado a uma diminuição dos receptores do TNF, da *Macrophage Inflammatory Protein* (MIP-1 $\gamma$ ), da IL-6, do inibidor tecidual da metaloproteinase (TIMP-1) e da pró-MMP-9.

A destruição das fibras de elastina, apontada como o paradigma da destruição

alveolar [720,721,722], resulta fundamentalmente das acções das elastase neutrofílica e das metaloproteinases (MMP-12, MMP-8, MMP-9), das catepsinas S e L dos macrófagos e da proteinase-3 dos neutrófilos, que ao ultrapassarem a capacidade anti-proteásica pulmonar promovem a sua destruição. Por outro lado os fragmentos de elastina provenientes dessa actividade proteolítica têm capacidade quimiotáctica para monócitos, aumentando a inflamação e, através dela, a carga proteásica que é responsável por uma destruição sustentada do parênquima pulmonar [723,724]. Ainda neste contexto a reparação deste processo, através de uma eventual resíntese e da acumulação de colagénio e elastina são não só inibidas pelo tabaco [725], como este parece ser responsável por alterações fenotípicas dos fibroblastos, diminuindo-lhes a capacidade proliferativa e a resposta ao TGF- $\beta$ 1 (reconhecido pelos seus efeitos estimulatórios na proliferação de fibroblastos *in vivo* e *in vitro* e, portanto, implicado nos processos normais de cicatrização), como foi demonstrado por Zhang [726]. Entretanto, vários estudos [727,728] têm referido um aumento da síntese de elastina nos pulmões enfisematosos, quer em modelos animais quer em humanos. Com efeito, Deslee [729] demonstrou que a expressão da elastina mRNA se encontrava significativamente aumentada nas paredes alveolares dos doentes com DPOC muito grave, pelo que se poderá concluir que este aumento da síntese da tropoelastina não seja suficiente para compensar a degradação proteolítica e a destruição, reflectindo em última análise o comprometimento dos mecanismos de reparação.

Outros estudos [696,730,731] têm assinalado a incapacidade de manutenção da estrutura alveolar e a apoptose como mecanismos contributivos para o desenvolvimento do enfisema; de facto, Kasahara [732] demonstrou que a apoptose septal alveolar se acompanhava de uma diminuição da expressão, tanto do VEGF como do seu receptor 2, no pulmão enfisematoso. Em modelos animais foi igualmente constatado que o bloqueio do receptor do VEGF se associava ao desenvolvimento de enfisema [704]. Estes resultados parecem sugerir que a perda dos factores de manutenção das células endoteliais pode

contribuir igualmente para a patogenia do enfisema. Por outro lado, foram-se acumulando dados sobre a importância da apoptose das células estruturais na patogenia do desaparecimento do parênquima pulmonar. Segura-Valdez [714] descreveu um aumento da apoptose das células endoteliais em amostras de tecido pulmonar de portadores de DPOC por comparação com controlos sem doença e Imai [733] constatou não só um aumento de células apoptóticas (epiteliais alveolares, endoteliais e mesenquimatosas), como de subunidades da caspase e a expressão de proteínas pró-apoptóticas (Bax e Bad) nos doentes com enfisema, em clara oposição aos achados nos controlos. Este autor pôde ainda demonstrar a presença de um aumento da proliferação celular; este facto viria a ser corroborado posteriormente por Aoshiba [734] ao demonstrar um aumento significativo da proliferação das células alveolares em doentes com enfisema pulmonar, através dos marcadores de proliferação - *Proliferating Cell Nuclear Antigen* (PCNA) - e da topoisomerase II  $\alpha$ . Tais dados permitiram concluir que a apoptose poderia explicar a progressão da destruição parenquimatosa mesmo após a cessação tabágica, enquanto que a proliferação explicaria a razão pela qual não se assiste a uma total destruição do parênquima nestes doentes.

No entanto, a indução da morte das células estruturais pulmonares (epiteliais, endoteliais e eventualmente dos fibroblastos septais) como resposta à agressão tabágica devida, quer à perda de factores de crescimento quer ao *stress* oxidativo, parece constituir uma consequência final, dado que as células pulmonares podem responder à agressão activando mecanismos de pró-sobrevivência, como a autofagia [735,736,737]. Neste âmbito vários autores [736,738,739] têm defendido que seria devido à persistência da activação deste processo e à incapacidade em o completar que se originaria o *stress* celular responsável pela activação das caspases e pela apoptose das células pulmonares.

Ainda neste contexto têm sido descritas alterações na remoção das células apoptóticas pelos macrófagos residentes (eferocitose) nos doentes com DPOC através de vários mecanismos, entre os quais se incluem: os efeitos directos do

tabaco sobre as células fagocitárias pulmonares, que parecem persistir durante muito tempo após a cessação tabágica [740,741]; os efeitos inibitórios da elastase neutrofílica e da MMP 12 no reconhecimento das células apoptóticas por parte dos macrófagos, por clivagem dos seus receptores [742]; e a diminuição da expressão das proteínas A e D do surfactante pulmonar nos pulmões dos fumadores [743, 744], que em condições normais aumentam a remoção das células apoptóticas. Assinala-se ainda o efeito inibitório sobre os macrófagos do factor de necrose TNF- $\alpha$  que se encontra manifestamente expresso nas situações de doença obstructiva crónica [745,746].

Todos estes factores, no seu conjunto, concorrerem para uma deficiente remoção daquelas células, o que conduziria à citólise pos-apoptótica (ou necrose secundária) com libertação dos constituintes celulares com actividades pro-inflamatória, proteolítica e eventualmente até pro-imunogénica [747], mantendo e amplificando o processo inflamatório, em vez de contribuir para a sua resolução. Esta via tem vindo a ser investigada, apoiada no conceito de que a não resolução da inflamação (catabase) contribui para a progressão da doença e pode constituir um obstáculo à eficácia da terapêutica anti-inflamatória nestes doentes. Com efeito, a resolução da inflamação é um processo complexo que parece envolver a actuação coordenada e dinâmica de mediadores lipídicos específicos (lipoxinas, protectinas e resolvinas), várias proteínas de reparação - *Tissue Growth Factor*- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), VEGF, *Hepatocyte Growth Factor* (HGF) -, os receptores nucleares com efeitos anti-inflamatórios, como o peroxisoma e os receptores de activação proliferativa (PPAR), e a remoção das células apoptóticas pelos macrófagos (eferocitose) [748,749,750, 751,752]. Neste sentido se inscreve o trabalho de Noguera [753] que demonstrou em amostras de tecido pulmonar uma redução da expressão do receptor de superfície CD44 nos macrófagos alveolares dos portadores de DPOC, assim como uma diminuição da secreção macrofágica do TGF-  $\beta$ , já assinalada [754] por este grupo, realçando a importância do papel dos macrófagos na resolução da inflamação. Neste âmbito subsistem ainda muitas lacunas e provavelmente estarão envolvidos vários mecanismos;

objectivamente existirá na DPOC um aumento significativo da apoptose [755,756,757]. Por outro lado, a proliferação celular não parece acompanhar a taxa de destruição no enfisema como foi demonstrado por Imai [733] que constatou a existência de uma correlação inversa entre a área pulmonar e a apoptose, assim como a ausência de qualquer correlação entre a primeira com a proliferação, levando-o à conclusão de que no pulmão enfisematoso a taxa de proliferação seria insuficiente para colmatar a destruição pela apoptose. Verificação idêntica foi efectuada por Calabrese [758] em doentes com enfisema grave, tendo este autor proposto a hipótese de um desequilíbrio entre a apoptose/proliferação para explicar a formação destas lesões.

Ainda neste contexto não podemos esquecer que o contributo do envelhecimento na patogenia da DPOC poderá expressar-se pela senescência que impossibilita a proliferação celular e, portanto, a regeneração tecidual [759]. De facto, vários estudos têm demonstrado a influência do *stress* oxidativo induzido pelo tabaco na senescência prematura dos linfócitos em fumadores, quer através de uma correlação inversa entre o comprimento dos telómeros e a quantidade de tabaco consumido [760] quer na redução significativa do comprimento destes nos doentes com DPOC [761]. Nestas circunstâncias, a disfunção associada à senescência linfocitária teria como consequência uma quebra da imunidade celular [762], aumentando a susceptibilidade às infecções e sendo ainda responsável por reacções inflamatórias autoimunes. De facto, segundo Lambers [763], os doentes com DPOC exibem um número aumentado de células T senescentes circulantes que expressam um fenótipo autoimune com perda de CD28 e aumento da produção do INF- $\gamma$ , da perforina e da granzima B.

Assim, o envelhecimento deve ser encarado numa perspectiva dual, através do reconhecimento de que a DPOC se caracteriza por um envelhecimento acelerado que pode influenciar os vários aspectos da doença, e, por outro lado, constituir um factor de risco do seu desenvolvimento, dado que o envelhecimento se acompanha de um estado inflamatório crónico ligado à activação persistente da imunidade inata por forma a compensar a perda das

respostas imunes adaptativas adequadas. O pulmão tornar-se-ia assim mais vulnerável às agressões, particularmente ao fumo do cigarro, com libertação de mais citocinas pro-inflamatórias, amplificando a lesão pulmonar. A manutenção e a auto-amplificação do fenótipo inflamatório parece constituir, neste contexto, a maior contribuição patogénica da senescência celular na DPOC. No entanto, outro processo patogénico da DPOC susceptível de poder ser modulado pela senescência incide na incapacidade de regeneração celular, já que as células senescentes, sobretudo se forem células progenitoras, têm um potencial de regeneração muito reduzido [764]; esta circunstância poderá ter impacto na alteração da estrutura e na regeneração dos tecidos, e criar um ambiente propício ao crescimento tumoral [765].

## **2-Inflamação Local e Sistémica**

Na DPOC, a exposição repetida a partículas e a gases nocivos, e em particular ao tabaco, desencadeia uma resposta inflamatória crónica exagerada que envolve a activação das células estruturais (epiteliais das vias aéreas, alveolares, endoteliais e fibroblastos) de diversos grupos celulares e de mediadores inflamatórios [Fig.5].

A desregulação imunológica sistémica nestes doentes pode contribuir para os efeitos extrapulmonares da doença [766,767,768]. Com efeito, as alterações detectadas nos leucócitos circulantes, na proteína C reactiva, nas IL-6 e IL-8, no fibrinogénio e no TNF- $\alpha$  dos portadores de DPOC, mesmo em fases clinicamente estáveis da doença, atestam a presença de uma inflamação sistémica [769,770,771,772,773,774] cuja origem permanece no entanto desconhecida e que pode ser encarada sob várias perspectivas: como um efeito sistémico dos mediadores inflamatórios libertados pelo pulmão atingido, sede de um processo inflamatório crónico persistente, sobre as células circulantes ou sobre a medula óssea [769]; representar um mecanismo de amplificação da inflamação pulmonar face à agressão tabágica; ser uma consequência de comorbilidades desenvolvidas, concomitantes à doença

pulmonar e dependentes de um factor de risco comum; traduzir as alterações importantes que ocorrem durante o desenvolvimento da doença pulmonar (hiperinsuflação, hipoxia tecidual, etc.); reflectir, no âmbito das alterações sistémicas do processo de envelhecimento, um conjunto de agressões do aparelho respiratório ocorridas ao longo da vida, etc. Acresce ainda a este conjunto de hipóteses o papel dos vários polimorfismos genéticos que podem modular as várias expressões da doença e que podem determinar não só uma vulnerabilidade particular do aparelho respiratório, mas igualmente sistémica.

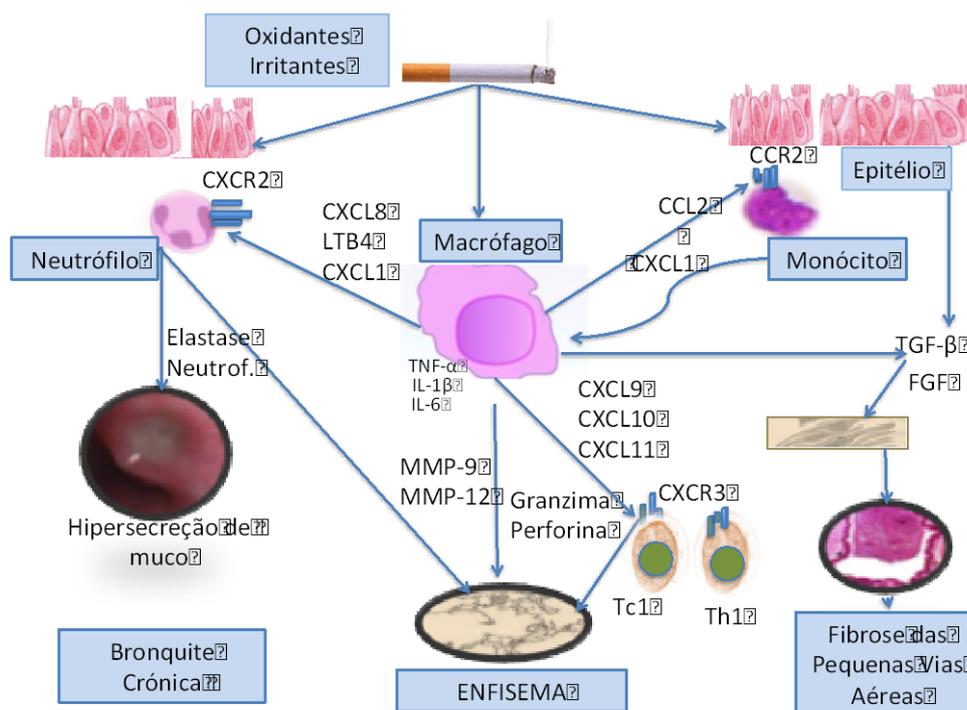


Fig.5- Esquema do envolvimento estrutural celular e molecular na DPOC

Apesar das interrogações que subsistem sobre a sua etiologia, a inflamação sistémica tem sido apontada como o elo de ligação patogénica entre as componentes pulmonar e extrapulmonar da DPOC [775].

A compreensão da totalidade dos mecanismos complexos da inflamação tanto a nível celular como molecular, que ocupa um papel central nesta afecção,

poderá vir a definir num futuro próximo o *inflamasoma sistémico* da DPOC [776].

Entretanto têm vindo a ser coligidos dados que demonstram a presença, em alguns doentes, de uma inflamação sistémica persistente que agrava de forma muito significativa a evolução da doença, tanto em relação ao número e frequência de exacerbações como à mortalidade [777,778], e que é independente da componente pulmonar da doença; ora, esta constatação coloca inevitavelmente a possibilidade dela vir a ser alvo de um tratamento específico e integrar o esforço da caracterização, identificação e individualização clínica de alguns dos fenótipos já reconhecidos, ou poder mesmo vir a originar outros.

A nível pulmonar, a presença da inflamação crónica foi assinalada através de várias técnicas em amostras colhidas a diversos níveis das vias aéreas inferiores [721,779,780]. Também no modelo animal a exposição crónica ao fumo do tabaco durante seis meses induzia várias lesões características da doença: inflamação pulmonar, *remodeling* das vias aéreas e alargamento dos espaços aéreos distais aos bronquíolos terminais por destruição das paredes alveolares [781].

Estudos recentes têm salientado a importância da participação das células estruturais na magnitude das lesões induzidas pelo processo inflamatório referindo-se, neste contexto, a activação pelo fumo do cigarro da óxido nítrico sintetase induzida que gera oxidantes, tais como o peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>) associado às lesões alveolares devidas ao tabaco [782], o peptídeo de degradação do colagénio (matriz extracelular) prolina-glicina-prolina (PGP) presente nas respostas iniciais ao fumo do cigarro, e que constitui o ligando dos receptores CXCR2 dos neutrófilos com amplificação da inflamação induzida pelo fumo [783], a presença de lipopolissacarídeos (LPS) presentes no tabaco, reconhecidos através das PAMPs pelos PRRs, dos quais fazem parte os TLRs transmembranares expressos nos monócitos, macrófagos, neutrófilos e células epiteliais e que, activados, conduzem à libertação de

citocinas pro-inflamatórias através do factor de transcrição nuclear - NF- $\kappa$ B [784]. A lesão das células epiteliais pelo tabaco leva à libertação das DAMPs, sendo o seu reconhecimento pelos PPRs crucial na mediação da resposta inflamatória à lesão tecidual [785]. Ainda neste contexto, o aumento da expressão a nível do epitélio das vias aéreas do *Receptor for Advanced Glycation End Products* (RAGE) conduz ao aumento da IL-1 $\beta$  [603] e ao recrutamento de mais células inflamatórias.

Sob o efeito do tabaco ou de outros agentes nocivos o epitélio produz um conjunto de mediadores inflamatórios dos quais se destacam: o TNF- $\alpha$ , a IL-1 $\beta$ , a IL-6, a IL-8, o *Granulocyte-Macrophage-Colony Stimulating Factor* (GM-CSF), o TGF- $\beta$ , reconhecido indutor de fibrose a nível das pequenas vias aéreas [786], o VEGF e os seus receptores importantes na manutenção da integridade das células alveolares [787].

A inflamação crónica característica da DPOC, para além da activação das células estruturais, envolve tanto a componente da imunidade inata através da acumulação de monócitos/macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, mastócitos, células dendríticas e natural *killer* (NK), como da imunidade adquirida, através dos linfócitos T e B [786].

É numa perspectiva da dinâmica celular que acompanha esta afecção e nas descrições já efectuadas aquando do capítulo dedicado ao envelhecimento, que se abordam seguidamente alguns aspectos mais relevantes.

Os macrófagos desempenham um importante papel na patogenia da doença [788,789], encontrando-se significativamente aumentados tanto a nível das vias aéreas (submucosa) [780,788] como do parênquima pulmonar, localizando-se quer nas paredes alveolares destruídas pelo enfisema [790,791,792] quer à volta das pequenas vias aéreas, associados à fibrose peribronquiolar detectada, tanto em fumadores como nos ex-fumadores [793]. Este aumento, observado tanto nos fumadores como nos portadores de DPOC, é devido ao recrutamento de monócitos da circulação em resposta a quimiocinas selectivas, como a CCL2 e a CXCL1, que se encontram igualmente expressas em níveis

mais elevados nos portadores da doença [794]. Os monócitos dos doentes com DPOC apresentam uma resposta quimiotáctica mais intensa ao CXCL1 do que nos fumadores sem doença, e nos não fumadores, que não é acompanhada por um aumento do seu receptor CXCR2 [795], o qual se encontra presente apenas em 30% dos monócitos, dado que a maioria destas células expressa o receptor CCR2. Os macrófagos, enquanto células efectoras podem libertar ROS, enzimas elastolíticas, incluindo várias metaloproteinases da matriz (MMP-2, MMP-9, MMP-12), as catepsinas K, L e S e a elastase neutrofílica capturada dos neutrófilos [796,797], mediadores lipídicos tais como leucotrienos, prostaglandinas, citocinas e quimiocinas, como a CXCL9, a CXCL10 e a CXCL11, que são quimiotácticas para os linfócitos T CD8<sup>+</sup> citotóxicos, e para as células CD4<sup>+</sup> Th1, através do receptor CXCR3 destas células [798,799]. A resistência dos macrófagos dos portadores de DPOC aos corticosteróides [800] parece residir, como já foi referido, na diminuição da actividade da histona desacetilase HDAC-2 [566,801] devido ao *stress* oxidativo [802] e é acompanhada por um aumento da secreção de citocinas, como o TNF- $\alpha$  e a CXCL8. Apesar da ineficácia dos corticosteróides na inibição da secreção de citocinas e das proteases pelos macrófagos, outras substâncias, como a teofilina em baixas concentrações, parecem aumentar a actividade da HDAC nos macrófagos alveolares *in vitro* [803] ou o resveratrol que inibe as citocinas de origem macrofágica [804].

Sob o ponto de vista funcional os macrófagos dos doentes com DPOC apresentam como no envelhecimento, uma capacidade fagocitária diminuída, quer em relação às células apoptóticas epiteliais, comprometendo a resolução da inflamação [805,806], quer em relação a agentes infecciosos, facilitando a colonização e aumentando o risco, tanto de agudizações como de pneumonia [807,808]. Vários autores têm salientado a importância da desactivação da polarização M1 dos macrófagos no pulmão tanto nos fumadores sem doença, como nos doentes com DPOC [809,810,811]. Com efeito, Shaykhiev [809] demonstrou que com o desenvolvimento da doença se assistia a uma progressiva desactivação da polarização M1 com diminuição da expressão de

genes que codificam as quimiocinas CXCL9, CXCL10, CXCL11 e CCL5, acompanhada pela activação da polarização M2, caracterizada pela indução do *remodeling* tecidual e de genes imunoregulatórios das metaloproteinasas da matriz: do MMP-2, do MMP-7 e do Adenosine 3 receptor (ADORA3). Em relação às metaloproteinasas é-lhes reconhecido o seu potencial no *remodeling* [812,813,814], enquanto que o *Glucocorticoid-Inducible Anti-inflammatory Receptor* aumenta a actividade das metaloproteinasas macrofágicas [815] e activa a via de sinalização pro-fibrótica pulmonar dependente do TGF- $\beta$  [816]. Numa perspectiva da defesa do hospedeiro, a supressão de genes inflamatórios/ imunes pode explicar, pelo menos em parte, a maior susceptibilidade às infecções tanto bacterianas como virusais destes doentes [817,818].

Para além do importante papel na defesa pulmonar contra as infecções bacterianas e virusais os neutrófilos são responsáveis pela resposta inflamatória em várias doenças respiratórias, tanto crónicas como agudas [819]. Encontram-se numericamente aumentadas quer na expectoração quer no líquido de lavagem broncoalveolar (LLBA) dos doentes com DPOC [820]. Existe uma correlação entre a quantidade destas células presentes nas biópsias brônquicas, assim como na expectoração induzida, e a gravidade da doença [820,821]. Durante as agudizações observa-se igualmente um aumento destas células nas vias aéreas [822]. A activação dos neutrófilos é acompanhada pela libertação de ROS cuja actividade pro-inflamatória dificulta a actuação anti-inflamatória dos corticosteróides; segregam enzimas como as serina proteases, catepsina G, elastase neutrofílica e proteinase-3, que são poderosos estimulantes da secreção de muco, e as metaloproteinasas da matriz: MMP-8 e MMP-9 que promovem a ruptura do colagénio e da elastina, contribuindo para a destruição alveolar [819]. O tabaco exerce um efeito estimulante directo sobre a sua produção e libertação da medula óssea, através da mediação de factores de proliferação como o *Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor* (GM-CSF) e o *Granulocyte Colony*

*Stimulating Factor* (G-CSF) de origem macrofágica [786]. Migram da circulação periférica para o pulmão através do aumento da expressão de moléculas de adesão como a E-selectina nas células endoteliais [823] e pela acção de factores quimiotácticos como o leucotrieno B4 (LTB4) e das quimiocinas CXCL1, CXCL5, e CXCL8 (IL-8), as quais se encontram igualmente aumentadas nas vias aéreas dos portadores de DPOC [794]. Várias células, entre as quais se contam os macrófagos alveolares, as células epiteliais e as células T, podem originar esses factores quimiotácticos; no entanto, parecem ser os neutrófilos a principal fonte da CXCL8 [824]. Esta actua sinalizando os receptores CXCR1 e CXCR2 dos neutrófilos, enquanto que a CXCL1 e a CXCL5 só o fazem para o receptor CXCR2. Durante as agudizações da DPOC há um aumento importante destas células no tracto respiratório, reflectindo eventualmente o aumento desses factores quimiotácticos [819].

Um outro factor quimiotáctico selectivo dos neutrófilos é o tripeptídeo prolina-glicina-prolina (PGP) [819,825,826,827,828] gerado enzimaticamente a partir do colagénio da matriz extracelular pela acção das metaloproteinases MMP-8 e/ou MMP-9, que determinam a sua ruptura em pequenos fragmentos; estes vão constituir o substracto para a actuação de uma serina protease, a prolil-endopeptidase (PE), que promove a sua clivagem originando o PGP [828], o qual é mais potente (quatro a sete vezes mais) na sua forma acetilada (N- $\alpha$ -PGP) [827]. Foi demonstrada a sua presença no líquido de lavagem broncoalveolar nos portadores de enfisema e na expectoração de doentes com fibrose quística. O PGP parece estimular a quimiotaxia dos neutrófilos através do receptor CXCR2, como foi demonstrado no modelo animal desprovido deste; contudo, o PGP não parece ligar-se directamente ao receptor, pois não bloqueia a ligação do CXCL8, admitindo-se que possa causar a quimotaxia indirectamente, promovendo a libertação de quimiocinas CXC pelo epitélio pulmonar [819]. Snelgrove [825] demonstrou que o PGP é inactivado a nível pulmonar pelo leucotrieno A4 (LTA4 H) libertado pelos neutrófilos e pelas células epiteliais, o que parece estar de acordo com a constatação de que nas infecções agudas microbianas a inflamação neutrofílica se resolve com o

desaparecimento do agente patogénico. No modelo murino desprovido do gene LTA4H foram detectadas quantidades substanciais de PGP no líquido de lavagem broncoalveolar [824]. Neste contexto, os neutrófilos, através da secreção de MMP-8 e MMP-9, levam à produção do PGP, que por sua vez atrai mais neutrófilos e estes, ao libertarem LTA4H, determinam a cessação da actuação do PGP e a resolução da inflamação. No entanto o LTA4H, para além da actividade peptidase, tem igualmente uma capacidade hidrólase promovendo a geração do leucotrieno B4 (LTB4), acabando por ter acções opostas no controlo da resposta inflamatória aguda [825]. O mesmo autor demonstrou que o extracto do fumo de cigarro aumenta a acetilação do PGP, inibindo a actividade peptidase do LTA4H, mas sem afectar a actividade hidrolásica e portanto, o LTB4H, já que há um bloqueio na degradação do agente quimiotáctico. A quimiotaxia dos neutrófilos não só aumenta como é prolongada pela acção do tabaco, o que pode explicar a inflamação neutrofílica persistente das vias aéreas dos doentes com DPOC. Mais recentemente Braber [828] demonstrou no modelo murino exposto ao tabaco o aumento da actividade das metaloproteinases, da PGP e da PE e a sua diminuição com a cessação da exposição, mantendo-se no entanto as lesões enfisematosas. Todos estes achados poderão vir a ter impacto em termos terapêuticos, quer através da evicção tabágica quer do bloqueio da PGP ou da utilização de antagonistas do seu receptor [829].

Os eosinófilos, embora reconhecidamente associados ao processo inflamatório que acompanha a asma, têm vindo a ser implicados em certos fenótipos da DPOC caracterizados pelo espessamento das paredes brônquicas nos estudos de tomografia computadorizada, assim como pela boa resposta à corticoterapia. De facto, neste subgrupo de doentes, que alguns autores têm designado por fenótipo de *overlap* DPOC/Asma, mesmo nos períodos de estabilidade estas células parecem ter um papel importante na inflamação [830,831,832]. Durante as exacerbações da doença vários autores já tinham assinalado a presença de um número aumentado de eosinófilos a nível das paredes brônquicas

[833,834,835]. Mais recentemente, Hewson [836] e Ritter [837] demonstraram que a eosinofilia durante as agudizações da DPOC poderia ser devida, pelo menos parcialmente, às infecções virais, já que estes microorganismos ao serem reconhecidos pelos TLRs das células epiteliais determinavam um padrão de citocinas pro-inflamatórias semelhante ao das agudizações da asma, no qual se assiste a um aumento da expressão da IL-5, da eotaxina e da quimiocina *Regulated Upon Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted* (RANTES) [838], igualmente observado durante as exacerbações, no referido subgrupo de doentes com DPOC, para além da presença, tanto na expectoração como no soro, de níveis elevados da proteína catiónica eosinofílica associada aos processos de lesão tecidual e de *remodeling* nos estudos *in vitro* [839]. Em termos de distribuição, estas células localizam-se preferencialmente no lúmen brônquico [840].

Quanto aos mastócitos estas células são numerosas no pulmão saudável, tanto a nível das vias aéreas como dos alvéolos [841,842]. A descoberta da sua importância na imunidade inata [843], na regulação do fluxo sanguíneo [844], na apresentação antigénica [845] e na regulação das células T [846] vieram despertar o interesse de vários investigadores para o seu papel na DPOC.

Em termos gerais constituem uma população celular heterogénea, na qual se reconhecem dois subtipos principais: os mastócitos das mucosas (MC<sub>T</sub>) e os mastócitos do tecido conjuntivo (MC<sub>TC</sub>), sendo os primeiros comuns nas vias aéreas [847]. Tanto nos fumadores assintomáticos [848] como nos portadores de DPOC, estas células encontram-se aumentadas [849,850]; no entanto, a distribuição da densidade mastocitária parece alterar-se com a progressão da gravidade da DPOC. Com efeito, estudos mais recentes, como o de Gosman [851], apontam para uma diminuição da densidade total dos mastócitos nos portadores de doença pulmonar obstrutiva crónica comparativamente aos controlos sem doença; já Andersson [852] demonstrou, em relação aos subtipos de mastócitos presentes em peças de resseção cirúrgica, que embora

se verificasse uma diminuição da população de mastócitos mucosos com o aumento da gravidade da DPOC, ela era contrabalançada pelo aumento da subpopulação de mastócitos do tecido conjuntivo, tanto a nível das pequenas vias aéreas como da componente alveolar do parênquima pulmonar, da qual resultaria um claro desequilíbrio entre as populações  $MC_T$  e  $MC_{TC}$ ; contudo, o mesmo autor constatou que se observava simultaneamente um aumento do número de mastócitos no lúmen brônquico e que a redução dos mastócitos no epitélio poderia resultar dessa migração.

Em relação às consequências funcionais que estas alterações têm na DPOC, alguns autores [851,852] apontam para a participação destas células na patogenia da afecção, enquanto que outros, embora aceitem genericamente esta posição, sustentam que se devem distinguir as subpopulações de mastócitos com base na demonstração de uma correlação positiva entre o aumento da densidade de mastócitos conjuntivos no parênquima e nos vasos pulmonares e a queda do  $FEV_1$  e da  $FEV_1/CV$ , reiterando, nestas circunstâncias, que os  $MC_{TC}$  teriam um impacto negativo na doença [853]. Em termos patogénicos este aumento teria como consequência um incremento da quimase, que não só estimula a secreção das glândulas serosas [854], como promove a destruição do inibidor da MMP-9 da matriz [855], contribuindo para o desenvolvimento do enfisema e para a libertação de factores pro-fibróticos, como o TGF- $\beta$  [856].

Em relação às células dendríticas desempenham um papel central na iniciação das respostas imunológicas, tanto inata como adaptativa [857], aceitando-se que constituam um elo de ligação entre estas duas vertentes [858]. Funcionalmente exercem a sua acção de *sentinelas* através de receptores específicos que lhes permite detectar os sinais de perigo, recolhendo antígenos do microambiente externo, processando-os e apresentando-os sob a forma de moléculas da classe I ou II do complexo major de histocompatibilidade (MHC), ao mesmo tempo que integram essa informação, aumentando a expressão de moléculas co-estimulatórias, e produzindo

citocinas específicas. A migração destas células para os gânglios linfáticos de drenagem é efectuada através da expressão de receptores sobretudo do CCR7 [859]; esta migração é acompanhada pela maturação celular, que comporta o aumento da expressão de moléculas de superfície e intracelulares bem como a produção de citocinas pro-inflamatórias.

Todos estes eventos são indispensáveis para uma apresentação antigénica eficaz e uma adequada estimulação linfocitária T [860]. Neste contexto as células dendríticas maduras vão promover a expansão clonal de linfócitos T, através das moléculas I e II do complexo do MHC, de moléculas co-estimulatórias, assim como da produção de citocinas pro-inflamatórias. A proliferação e diferenciação dos linfócitos B por estas células é efectuada, quer através das células T-helper (Th) quer de uma acção directa [861]. Possuem ainda a capacidade de controlar o balanço das células Th1/Th2, constituindo a produção de IL-12 um dos factores mais importantes na polarização Th1, através da activação do sinal de transdução e activador da transcrição-4 (STAT4), o qual induz a diferenciação das células T em Th1 produtoras de INF- $\gamma$ , enquanto que a diferenciação Th2 parece requerer um sinal específico [862]. São igualmente capazes de promover a indução de tolerância, estimulando as populações de células regulatórias (Treg) que evitam as respostas patológicas contra os antigénios *self*. Ainda neste âmbito podem induzir uma resposta pro-inflamatória através das células Th17 [863], caracterizadas pela produção de IL-17A, IL-17F e IL-22 e que têm sido associadas à patogenia de várias doenças inflamatórias e autoimunes [864,865].

A nível do tracto respiratório as células dendríticas constituem uma rede que envolve as vias aéreas e o parênquima pulmonar, distribuindo-se nos compartimentos sub-epitelial, intersticial e pleural, onde se encontram geralmente como células apresentadoras de antigénios imaturas [857].

O efeito do tabaco sobre estas células, em termos quantitativos e funcionais, é ainda controverso [862,863,864]. Tsumakidou [862] refere que a acumulação de células dendríticas CD207 positivas (células de Langerhans) no epitélio e na adventícia das pequenas vias aéreas é maior nos doentes com DPOC do que a

observada em não fumadores e em fumadores sem doença. Este autor pôde ainda verificar que o número de células de Langerhans nas pequenas vias aéreas aumentava proporcionalmente à gravidade da afecção, sugerindo a sua participação na patogenia da DPOC. Mais recentemente, Van Pottelberge [866] demonstrou igualmente a acumulação de células dendríticas plasmocitóides nos folículos linfóides das pequenas vias aéreas dos doentes portadores de DPOC ligeira a moderada, contrastando com a ausência de diferenças numéricas entre os não fumadores e os fumadores sem obstrução, sugerindo assim, que o fumo do cigarro de *per se* não influencia, pelo menos em termos quantitativos, estas células tanto nas vias aéreas como nos folículos linfóides. Este autor constatou ainda a presença de alterações funcionais, quer no processo de maturação das células dendríticas, quer na produção de citocinas, particularmente do INF- $\alpha$  nos doentes com DPOC, que comprometeriam as defesas antivirais e aumentariam a vulnerabilidade a este tipo de infecção.

A explicação para esta acumulação de células dendríticas nos folículos das pequenas vias aéreas dos doentes permanece ainda no domínio especulativo. Com efeito têm sido apontadas hipóteses que se estendem desde um efeito compensatório tolerogénico às respostas imunes exageradas que ocorrem na doença, e que parece encontrar fundamento nos achados de Plumb [867] consubstanciados no aumento de células Treg nos folículos da doença obstrutiva moderada, até ao papel na neogénese linfóide e na homeostasia das estruturas linfóides terciárias pulmonares, como já foi assinalado nas alterações estruturais presentes na DPOC [686,687].

Nos fumadores com doença observa-se um acentuado aumento de células dendríticas maduras nas vias aéreas periféricas [868,869], possivelmente relacionado não só com uma elevada expressão pulmonar da quimiocina CCL20, mas igualmente com um aumento dos linfócitos T-CD4 com expressão STAT4 e do INF- $\gamma$ , que parecem correlacionar-se com o grau de obstrução aérea.

As células NK às quais foi atribuída capacidade para aniquilar células alvo *naturalmente* [870,871], encontram-se como já foi referido, na primeira linha de defesa contra as células infectadas ou que tenham sofrido transformação tumoral [872,873].

A heterogeneidade desta população celular cujas características fenotípicas já foram abordadas a propósito do envelhecimento, permitiu o reconhecimento de que a subpopulação CD56 *bright* se encontra associada predominantemente à produção de citocinas, enquanto a CD56 *dim* embora com baixa capacidade de produção citocínica possuem uma acção fundamentalmente citolítica contra as células infectadas ou transformadas através das perforinas e granzimas [213,874,875,876,877,878]. Esta última subpopulação apresenta ainda uma elevada expressão de CD16, envolvida na citotoxicidade mediada por anticorpos *Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity* (ADCC) [879].

O reconhecimento dos alvos por estas células é complexo e envolve alteração no balanço entre os sinais de activação e inibição que lhe são fornecidos através dos ligandos dos seus vários receptores, entre os quais se incluem os receptores naturais de citotoxicidade [880]. Quanto aos ligandos são glicoproteínas, quer do hospedeiro quer do agente patogénico [881,882]. Embora estas células possam ser activadas por citocinas [883,884], são no igualmente pelas suas interacções com as DCs e com os macrófagos [213,885,886, 887,888]. A sua produção de citocinas para além do INF- $\gamma$ , inclui ainda as associadas ao perfil Th2, como a IL-5 e a IL-13, e a interleucina regulatória IL-10 [885,889]. Têm ainda algumas particularidades, como a de especializarem as suas funções em diferentes localizações tecidulares; tal é o caso da população de células NK presente no intestino e nas amígdalas, produtoras de IL-22, associadas à imunidade das mucosas [890,891], ou ainda a existência de memória com respostas celulares de acordo com experiências prévias, o que as aproxima, neste aspecto, do sistema imune adquirido [892,893].

São em termos genéricos uma população celular sofisticada do sistema imune inato, reconhecida como um elo entre os dois sistemas imunes, quer pela

secreção de citocinas quer pela actividade citolítica, complementando a actividade das células T efectoras.

Mian [893] demonstrou que os fumadores apresentavam uma acentuada depressão da actividade NK; o fumo do cigarro inibia a produção do INF- $\gamma$ , do TNF- $\alpha$ , assim como a actividade citotóxica através da diminuição da expressão de perforinas.

No sangue, vários autores constataram não só uma redução da sua capacidade citotóxica como uma diminuição do seu número [894,895]. Num estudo recente, Wang [896] demonstrou que as células NK dos fumadores, com e sem DPOC, se encontravam significativamente mais activadas que nos ex-fumadores com doença e nos indivíduos normais, sugerindo que o tabaco afectaria de *per se* a activação sistémica destas células; o mesmo autor constatou uma correlação positiva entre a sua activação e o número de cigarros consumidos, inferindo que no sangue a activação se encontra mais dependente do tabaco do que da doença, o que contrasta com os achados a nível pulmonar, em que a proporção de células activadas está mais relacionada com a doença do que com o tabaco, já que tanto os fumadores como os ex-fumadores com DPOC apresentavam níveis mais elevados de activação do que os indivíduos normais não fumadores e do que os fumadores sem doença. No mesmo sentido, Tang [897], ao estudar a função destas células no sangue de doentes com DPOC, constatou uma diminuição da secreção do INF- $\gamma$ .

Prieto [894] verificou uma importante diminuição da capacidade fagocitária destas células. Neste contexto, a diminuição do número das células NK, a par das alterações funcionais, pode explicar a maior susceptibilidade destes doentes às infecções.

A função das células NK encontrar-se-ia alterada, tanto a nível pulmonar como no sangue dos doentes com DPOC, quer devido ao tabaco através do número de macrófagos alveolares imunossupressores, quer igualmente pela diminuição da citotoxicidade destas células no sangue dos ex-fumadores com doença, comparativamente aos ex-fumadores controlos, o que sugere que esta anomalia se encontra associada à DPOC [897].

As células T *Natural-Killer* (NKT) constituem um subgrupo altamente heterogéneo de linfócitos que expressam características, quer das células T quer das células NK, co-expressando receptores das células T (TCRs  $\alpha/\beta$ ) e marcadores associados às células NK, como o CD56 e ou CD16 [898,899]. Possuem uma grande diversidade fenotípica e funcional, constituindo igualmente uma ponte entre os dois sistemas imunológicos, pelo que tanto as suas alterações quantitativas como qualitativas afectam, quer a imunidade inata como a adquirida. Nos seres humanos existem duas subpopulações de células NKT que dependem da apresentação antigénica através da molécula da classe I apresentadora de antigénio CD1d [900]. Esta molécula encontra-se expressa em diferentes grupos celulares: células dendríticas, timócitos, células B, monócitos e macrófagos. O antigénio glicolipídico liga-se à molécula CD1d e o complexo antigénio/CD1d associa-se por sua vez ao TCR das células NKT. As células dependentes do CD1d expressam um TCR muito restrito, são conhecidas por células NKT invariantes (iNKT) ou NKT de tipo I e reconhecem antigénios glicolipídicos.

A activação destas células é acompanhada pela rápida libertação de citocinas Th1, Th2 e/ou Th17 e exibem actividades quer antigénio-específicas quer citolíticas [901]. O segundo grupo de células NKT designado por NKT de tipo II expressa um TCR muito mais alargado que lhes permite reconhecer antigénios hidrofóbicos, como os sulfatídeos, a lisofosfatidilcolina e as moléculas aromáticas [902]. Um terceiro grupo de células NKT, conhecido pela designação *NKT-like*, é constituído por células que não dependem do receptor CD1d, expressam receptores T- $\alpha/\beta$ , e reconhecem os antigénios no contexto de moléculas da classe I e II do MHC. Estas células compreendem um grupo muito heterogéneo constituído por  $CD4^+$ ,  $CD8^+$ , ou células T duplamente negativas ( $CD4^- CD8^-$ ), que também expressam marcadores das células NK como o CD16 e/ou o CD56 [903].

No seu conjunto estas células podem promover ou suprimir respostas imunes devido à existência de várias subpopulações com funções distintas. Sob o

ponto de vista funcional representam também uma linha de defesa do sistema imune inato contra os agentes infecciosos, sendo dotadas ainda da capacidade de destruir directamente as células alvo e de interagirem com as células T. Tang [897] demonstrou o aumento destas células no LBA de fumadores sem doença e de portadores de DPOC, assim como o aumento da capacidade citotóxica neste meio. Este autor pôde ainda verificar que o seu aumento era menos expressivo nos doentes com DPOC que tinham cessado de fumar, o que sugere o efeito potencial do tabaco sobre estas células. A proporção de células CD8+*NKT-like* está aumentada nos doentes com DPOC, e como estas células se associam a citocinas do tipo Th<sub>1</sub> podem ser também responsáveis pela resposta pro-inflamatória a nível pulmonar nos doentes com DPOC [904]. No sangue periférico dos portadores de DPOC o número destas células não parece ser consensual, com vários autores a reportarem achados diferentes, como Prieto [894], que constatou não existirem diferenças substanciais entre os doentes com DPOC e os controlos sem doença, e os resultados de Urbanowicz [905] que demonstrou a existência não só de uma diminuição do número destas células como da sua capacidade citotóxica que se correlacionava positivamente com o grau de obstrução brônquica.

As células T- $\gamma\delta$  representam uma subpopulação de células T distintas, caracterizadas por receptores T que possuem particularidades estruturais e de ligação antigénica. No homem, em condições fisiológicas, representam cerca de 1 a 10% da *pool* total de linfócitos T embora existam variações no seu número com a idade (diminuição e oligoclonalidade) [906,907,908]. Vários estudos demonstraram que estas células podem representar cerca de 50% das células T nos epitélios ou nos tecidos mucosos [909,910]. Com efeito, a localização específica e a sua abundância, veio confirmar a importância na imunidade dessas áreas, desempenhando um papel importante na homeostasia destas regiões e nas respostas de reparação das lesões tecidulares [910,911]. Estudos experimentais efectuados no tecido pulmonar permitiram a clarificação do papel destas células não só nos processos de

reparação como de defesa contra agentes infecciosos, ou outros agressores [912,913].

As células em circulação expressam o TCR-V $\delta$ 2<sup>+</sup> e possuem um fenótipo predominante duplamente negativo (CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>) [914,915]. Reconhecem especificamente pequenos antígenos não peptídicos, provenientes de agentes microbianos, ou células necróticas. Em contraste com o reconhecimento antigénico pelas células T- $\alpha\beta$ , os antígenos reconhecidos pelas células  $\gamma\delta$  não necessitam de processamento prévio pelas células apresentadoras de antígenos (APCs), nem da ligação e apresentação pelas moléculas do MHC. Possuem a particularidade de existirem só nos grandes primatas, encontrando-se ausentes noutros mamíferos, o que sugere que tenham evoluído no sentido de promoverem a protecção contra determinadas espécies microbianas [912]. São células com um amplo raio de acção [915] no que respeita às funções efectoras do sistema inato, incluindo: a rápida produção de citocinas e quimiocinas, a lise de células alvo e com interligações ao sistema imune adquirido através dos linfócitos B, da maturação das células dendríticas e da aquisição de memória.

Vários estudos têm demonstrado a expansão destas células no sangue de doentes infectados sistemicamente (tuberculose, lepra, malária, meningite bacteriana, etc.), resultante da resposta a compostos não peptídicos (pirofosfatos, compostos não fosfatos, alquil aminas, etc.), assim como a fosfoantígenos presentes nas células tumorais, onde promovem e estimulam a secreção de moléculas citotóxicas. Estas células, após exposição a um agente infeccioso estranho ou a células metabolicamente em *stress* ou em apoptose, segregam rapidamente quimiocinas e citocinas T *helper* como o INF- $\gamma$  que activam as células NK, NK-T e os linfócitos T. Podem ainda funcionar como células apresentadoras de antígenos, processando e apresentando os antígenos peptídicos que estimulam tanto as subpopulações CD4 como CD8. Fundamentalmente, são células de resposta imediata [911,912] nas situações de infecção, com capacidade citotóxica, e que podem alterar o microambiente local, através da produção de citocinas e quimiocinas facilitadoras da

intervenção de outras células, bem como de promoverem respostas antigénio específicas, através da sua capacidade de funcionarem como células apresentadoras de antígenos.

Nos últimos anos, os resultados da investigação levada a cabo por vários autores têm apontado para o papel importante das respostas imunológicas adquiridas na patogenia e progressão da DPOC; são disso exemplo a correlação entre a extensão dos infiltrados intrapulmonares linfocitários, as alterações histológicas e os parâmetros de gravidade da doença [916,917,918,920,921,922,923]. Com efeito, as células T activadas podem promover várias das alterações tecidulares que são habitualmente encontradas nos doentes portadores de DPOC, quer através da sua acção citopática directa quer através de mediadores pro-inflamatórios e/ou do recrutamento de outras células efectoras [924,925].

A maior parte das células T expressam um receptor antigénico (TCR) que contém cadeias  $\alpha\beta$  variáveis, capazes de reconhecer pequenos peptídeos. Estas células têm como já referimos, origem na medula óssea e são recrutadas para o timo pela acção da P-selectina e da quimiocina CXCL12 [926,927]. A selecção tímica positiva vai permitir que os seus TCR(s) respondam aos peptídeos do MHC, mas não de uma forma tão intensa que se tornem autoreactivos, enquanto que a selecção negativa vai depender da exposição dos timócitos a genes específicos de outros tecidos [928]. Durante a maturação, as células T desenvolvem a expressão CD8, permitindo o reconhecimento antigénico no contexto das moléculas da classe I do MHC, ou a CD4 para o reconhecimento pelas moléculas da classe II. A fracção celular que completa a *educação tímica* constitui as designadas células T-*naive* que circulam entre o sangue e os gânglios linfáticos à procura de estimulação antigénica. A involução tímica que ocorre no final da infância [929,930] reduz o número de células T *naive* na *pool* circulante de células T, pelo que a sua manutenção fica dependente da proliferação desencadeada pela IL-7 sobre as células T *naive*, e da IL-15 nas células T-CD8 memória [931]; a aquisição de

memória pelas células T-CD4 parece requerer um tecido linfóide organizado e igualmente, a participação da IL-7 [931]. Em relação à diversidade do repertório do TCR destas células, ela depende em grande parte do MHC e do historial individual a exposições antigénicas e a infecções [931].

Nos doentes com DPOC existe um aumento do número total de linfócitos T, tanto ao nível das vias aéreas como do parênquima [918,919], com um claro predomínio de linfócitos T-CD8 citotóxicos, quer no compartimento aéreo (grandes e pequenas vias aéreas) [932,933] quer no alveolar [934,935,936,937]. Estas células aumentam substancialmente com o agravamento funcional da doença e com o enfisema [938, 939]; de facto, a alteração mais significativa entre o infiltrado inflamatório dos fumadores assintomáticos e dos fumadores com DPOC, reside precisamente no maior número dessas células nestes últimos [934,936]. Ainda neste contexto, a constatação do aumento da expressão nas pequenas vias aéreas dos fumadores com DPOC do receptor quimiocínico CXCR3 e do seu ligando CXCL10 [940] pode explicar o recrutamento preferencial para o pulmão, dos linfócitos T-CD8+ nesta afecção. Quanto ao papel deste fenótipo linfocitário na patogenia da doença têm-se referido várias hipóteses que incluem: a produção de IFN- $\gamma$  (Tc1), que seria responsável pela destruição tecidual, consubstanciada nos resultados obtidos em modelos murinos transgénicos em que o aumento da expressão local desta citocina produzia não só inflamação e enfisema como induzia a activação da MMP-12 [941]; outra possibilidade passaria pelo ataque citolítico das células parenquimatosas, que são reconhecidas como *não self* ou infectadas, via perforina e granzimas produzidas pelas células T-CD8 [942] e, segundo esta perspectiva, as lesões induzidas pelo efeito oxidativo do tabaco promoveriam modificações antigénicas que seriam reconhecidas pelos CD8 no contexto das moléculas da classe I do MHC. Majo [934] demonstrou a existência de uma correlação entre o número de células T-CD8 e as células apoptóticas presentes nos portadores de enfisema. A destruição das células epiteliais alveolares seria para este autor uma consequência da libertação de perforinas, granzima B e TNF-  $\alpha$  [943,944];

por outro lado, as células apoptóticas, ricas em material antigénico, o qual, ao ser detectado pelas células dendríticas promoveria uma resposta linfocitária T associada à produção de citocinas como o INF- $\gamma$  e os TNF(s) que amplificariam a resposta inflamatória local. A complexidade do papel patogénico desta subpopulação linfocitária advém ainda da circunstância destas células poderem produzir INF- $\gamma$  independentemente da estimulação do seu TCR, através da actuação conjunta da IL-12 e da IL-18 [945,946], esta última expressa em grandes quantidades tanto nos macrófagos alveolares dos doentes com DPOC grave como no sangue periférico [947,948].

Acresce ainda neste contexto que a produção de INF- $\gamma$  pelas células T-CD8 pode ser estimulada pela IL-15, importante no desenvolvimento e manutenção da memória destas células [949,950]. A circunstância dos linfócitos T-CD8 poderem exercer a sua actividade citotóxica independentemente da activação do seu TCR, vem alargar o seu potencial destrutivo, que é relevante na DPOC. A apoptose das células epiteliais e endoteliais, e possivelmente, das proteases, induzida pelos linfócitos CD8 através da granzima B, assim como a não compensação, nem pela proliferação celular, nem pelo aumento da capacidade fagocitária dos macrófagos alveolares, que é deficiente na DPOC [951], tem sido implicada na patogenia do enfisema centrolobular [952].

No sangue periférico, vários autores [904,953,954] não constataram a existência de diferenças significativas na proporção dos linfócitos T-CD8 entre os não fumadores, fumadores e doentes com DPOC; contudo, no que concerne à capacidade citotóxica [955] esta parece encontrar-se diminuída nos doentes e nos fumadores, parecendo ser, portanto, mais influenciada pelo tabaco do que pela doença [931].

Quanto à subpopulação T-CD4 existe igualmente um aumento quantitativo embora menos marcado tanto ao nível das vias aéreas, como do parênquima pulmonar nos fumadores com DPOC [956,957]. Tanto nos fumadores como nos doentes, estas células expressam STAT4 e INF- $\gamma$ , o que sugere que sofreram estimulação antigénica [958], existindo, aliás, não só uma correlação entre as células produtoras de IFN- $\gamma$  e o grau de obstrução aérea [958], como

com a inflamação persistente, característica do enfisema severo [959]. Dado que a maior parte das células T-CD4 presentes nas vias aéreas e no parênquima pulmonar produzem INF- $\gamma$ , exibem um fenótipo Th1 [960] e expressam os receptores quimiocínicos CCR5 e CXCR3 responsáveis pelo progressivo recrutamento e activação das células inflamatórias com o agravamento funcional da doença [961]. Também a IL-18, que desempenha um papel importante no desenvolvimento das células Th1, se encontra extensivamente representada nos macrófagos alveolares, nas células T-CD8 e nos epitélios bronquiolar e alveolar dos doentes com DPOC muito grave [962]. No pulmão afectado pela DPOC, a interacção entre as quimiocinas CXCL10 (IP-10) e a CXCL9 segregada pelos linfócitos T e o receptor CXCR3 presente nos macrófagos alveolares faz aumentar a produção por estas células da MMP-12, promovendo a destruição do parênquima [963]. Estes achados reflectem no seu conjunto, o contributo destas células na patogenia da doença.

Uma terceira subpopulação distinta de linfócitos T, com função efectora, é representada pelas células Th17 produtoras das interleucinas: IL-17, 17F e IL-22, indutoras de extensas reacções tecidulares devidas à distribuição celular alargada dos receptores da IL-17 e da IL-22. Estas células produzem ainda IL-21 implicada no *feedback* positivo que permite a amplificação das células Th17 [964]. No seu desenvolvimento encontram-se envolvidos factores de diferenciação como: a citocina imunoregulatória TGF- $\beta$ , a citocina pró-inflamatória IL-6, ou IL-21, o factor de crescimento e estabilização - IL-23 e vários factores de transcrição (STAT3, RORC2, entre outros) [965]. Expressam ainda vários receptores na superfície celular, como o receptor 1 do TGF- $\beta$  (TGF- $\beta$ R1), o receptor da IL-6 (IL-6R) e o receptor da IL-23 (IL-23 R), e ainda, os receptores quimiocínicos CCR4 e CCR6.

Estas células têm sido implicadas na patogenia de várias doenças inflamatórias e autoimunes [966,967].

A participação do TGF- $\beta$  na diferenciação das células Th17 coloca esta linhagem muito próxima das células T reguladoras (Tregs) (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>)

[968], pois estas podem originar-se a partir das células *T naive* na presença do TGF- $\beta$ ; no entanto, sob a acção conjunta do TGF- $\beta$  e da IL-6 ou IL-21, as células T desenvolvem o fenótipo Th17 [969]. A resposta Th17 envolve um conjunto de citocinas pro-inflamatórias e quimiocinas, tais como a CXCL8 e a CXCL10, que recrutam neutrófilos para as áreas de inflamação. O fumo do tabaco aumenta aliás a expressão de quimiocinas associadas a estas células, como: a CXCL8 e CCL20 (recrutamento de neutrófilos) e a CCL5 e CXCL7 na mucosa brônquica dos doentes com DPOC [970,971]. Têm além disso um efeito sobre grande parte das células parenquimatosas, incluindo macrófagos e células dendríticas, que expressam receptores da IL-17 induzindo a produção de vários mediadores inflamatórios como o TNF- $\alpha$  e a IL-6 que se encontram aumentados durante as fases de exacerbação da doença [972]. Constatou-se ainda que a IL-17 pode induzir as células epiteliais a produzirem muco e MMP-9 [973]. Em modelos murinos, a exposição crónica ao fumo do tabaco está associada a um aumento da IL-17 e de células produtoras de IFN- $\gamma$  no LBA [974]. As células Th17 podem ainda produzir IL-22 que está ligada a doenças inflamatórias crónicas, como a artrite reumatoide e a psoríase [975,976]. Esta interleucina desempenha um papel importante na defesa pulmonar contra as bactérias extracelulares, através da indução nas células epiteliais de peptídeos antimicrobianos como as  $\beta$  defensinas, importantes na protecção das barreiras mucosas [977]. Apresenta uma expressão aumentada nas células epiteliais brônquicas dos doentes portadores de DPOC em fase estável e actua sinergicamente com a IL-17 na promoção do processo inflamatório a este nível, [978,979]. A IL-23 desempenha um papel importante na manutenção e expansão das células Th17, é segregada pelas células apresentadoras de antígeno (APCs), como as células dendríticas, e pertence à família citocínica da IL-12, sendo libertada em resposta a sinais de perigo inflamatório, pelo que a sobrevivência das células Th17 pode em última análise depender da inflamação crónica. Como foi assinalado, o TGF- $\beta$ 1 desempenha um papel central ao induzir a expressão do receptor da IL-23 nas células Th17 [980]. Modelos murinos desprovidos do receptor da IL-23 são mais resistentes ao

desenvolvimento de doenças autoimunes induzidas experimentalmente, donde se infere a sua importância nos processos inflamatórios crónicos [981].

Na DPOC estável Di Stefano [978] constatou a presença de níveis citocínicos elevados de IL-17A, IL-22 e IL-23 nas células epiteliais brônquicas, comparativamente aos encontrados em controlos sem identificar, contudo, diferenças significativas quanto à expressão de RORC2 entre fumadores e doentes com DPOC, pelo que as diferenças encontradas podem ser devidas apenas ao tabaco. Mais recentemente, Vargas-Rojas [982] detectou a presença de um aumento das células Th17 no sangue periférico de doentes com DPOC em relação aos fumadores sem doença, tendo além disso constatado a presença de uma relação inversa entre estas células, e o FEV<sub>1</sub>.

O conceito de uma população celular com capacidade para suprimir a resposta imune proposto por Gershon e Kondo [983] na década de 70 reemergiu mais tarde com a demonstração, por Sakaguchi [984], nos ratos timectomizados ao 3º dia de vida, do desenvolvimento de doenças auto-imunes órgão-específicas, cuja origem parecia residir na ausência de uma subpopulação específica de células T as - TCD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> - que ao serem transferidas, preveniam a sua ocorrência. Por outro lado, constatou-se que o factor de transcrição FoxP3 se encontrava altamente expresso nessas células TCD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> [985]. O desenvolvimento desta população celular ocorre no timo e requer a interacção do receptor das células T (TCR) com as moléculas da classe II do MHC unidas a um peptídeo expresso pelo estroma tímico [986]. A expressão FoxP3 depende da união da molécula CD28 com os seus ligandos CD80/CD86, necessária para que as células não sejam eliminadas, apesar de evidenciarem grande afinidade no reconhecimento antigénico [986]. Sob o ponto de vista fenotípico reconhecem-se vários tipos de células reguladoras: as T reguladoras naturais (Tregn), que abandonam o timo como células efectoras TCD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>, têm uma alta expressão de superfície do CD152 e são essenciais na manutenção da auto-tolerância; as Tr1, são células Th que dependem da IL-10 para a sua diferenciação, não expressam o FoxP3, mas

possuem uma elevada expressão de CD125; as células Th3 que se caracterizam pela produção do TGF- $\beta$ , dependendo deste para a sua diferenciação, e expressam a cadeia alfa do receptor da IL-2 (CD25), como as células Tregn [987]; e ainda as células Treg induzidas (Tregi) as quais sofrem um processo de maturação na periferia, e obtêm a expressão FoxP3 após estimulação por antígenos exógenos [988] num microambiente rico em TGF- $\beta$  e em IL-2 [316].

As duas subpopulações mais abundantes destas células imunoreguladoras são representadas pelas Tregn e as Tregi. Exercem os seus efeitos supressores sobre outras células T, ou sobre as células dendríticas apresentadoras de antígeno, através de mecanismos que dependem do contacto celular (união do CTLA-4 ou do CD28 com os seus ligandos CD80 e CD86) ou da produção de citocinas anti-inflamatórias como a IL-10 e o TGF- $\beta$  [990], que exercem uma acção directa sobre as células T efectoras, ou ainda um efeito inibidor sobre as células apresentadoras de antígeno, induzindo portanto, uma resposta tolerogénica, entre outras.

Nos estudos efectuados em fumadores com DPOC e enfisema, Lee [991] constatou que estes doentes tinham poucas células T reguladoras a nível pulmonar, assim como níveis diminuídos de mRNA para o Foxp3 e de IL-10, em relação ao grupo controlo. Já os fumadores assintomáticos e funcionalmente normais, apresentavam um aumento significativo das células T reguladoras no LBA comparativamente com os indivíduos sem hábitos tabágicos e doentes com DPOC moderada [992]. Isajevs [993] demonstrou a presença de uma expressão elevada de células T- Foxp3 nas vias aéreas de maior calibre de fumadores, com e sem DPOC, que se correlacionava positivamente com a carga tabágica, contrariamente ao observado a nível das pequenas vias aéreas dos portadores de doença, em que a diminuição das células T-Foxp3 se correlacionava positivamente com a limitação do fluxo aéreo. De facto, as Treg presentes nos folículos linfóides são fundamentalmente Tregi e Th3, dado que encontram um microambiente citocínico e uma exposição antigénica favoráveis ao seu desenvolvimento,

como é o caso por exemplo, das células epiteliais alveolares de tipo II que fornecem um microambiente rico em TGF- $\beta$ , favorecedor do desenvolvimento das células Th3. As células Tregi têm uma expressão instável do Foxp3 e parece ser devido a esta circunstância, que a sua capacidade reguladora se mostra mais reduzida [994].

No sangue, estas células encontram-se aumentadas nos doentes com DPOC em fase de agudização, existindo uma correlação entre esse incremento, e a gravidade da doença [995].

Estas células, às quais se atribuem como funções principais a supressão da resposta imunológica e a manutenção da tolerância a autoantígenos, encontram-se comprometidas na DPOC, quer como consequência de defeitos genéticos ou epigenéticos quer, eventualmente, por um aumento da resistência das células efectoras à sua regulação. Nos ex-fumadores (com mais de 5 anos de abstenção tabágica) Roos-Engstrand [996] demonstrou que é possível restabelecer as proporções das subpopulações de linfócitos T.

Os linfócitos B encontram-se aumentados nos doentes com DPOC moderada a grave tanto a nível das vias aéreas centrais, como foi demonstrado no tecido obtido através de biópsias brônquicas [997] e igualmente a nível das pequenas vias, fenómeno constatado por vários autores [998,999], encontrando-se *clusters* parcialmente arranjados em folículos à volta das pequenas vias [999] e no parênquima pulmonar [1000,1001], sobretudo nas formas mais graves da doença, resultantes da neogénese linfóide [1002] e integrando o *Inducible Bronchus-Associated Lymphoid Tissue* (iBALT) [1003] formado nos processos inflamatórios crónicos. Este tecido linfóide ectópico recruta antígenos das vias aéreas, permitindo a iniciação da resposta imune local, e a manutenção de células memória no pulmão, assim como a mudança do isotipo das imunoglobulinas [1000]. Nas estruturas foliculares pulmonares detectou-se um aumento da expressão do *B-Cell Activating Factor of Tumor Necrosis Factor Family* (BAFF), sugerindo a importância desta via, no desenvolvimento e manutenção destas estruturas constituídas por células B memória e *naïve*,

células T, células dendríticas e células dendríticas foliculares que permitem o *priming* e a expansão clonal [1002]. A compartimentação nos folículos das áreas B e T, é regulada por quimiocinas, como acontece nos gânglios linfáticos [1004], tanto pelas CCL19 e CCL21 ao atraírem linfócitos T *naive* que expressam CCR7, como pela CXCL13 a qual atrai as células B que expressam CXCR5. A oligoclonalidade das células B nos folículos linfóides parece ser compatível com uma indução antígeno-específica [1001]. Quanto à identidade do(s) antígenos capazes de despoletar a produção de autoanticorpos nos portadores de DPOC permanece desconhecida; no entanto, são apontados como possíveis os antígenos presentes no tabaco com capacidade de modificar proteínas e outras moléculas gerando neoantígenos ou haptenos; os antígenos microbianos, os produtos de degradação da matriz extracelular ou os autoantígenos [1001]. O papel da resposta dos linfócitos B na DPOC tem sido alvo de alguma controvérsia, resultante da sua participação importante e benéfica no combate às infecções, contrariando o potencial efeito nefasto dependente de anticorpos dirigidos aos componentes do tecido pulmonar, associando por esta via, uma componente autoimune aos complexos mecanismos patogénicos da doença, com particular relevância no desenvolvimento do enfisema [1005].

## II PARTE

### TRABALHO PESSOAL

*Não temos qualquer interesse pela aparência das coisas.  
Não temos qualquer interesse pelo que vemos,  
mas sim pelo que não vemos,  
pela essência invisível dos fenómenos*

André LWOFF  
L'Ordre Biologique



## CAPÍTULO I

### OBJECTIVOS

É hoje inquestionável a associação entre diversas manifestações patológicas extra-respiratórias (cardiovasculares, músculo-esqueléticas, metabólicas, gastro-intestinais, neoplásicas, infecciosas e neuropsíquicas, entre outras) e a DPOC, as quais podem surgir em número e intensidade muito variáveis no decurso desta afecção.

Embora longe de se encontrarem totalmente esclarecidos os mecanismos íntimos que conduzem a estas perturbações sistémicas, existem fortes indícios do seu relacionamento com alterações inflamatórias contemporâneas e sabe-se, entretanto, que a elas se encontra ligada uma complexa rede de células circulantes e de citocinas desencadeadoras de diversos fenómenos patogénicos, entre os quais a comparticipação imunológica assume uma importância de particular relevo. É neste contexto que o projecto de investigação que nos propusemos desenvolver viria a incidir: tentar correlacionar a fase evolutiva da DPOC, nomeadamente a sua gravidade, com alguns aspectos de natureza imunológica, procurando determinar, para cada um dos grupos, um perfil próprio e detectar, neste âmbito, parâmetros sistémicos celulares cujos valores, ou a simples presença, se encontrassem adstritos ao risco de gravidade da DPOC e à sua repercussão sistémica.

Por isso foram consideradas, combinadamente, não só as perturbações funcionais da doença, determinadas espirometricamente, mas igualmente, na avaliação do risco, os distúrbios sintomáticos e as exacerbações, de acordo com as mais recentes recomendações consubstanciadas na revisão de 2013 da *Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease* (GOLD) e da distribuição dos doentes por grupos a par da gravidade no cálculo do risco individual.

## CAPÍTULO II

### **ABORDAGEM GERAL DA CASUÍSTICA**

#### **1-CRITÉRIOS DE SELECÇÃO DOS DOENTES E PLANO GERAL DO ESTUDO**

Face ao tema escolhido como área de investigação tentámos efectuar, numa fase inicial, a detecção e identificação de situações clínicas de DPOC a frequentarem as consultas externas do Serviço de Pneumologia dos HUC, entre os anos de 2009 a 2012, que nos três meses anteriores não tivessem tido necessidade de internamento, nem qualquer processo de agudização.

A existência de uma abordagem funcional espirométrica prévia destes quadros permitiu-nos, juntamente com os elementos de natureza clínica efectuar o enquadramento destes doentes nos respectivos grupos de risco da sua DPOC, traduzindo assim a gravidade da afecção que os atingia. Esta perspectiva afigurava-se-nos indispensável para viabilizar um relacionamento entre a gravidade respiratória da doença e a sua eventual repercussão sistémica, bem como a posterior análise dessa relação em função dos diferentes parâmetros que viessem a ser utilizados nesse estudo.

## 2-MATERIAL

Nestas condições tivemos oportunidade de seleccionar 81 indivíduos caucasianos, **62 doentes** e **19 normais**, sendo estes últimos caracterizados pela ausência de patologia respiratória, prévia e/ou actual, e por uma exploração funcional respiratória isenta de qualquer alteração. Todos os participantes na Amostra Médica, assinaram um consentimento informado aprovado pela Comissão de Ética.

A sua distribuição pelos grupos de risco evolutivos considerados, propostos para a classificação da DPOC pelo estudo GOLD, encontra-se traduzida na Fig. 6. Na sua globalidade, a Amostra Médica foi distribuída por cinco grupos, conforme se pode observar na Fig. 7: 13 no grupo A (16%), 21 no grupo B (26%), 20 no grupo C (25%), 8 no grupo D (10%); 19 (23%) constituíam o grupo de controlo.

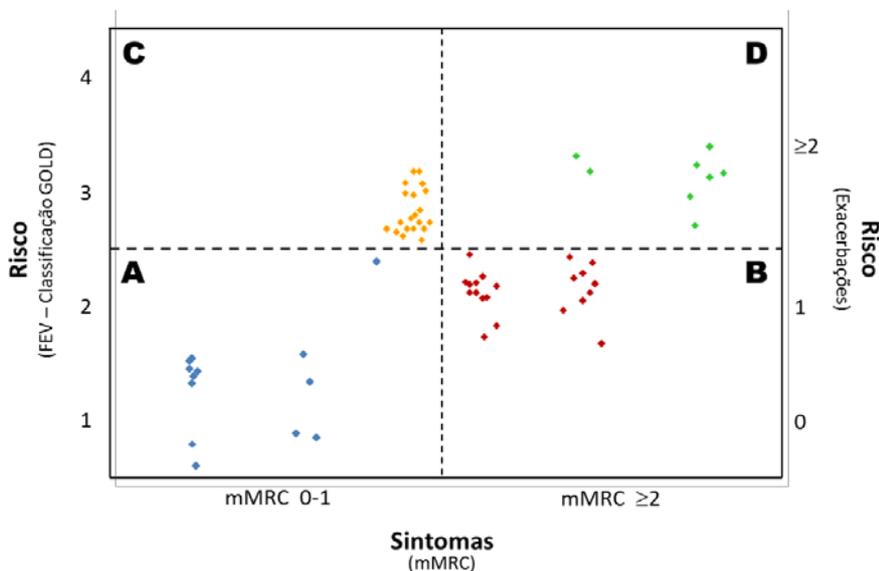


Fig. 6-Distribuição dos Doentes pelos Grupos de Gravidade (GOLD 2013)

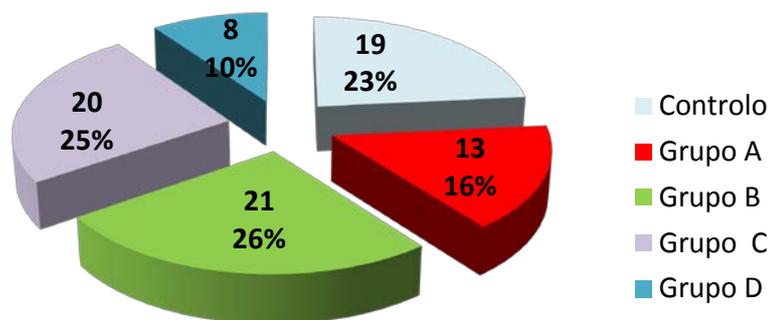


Fig. 7-Distribuição da Amostra Médica pelos cinco Grupos considerados.

Deste conjunto, 66 (81,71%) eram do género masculino e 15 (18,29%) do feminino; a sua distribuição pelos diferentes grupos encontra-se expressa na Fig. 8.

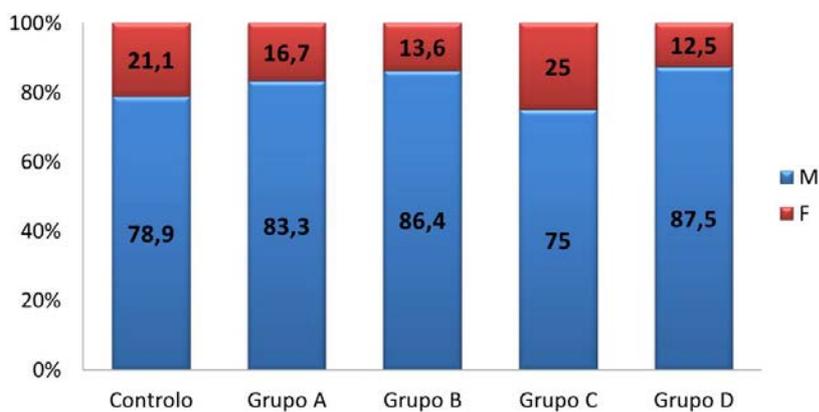


Fig. 8- Distribuição da Amostra Médica por Género

A idade global da Amostra Médica, que variava entre os 33 e os 81 anos, com uma média de  $66,43 \pm 1,14$  anos, pode ser observada no Quadro I. Neste

Quadro podemos apreciar a distribuição da média de idades pelos Grupos.

**Quadro I - Idade da Amostra Médica (Anos)**

Grupo	n	Média	Erro Padrão	IC <sub>95</sub> (Média)	Mínimo	Máximo
Controlo	19	59,26	2,83	53,31-65,22	33	81
Grupo A	13	69,25	2,63	63,46-75,04	49	78
Grupo B	21	67,68	1,65	64,25-71,12	50	79
Grupo C	20	68,90	2,17	64,35-73,45	48	78
Grupo D	8	69,63	2,40	63,96-75,29	58	78
<b>TOTAL</b>	<b>81</b>	<b>66,43</b>	<b>1,14</b>	<b>64,17-68,69</b>	<b>33</b>	<b>81</b>

**p<0,035 Controlo < C**

E como se reconhece na Fig.9 parece existir uma tendência ( $p=0,035$ ) de percentis da distribuição etária por grupos mais baixos nos indivíduos normais e embora não se diferenciem idades por grupos, a comparação entre os normais e os doentes do grupo C mostrou que aparentemente estes são mais idosos ( $p=0,057$ ).

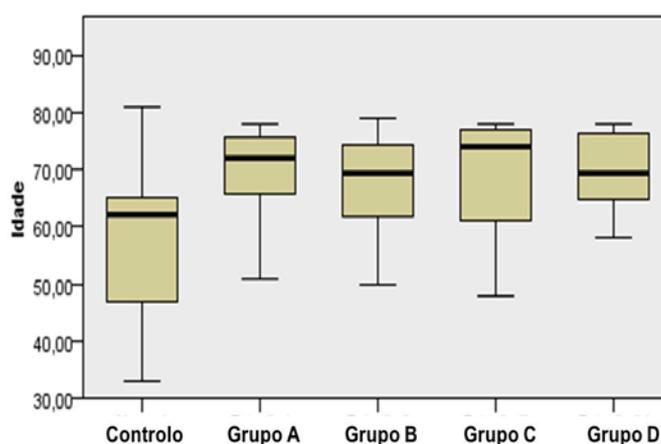


Fig.9-Percentis da Distribuição Etária.

No seu conjunto, apenas se detectaram 4 indivíduos fumadores activos (1 no Grupo Controlo (5,3%), 1 no Grupo A (8,3%) e 2 do Grupo C (10%)) e 22 não

fumadores, não existindo história de hábitos tabágicos actuais, nos grupos B e D.

Entretanto, como se pode reconhecer através da Fig. 10, dos indivíduos com

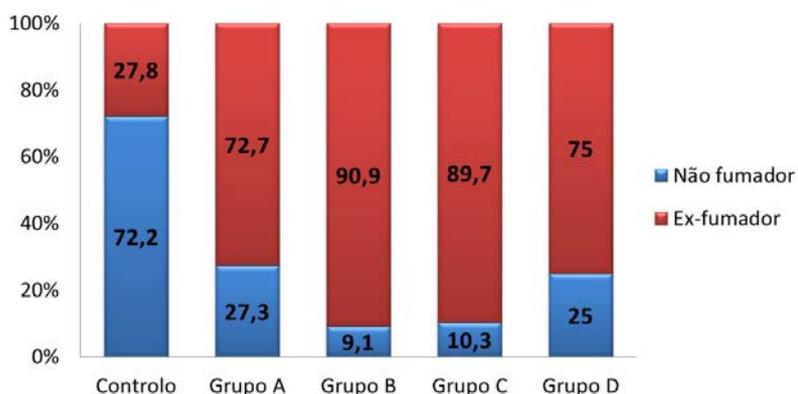


Fig.10- Hábitos Tabágicos

doença, a maioria era ex-fumadora; esta tendência invertia-se no Grupo Controlo ( $p \chi^2 < 0,001$ ), encontrando-se a distribuição da carga tabágica no Quadro II. De facto, entre fumadores e ex-fumadores a carga tabágica total variava entre 10 e 60 UMA, com uma média de  $30,74 \pm 1,69$  e sem diferença significativa entre os diversos grupos patológicos.

**Quadro II - Carga Tabágica (U.M.A)**

Grupo	n	Média	Erro Padrão	IC <sub>95</sub> (Média)	Mínimo	Máximo
Controlo	6	21,17	1,74	16,69-25,64	15	27
Grupo A	9	28,33	3,44	19,38-36,18	15	45
Grupo B	20	28,35	2,69	22,71-33,99	10	50
Grupo C	18	36,71	3,77	28,52-43,71	10	60
Grupo D	6	37,4	4,79	25,19-49,81	20	50
TOTAL	59	30,74	1,69	27,35-34,13	10	60

$r=0,460$ ;  $p<0,001$  Controlo < B/C/D

Assim, o facto de o valor de *odds ratio* ser de 14,16, variando entre 4,05 e 49,54 com 95% de confiança, indica que a circunstância de um destes indivíduos ter sido fumador poderá aumentar o risco de desenvolvimento da doença em cerca de 14 vezes.

### 3-MÉTODOS

Todos os indivíduos que integravam a Amostra Médica foram genericamente observados sob o ponto de vista clínico-laboratorial, na tentativa de confirmar um correcto diagnóstico da situação patológica em causa. Assim, durante a organização da **história clínica**, para além da referência a riscos inalatórios (tabaco, ocupacional, etc.), sintomas como a tosse, expectoração, pieira, dispneia e exacerbações, entre outros, foram exaustivamente explorados, bem como a presença de sinais compatíveis com eventual insuficiência respiratória e a existência de comorbilidades (cardiovasculares, metabólicas, infecciosas, musculo-esqueléticas, neuro-psíquicas, etc.).

**Laboratorialmente**, para além das rotinas habituais (hemograma, PCR, urémia, glicémia, proteinémia total e fraccionada, electroforese das proteínas plasmáticas, provas hepáticas, ionograma, ficha lipídica e exame sumário de urina), deu-se uma particular atenção ao estudo da  $\alpha_1$ -Pi, tanto pelo que diz respeito ao seu doseamento sérico por nefelometria, como à sua caracterização genotípica, e à pesquisa de reacções alérgicas através de testes cutâneos de alergia (prick).

Esta abordagem inicial era completada por um registo **electrocardiográfico** e por um estudo **radiológico do tórax**, que compreendia um exame telerradiográfico nas incidências postero-anterior e lateral imposto pela situação clínica; nalguns casos recorreu-se a estudos em inspiração e expiração profundas, destinados à observação da excursão diafragmática e à detecção de eventual balanço mediastínico. Complementarmente, sempre que os quadros clínicos aconselhavam, efectuou-se uma observação torácica através de tomografia axial computadorizada ou realização de exames radiológicos de

outros departamentos orgânicos, numa perspectiva de apreciação global de cada uma das situações em análise.

Para além deste pilar fundamental da metodologia de estudo deste projecto de investigação, dois outros se afiguraram fundamentais na prossecução dos objectivos definidos: uma exploração funcional respiratória tão completa quanto possível e a opção da abordagem sistémica de eventuais repercussões imuno-inflamatórias.

Quanto ao estudo da **função respiratória**, efectuado em todos os doentes e nos indivíduos normais, abarcou globalmente a gasimetria sanguínea arterial, a ventilação e a difusão alvéolo-capilar. A gasimetria era realizada numa amostra de sangue de 1 cm<sup>3</sup> recolhido por punção directa, com agulha, das artérias radial ou femoral, através do aparelho modelo ABL5 (Radiometer), onde se determinaram os seguintes parâmetros: pH, PaCO<sub>2</sub> (mmHg), PaO<sub>2</sub> (mmHg), Sat oxihemoglobínica (%), HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (nmol/L), ABE (nmol/L), tCO<sub>2</sub> (nmol/L) e SBE (nmol/L).

O estudo ventilatório, efectuado com o recurso a um pletismógrafo (Body-Test Jager), permitiu recolher os seguintes dados: CVmax (L), CVF (L), FEV<sub>1</sub> (L), Índice de Tiffeneau (%), DEMA (L/seg), DEM<sub>25</sub> (L/seg), DEM<sub>50</sub> (L/seg), DEM<sub>75</sub> (L/seg), DEMM<sub>75/25</sub> (L/seg), VMV (L/min), CPT (L), VGIT (L), VR (L), VR/CPT (%), VRI (L), CI (L), VT (L), R (KPa/L), G (L/KPa), SR<sub>tot</sub> (KPa), SG<sub>tot</sub> (L/KPa); a difusão abarcava a recolha dos seguintes elementos: DLCO SB (mmol/min/KPa), DLCO VA (mmol/min/KPa/L), VA, FiCO e FaCO.

Para excluir o diagnóstico de asma, e na sequência das recomendações do programa GOLD, a determinação da CVF e do FEV<sub>1</sub> era repetida após teste de broncodilatação efectuado com a inalação de um simpaticomimético de curta duração de acção pressurizado.

O grau de limitação do débito aéreo assim determinado permitir-nos-ia aferir, para cada um dos doentes, o grau de risco da sua insuficiência ventilatória, segundo as indicações sugeridas pelo programa GOLD:

Risco Ligeiro	(I)	ligeira queda	FEV <sub>1</sub> /FVC<70%; FEV <sub>1</sub> ≥ 80% do aguardado
Risco Moderado	(II)	agravamento da queda	FEV <sub>1</sub> /FVC<70%; 50% ≤ FEV <sub>1</sub> < 80% do previsto
Risco Grave	(III)	agravamento do débito aéreo	FEV <sub>1</sub> /FVC<70%; 30% ≤ FEV <sub>1</sub> < 50% do esperado
Risco Muito Grave	(IV)	limitação muito importante do débito aéreo	FEV <sub>1</sub> /FVC<70%; FEV <sub>1</sub> < 30% do previsto

A associação de quatro parâmetros que no seu conjunto integram o designado **BODE Index**, sabe-se hoje constituírem um importante painel de apreciação da gravidade da DPOC, com impacto na sua mortalidade. Assim, para além do FEV<sub>1</sub> e da caracterização da dispneia pela escala MMRC, demos particular atenção à determinação do índice de massa corporal (IMC) e à quantificação da distância percorrida numa marcha em terreno plano, durante 6 minutos. Com estes quatro parâmetros determinava-se um resultado posteriormente valorizado em função de uma escala numérica de 1 a 10.

Na abordagem de parâmetros sistémicos implicados em eventuais alterações, desencadeadas ou concomitantes à DPOC, optou-se, de acordo com os objectivos iniciais e numa rede tão complexa de possíveis mecanismos intervenientes, pelo estudo de **populações e subpopulações** celulares, particularmente das linfocitárias, susceptíveis de eventual comprometimento em fenómenos de natureza inflamatória presentes na DPOC e nas comorbilidades que frequentemente acompanham esta afecção.

Assim, a tipagem linfocitária foi efectuada por citometria de fluxo, utilizando de cada indivíduo que integrou o conjunto em estudo, 3 cm<sup>3</sup> de sangue periférico recolhido por punção venosa, em tubo com meio anticoagulante. Para marcação das populações linfocitárias, incubaram-se 100 µl de sangue com os anticorpos monoclonais pretendidos durante 10 minutos, à temperatura ambiente e na ausência de luz.

Para determinar as principais populações linfocitárias utilizou-se o Lymphogram (Cytognos-Salamanca, Espanha) que contém os anticorpos monoclonais CD8/CD19, CD3/CD56 e Anti-CD4, marcados com os fluorocromos:

Fluoresceín-Isothiocyanate (FITC), Phycoerythrin (PE) e Phicoerythrin Cyanine (PECY5), respectivamente. Para outras marcações foram usados CD4, CD16 (Immunostep-Salamanca, Espanha), CD19 (Immunotech - Marseille, França) e CCR3 (R e DSYstem - Minneapolis, USA) marcados com FITC, CD16 (Immunotech-Marseille, França), TCR $\gamma\delta$  (Catalg, Invitrogen - Carlsbad, SA, USA); CD127 (BD Pharmingen - San Jose, CA, USA), CCR5 (R e DSYstem - Minneapolis, USA) e CD180 (BD Pharmingen- San Jose, USA) com PE; CD3, CD14 e CD25 (BD Pharmingen - San Jose, CA, USA), APC (Allophycocyanin), CD4, CD8 (BDB Biosciences - San Jose, CA, USA) e CD14 (Immunostep - Salamanca, Espanha); e CD14 com PerCP (Pinidin Chlorophyll Protein).

Após incubação com os anticorpos monoclonais, procedemos à lise eritrocitária utilizando para isso 2 cm<sup>3</sup> de Lysing Solution (BDB Biosciences-San Jose, CA, USA), durante 10 minutos, à temperatura ambiente e no escuro. Seguidamente centrifugou-se a amostra durante de 5 minutos a 450G, no fim dos quais se verteu o sobrenadante e se efectuou uma lavagem com 2 cm<sup>3</sup> de PBS (Phosphate buffer saline), seguida de nova centrifugação durante 5 minutos, igualmente a 450G. Suspenderam-se as células com 500  $\mu$ L de PBS e procedeu-se à leitura no citómetro de fluxo Facscalibur (BD Biosciences-San Jose, CA, USA), usando o *software* de aquisição Cellquest (BD Biosciences-San Jose, CA, USA), adquirindo 10.000 eventos.

Os dados assim obtidos foram guardados e posteriormente analisados, utilizando o programa *Paint-a-gate* que permitiu identificar as populações e subpopulações celulares que nos propusemos estudar.

Na metodologia utilizada para o estudo estatístico, as variáveis qualitativas foram descritas em termos de percentagem sobre cada grupo (Controlo e Grupos A, B, C e D), tendo sido usado o teste Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) de independência para relacionar cada uma das variáveis com o grupo respectivo. No entanto, dado o facto de em algumas situações existirem exageradamente valores aguardados inferiores a 5, tornou-se necessário classificar os indivíduos apenas como normais ou doentes, sem diferenciar graus de doença, com a finalidade de averiguar a existência de associação entre doença e cada

um dos factores, através do teste  $\chi^2$ , ou, na impossibilidade da sua utilização, através do teste exacto de Fisher. Foi ainda determinado o valor de *odds ratio* e respectivo intervalo de confiança a 95%, sempre que tal se justificasse.

Quanto às variáveis quantitativas, elas foram descritas através da sua média e erro-padrão da média amostral (SEM) e ainda através de outros parâmetros de localização, como os percentis 25, 50 e 75. Dada a circunstância de a distribuição das variáveis, em cada grupo, não ser na maioria dos casos normal, verificada pelos testes de Kolmogorov-Smirnov e não existindo uniformidade na dimensão dos grupos, por vezes reduzidos, optou-se por aplicar testes paramétricos para identificar diferenças entre grupos. Assim, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis e, sempre que este detectava alguma diferença entre pelo menos dois grupos, recorreu-se ao teste de Mann-Whitney corrigido para comparações múltiplas, por forma a identificar os pares de grupos que se diferenciavam.

A análise foi efectuada através do SPSS, versão 19, e todos os testes foram avaliados a um nível de significância de 0,05.

## CAPÍTULO III

### RESULTADOS

#### 1-DO ESTUDO FUNCIONAL ESPIROMÉTRICO PRÉVIO

A observação do Quadro III permite-nos constatar a queda do FEV<sub>1</sub> pós-broncodilatação (PBD) (%) ao longo dos diferentes estadios considerados, com uma média total de 68,25% e erro padrão de 3,09.

**Quadro III - Estudo Funcional Respiratório - FEV<sub>1</sub> PBD (%)**

Grupo	n	Média	Erro Padrão	IC <sub>95</sub> (Média)	Mínimo	Máximo
Grupo Controlo	19	102,03	2,73	96,2-108,39	90,4	121
Grupo A	13	92,13	3,15	83,62-98,96	80	112
Grupo B	21	62,56	1,51	59,45-66,12	50,3	78
Grupo C	20	41,77	1,49	38,25-44,74	30	49
Grupo D	8	31,35	2,43	25,61-37,09	23,2	45
Total	81	68,25	3,09	62,09-74,4	23,2	121

**r=0.949; p<0.001; Controlo>B/C/D; A>C/D; B>C/D**

Os valores determinados oscilaram entre 23,2 e 121%. As diferenças entre o Grupo Controlo e os sucessivos grupos patológicos apresentavam-se reconhecidamente significativas:  $r=0,949$ ;  $p<0,001$  (Quadro III). Aliás, como se pode observar na Fig.11, encontram-se diferenças similares entre o Grupo de Controlo e os Grupos B/C/D, o Grupo A e os Grupos C/D e o Grupo B e os Grupos C/D.

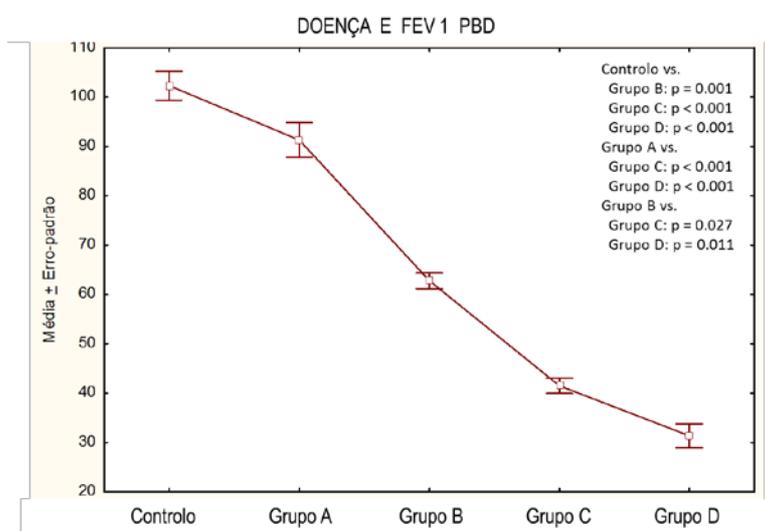


Fig.11-Valores Prévios do FEV<sub>1</sub> (PBD)

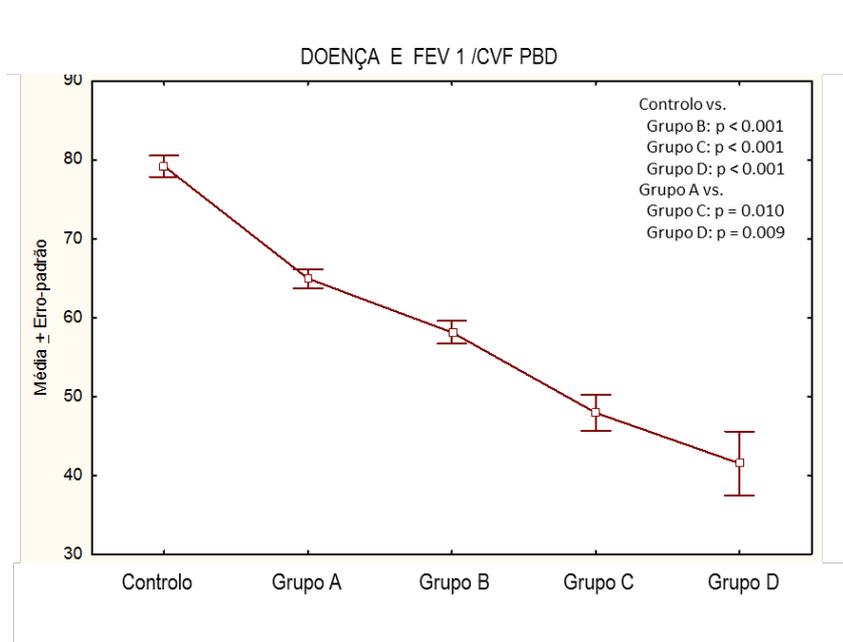
A análise dos resultados do estudo do FEV<sub>1</sub>/CVF PBD (%) revelou diferenças estatisticamente significativas ( $r=0,857$ ;  $p<0,001$ ), sobreponíveis às anteriores (Quadro IV), com uma média global de 60,08%; SEM=1,66 e valores mínimo de 28,6 e máximo de 93,5 (Quadro IV).

**Quadro IV - Estudo Funcional Respiratório - FEV1/CVF PBD (%)**

Grupo	n	Média	Erro Padrão	IC <sub>95</sub> (Média)	Mínimo	Máximo
Grupo Controlo	19	81,5	1,18	76,34-82,04	70,7	93,5
Grupo A	13	64,94	1,20	62,3-67,58	56	69
Grupo B	21	58,36	1,41	55,11-61,18	48	69
Grupo C	20	47,76	2,19	43,14-52,12	33,4	67,4
Grupo D	8	41,54	4,05	31,95-51,12	28,6	62
Total	81	60,08	1,66	56,78-63,38	28,6	93,5

**r=0.857; p<0.001; Controlo>B/C/D; A>C/D**

Assim, a dispersão dos doentes pelos diferentes grupos evolutivos, em função da limitação do seu débito aéreo mostrou que este diminuía significativamente ( $p < 0,001$  - Kruskal-Wallis) com a doença e com o seu agravamento (Fig. 12).



**Fig.12-Valores prévios do FEV<sub>1</sub>/CVF (PBD)**

## 2-DO ESTUDO CLÍNICO-LABORATORIAL

Quanto às queixas respiratórias, a dispneia (Quadro V) atinge todos os grupos e é particularmente gravosa (graus 2 a 4) nos grupos B e D, onde afecta a totalidade dos indivíduos. De facto parece existir uma tendência crescente da dispneia ( $p < 0,001$ ) com a progressão da doença, sendo o grau 0/1 mais frequente no grupo A, o grau 1/2 no grupo C, o grau 2/3 no grupo B e o grau 4 no grupo D.

**Quadro V - Sintomas Respiratórios - Dispneia**

Escala (MMRC)	Grupo A (n=13)	Grupo B (n=21)	Grupo C (n=20)	Grupo D (n=8)
0-1	13 (100%)	-	-	-
1-2	-	-	20 (100%)	-
2-3	-	21 (100%)	-	-
3-4	-	-	-	8 (100%)

A tosse e a dispneia, isoladamente (Quadro VI), afectavam em percentagens sobreponíveis os doentes dos grupos A, B e C, mas sempre que se associava a expectoração, a percentagem praticamente duplicava atingindo a totalidade dos indivíduos do grupo D.

**Quadro VI - Sintomas Respiratórios**

Sintomas	Grupo A (n=13)	Grupo B (n=21)	Grupo C (n=20)	Grupo D (n=8)	p
Tosse+ Dispneia	4 (33%)	7 (31,8%)	6 (30%)	-	$p=0,333$
Tosse+Dispneia+ Expectoração	8 (66,7%)	15 (68,2%)	14 (70,0%)	8 (100%)	$p=0,331$

Curiosamente, todos os doentes referiam exacerbações da sua DPOC (Quadro VII), habitualmente de origem infecciosa e adstritas à época fria, mas a respectiva frequência apresentava uma tendência ao seu aumento ( $\geq 2$ ) com o agravamento da doença.

**Quadro VII - Exacerbações/Ano**

Nº Exacerbações/Ano	Grupo A (n=13)	Grupo B (n=21)	Grupo C (n=20)	Grupo D (n=8)
0-1	13 (100%)	-	-	-
1-2	-	21 (100%)	-	-
2-3	-	-	20 (100%)	-
3-4	-	-	-	8 (100%)

O facto de muitos destes indivíduos exercerem mais do que uma actividade explica que o risco profissional inalatório (Quadro VIII) ultrapassasse sempre o número de doentes que integravam o respectivo grupo, e fosse particularmente elevado nos Grupos A e C. Neste contexto, revelou-se mais nociva a profissão de pedreiro (11 casos), as tarefas agrícolas (19 casos) e o trabalho na construção civil (15 casos).

**Quadro VIII - Risco Profissional Inalatório**

Grupo	n	%
Controlo	9	47,4
Grupo A	11	91,7
Grupo B	17	77,3
Grupo C	17	85,0
Grupo D	6	75,0
TOTAL	60	74,1

**p <0,030**

Entretanto, o estudo clínico global dos doentes viria a revelar a presença de um considerável número de outros processos patológicos associados à DPOC, com eventual relevância no enquadramento das ligações sistémicas desta afecção (Quadro IX).

**Quadro IX - Comorbilidades**

Afecção	Total	Grupo A n=13	Grupo B n=21	Grupo C n=20	Grupo D n=8	p
Inf. Resp. Inf.	59 (95,16%)	11 (91,7%)	21 (100%)	19 (95,0%)	8 (100%)	p<0,001
Inf. Resp. Sup.	25 (40,32%)	4 (33,3%)	10 (45,5%)	7 (35,0%)	4 (50,0%)	p=0,013
HTA	48 (77,41%)	8 (67,1%)	19 (86,4%)	13 (65,0%)	8 (100%)	p<0,001
Diabetes mellitus	11 (17,74%)	1 (8,3%)	4 (18,2%)	4 (20,0%)	2 (25,0%)	p=0,267
Dislipidémia	46 (74,19%)	7 (58,3%)	16 (72,7%)	16 (80,0%)	7 (87,5%)	p<0,001
Ins. Cardíaca	16 (25,80%)	1 (8,3%)	3 (13,6%)	7 (35,0%)	5 (62,5%)	p=0,001
Excesso Ponderal	47 (75,80%)	9 (75,0%)	17 (77,3%)	15 (75,0%)	6 (75,0%)	p<0,001
Osteoporose	21 (33,87%)	6 (50,0%)	4 (18,2%)	8 (40,0%)	3 (37,5%)	p=0,007
Depressão	7 (11,29%)	1 (8,3%)	0 (0,0%)	4 (1,7%)	2 (25,0%)	p=0,044
Neoplasia	2 (3,23%)	1 (8,3%)	0 (0,0%)	1 (5,0%)	0 (0,0%)	-

Com efeito, desse conjunto destaca-se a presença de 59 indivíduos atingidos em diferentes épocas por infecções respiratórias inferiores, 48 por hipertensão arterial, 16 por insuficiência cardíaca, 46 dislipidémicos, 47 com excesso ponderal, 21 por osteoporose e 7 por depressão. Assim, a presença de doença parece estar associada à hipertensão arterial ( $p \chi^2 < 0,001$ ; OR=15,00; IC<sub>95%</sub>: 3,86-58,37), à dislipidémia ( $p \chi^2 < 0,001$ ; OR=26,07; IC<sub>95%</sub>: 5,39-126,15), a infecções respiratórias inferiores (pFisher=0,002; OR=21,43; IC<sub>95%</sub>: 2,31-198,18), a infecções respiratórias superiores ( $p \chi^2 < 0,001$ ), à osteoporose

(pFisher=0,018; OR=8,78; IC<sub>95%</sub>: 1,09-70,52), à insuficiência cardíaca e ao excesso de peso (p Fisher=0,017).

Quanto aos antecedentes patológicos (Fig. 13) salienta-se que a presença de

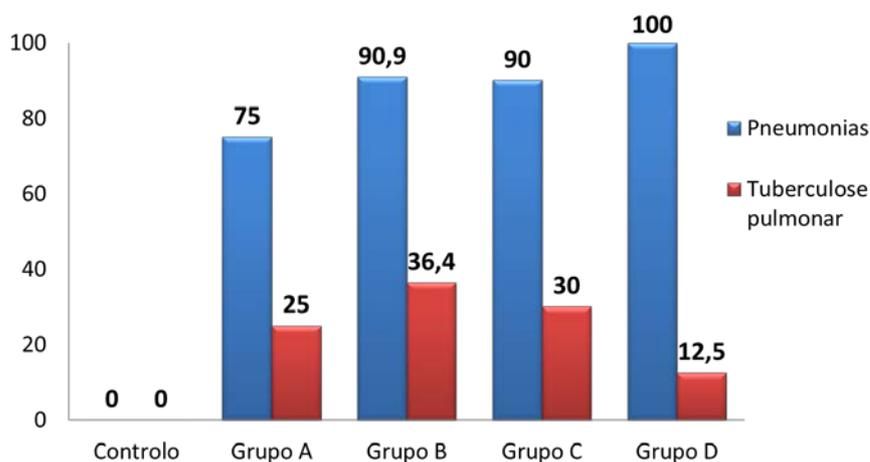


Fig.13- Antecedentes de Pneumonia e Tuberculose Pulmonar

DPOC não parece estar significativamente associada a uma antiga tuberculose pleuro-pulmonar (pFisher=0,053), mas o facto de terem existido no passado destes doentes pneumonias, pode aumentar o risco de desenvolvimento da doença em cerca de 5 vezes (pFisher<0,001; OR=5,35; IC<sub>95%</sub>: 1,52-18,79) (Quadro X).

#### Quadro X - Antecedentes Patológicos Respiratórios

Afecção	Total	Controlo n=19	Grupo A n=13	Grupo B n=21	Grupo C n=20	Grupo D n=8	p
Pneumonia	55 (88,7%)	0 (0,0%)	9 (75,0%)	20 (90,9%)	18 (90,0%)	8 (100%)	p<0,001
Tuberculose Pleuro- Pulmonar	18 (29,0%)	0 (0,0%)	3 (25,0%)	8 (36,4%)	6 (30,0%)	1 (12,5%)	p=0,053

O índice de massa corporal (IMC) expresso em kg/m<sup>2</sup>, embora variasse entre

um mínimo de 20 e o máximo de 41,1 apresentava (Quadro XI), entre os diferentes grupos, valores médios muito aproximados (Fig.14).

**Quadro XI - Índice de Massa Corporal (kg/m<sup>2</sup>)**

Grupo	n	Média	Erro Padrão	IC <sub>95</sub> (Média)	Mínimo	Máximo
Controlo	19	27,93	1,09	25,63-30,23	20	36,9
Grupo A	13	29,05	1,17	26,48-31,6	22,4	33,6
Grupo B	21	29,30	1,18	26,85-31,75	20,7	39,2
Grupo C	20	27,37	1,03	25,2-29,53	20,5	41,1
Grupo D	8	28,04	1,09	25,45-30,62	23,1	30,4
Total	81	28,34	0,52	27,3-29,37	20	41,1

**p=0,545**

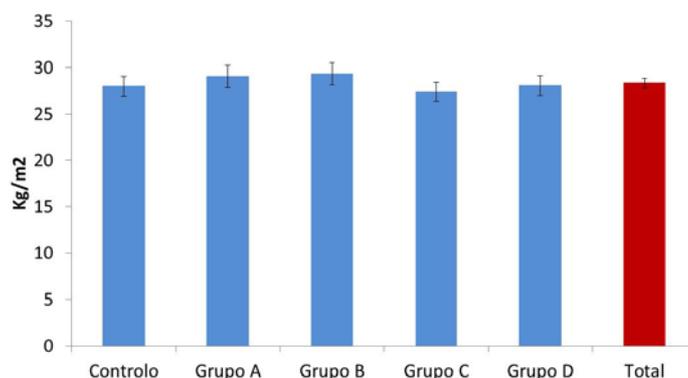


Fig.14- Valores Médios do IMC

Apesar disso, a média global corresponde a um excesso de peso (28,34 Kg/m<sup>2</sup>, SEM=0,52; IC<sub>95%</sub>: 27,3-29,37).

O valor médio global do BODE Index (Quadro XII) correspondia a 1,99; SEM=0,27; IC<sub>95%</sub>: 1,45- 2,53, mínimo de 0 e máximo de 9.

**Quadro XII - Bode Index**

<b>Grupo</b>	<b>n</b>	<b>Média</b>	<b>Erro Padrão</b>	<b>IC<sub>95</sub> (Média)</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>
Grupo A	13	0,17	0,11	0,08-0,45	0	1
Grupo B	21	0,95	0,10	0,74-1,17	0	2
Grupo C	20	4,25	0,22	3,8-4,7	3	6
Grupo D	8	7,29	0,36	6,41-8,17	6	9
Total	62	1,99	0,27	1,45-2,53	0	9

No entanto, a análise, quer dos resultados médios dos diferentes grupos (Quadro XII), quer percentualmente em relação ao espectro de graduação deste parâmetro (Fig. 15), revela que a distribuição dos valores do BODE Index parece indicar que este é superior na presença de doença, aumentando com o seu agravamento. A respectiva avaliação por percentis e a sua comparação pelos testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney mostra que existe uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos patológicos ( $p < 0,001$ ), apresentando o Grupo Controlo valores idênticos ao Grupo A dos doentes. Entretanto, os valores do Grupo A são significativamente inferiores aos do Grupo B ( $p = 0,01$ ), do Grupo C ( $p < 0,001$ ) e do Grupo D ( $p < 0,001$ ). Além disso, os doentes do Grupo A apresentavam valores que não se afastavam significativamente dos que pertenciam ao Grupo B ( $p = 0,192$ ), mas que eram inferiores aos dos Grupos C ( $p < 0,001$ ) e D ( $p < 0,001$ ), e embora, não tivessem sido detectadas diferenças significativas entre os Grupos C e D ( $p = 1,000$ ), cada um destes conjuntos exibia valores significativamente superiores aos dos pacientes que correspondiam ao Grupo B ( $p = 0,005$  e  $p < 0,001$ , respectivamente).

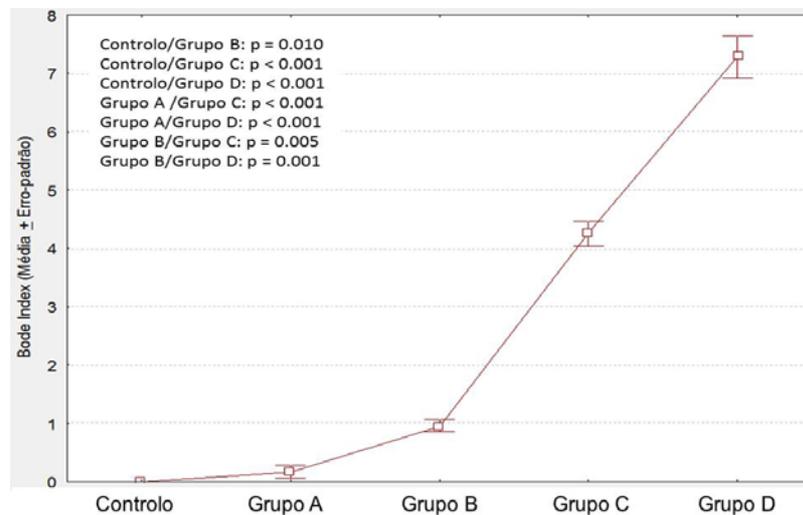


Fig.15-Valores do BODE Index nos diferentes Grupos

Do estudo da  $\alpha_1$ .Pi destacava-se o facto de apenas uma percentagem mínima, em cada grupo, ser portadora de uma deficiência desta anti-protease, não tendo sido reconhecida qualquer associação entre essa alteração e o grau evolutivo da doença (pFisher=0,426). Entretanto, pôde-se constatar (Quadro XIII) que aos grupos mais avançados da afecção (C e D) correspondiam os níveis séricos mais baixos da  $\alpha_1$ .Pi.

**Quadro XIII – Caracterização genotípica e doseamento sérico da  $\alpha_1$ Pi**

	Grupo A	Grupo B	Grupo C	Grupo D	Total
n	3	1	3	2	9
$\alpha_1$ .Pi Genótipo	MS - 0,82 MS - 0,83 MZ - 0,85	MS - 1,20	ZZ - 0,20 ZZ - 0,18 ZZ - 0,61	MZ - 0,10 MZ - 0,43	
MED	0,8333	1,20	0,3300	0,2650	0,7870
SEM	0,00882	0,72500	0,14012	0,16500	0,23551
IC <sub>95%</sub>	0,80 - 0,87	-7,29 - 11,14	-0,27 - 0,93	-1,83 - 2,36	0,25 - 1,32

Assim, o doseamento da  $\alpha_1$ .Pi correlacionou-se positivamente com a doença (p Kruskal-Wallis<0,001) e correlações múltiplas, mostraram diferenças estatisticamente significativas entre os Grupos B e C (p<0,032) e os Grupos A e D (p<0,039).

### 3-DO ESTUDO RADIOLÓGICO

Das variadas e numerosas alterações radiológicas que correspondiam aos indivíduos distribuídos pelos grupos considerados neste trabalho, permitimo-nos salientar aquelas que se revelaram mais importantes e que melhor se enquadravam neste estudo da DPOC: os dois tipos de enfisema - centro e panlobular - e as lesões que integravam o padrão radiológico de bronquite crónica.

A sua análise (Quadro XIV) mostra que as alterações típicas do enfisema centrolobular, observáveis através de TAC, afectavam maioritariamente e significativamente (p<0,013) os Grupos mais graves (C e D), acompanhadas, aliás, mas em muito menor grau, pelo enfisema panlobular.

**Quadro XIV – Alterações Imagiológicas**

Alteração	Grupo A (n=13)	Grupo B (n=21)	Grupo C (n=20)	Grupo D (n=8)	p
Enfisema CL	5 (41,7%)	14 (63,6%)	17 (85,0%)	8 (100%)	p=0,013
Enfisema PL	1 (8,3%)	0 (0,0%)	3 (15,0%)	2 (25,0%)	p=0,119
Bronquite Crónica	7 (58,3%)	21 (100%)	16 (80,0%)	6 (75,0%)	p=0,017

Curiosamente, a prevalência da bronquite crónica, que era máxima no Grupo B, variava significativamente (p<0,017) em sentido inverso ao do enfisema, isto é, diminuía à medida que se agravava a afecção.

#### 4-DO ESTUDO FUNCIONAL RESPIRATÓRIO

Os resultados globais considerados constam dos quadros que se apresentam seguidamente. Deles salientamos os parâmetros que se nos afiguraram com maior interesse para a caracterização das alterações funcionais que atingiam estes doentes, numa perspectiva do correlacionamento da DPOC com eventuais repercussões sistémicas desta afecção.

Assim, foram considerados no âmbito ventilatório: o FEV<sub>1</sub> e FEV<sub>1</sub>/CVF pós-broncodilatação (PBD) (já apresentados na fase inicial deste capítulo), o VR, a CPT, a VR/CPT, a DLCO e, no âmbito gasimétrico arterial, o pH, a PaO<sub>2</sub>, a PaCO<sub>2</sub> e a Sat.

##### A-Da Vertente Ventilatória

Como se pode reconhecer através da observação do Quadro XV, a totalidade dos doentes que efectuaram a medição do seu VR apresentava um valor médio de 149,87%; SEM=5,33; IC<sub>95%</sub>: 139,25-160,48.

**Quadro XV - Estudo Funcional Respiratório - VR (%)**

Grupo	n	Média	Erro Padrão	IC <sub>95</sub> (Média)	Mínimo	Máximo
Grupo Controlo	18	126,89	2,20	122,25-131,53	93,0	138,0
Grupo A	11	136,0	9,07	115,80-156,21	103,0	190,0
Grupo B	21	147,60	9,73	127,31-167,88	92,0	283,0
Grupo C	20	159,75	12,08	134,47-185,03	81,0	285,0
Grupo D	8	201,88	23,01	147,47-256,28	93,0	289,0
Total	78	149,87	5,33	139,25-160,48	81,0	289,0

**r=0,412; p<0,001; Controlo<D**

Mas a evolução pelos diferentes grupos patológicos vai aumentando significativamente ( $p < 0,001$ ), de 136,00 até 201,8%. De facto, como nos mostra a Fig.16, as comparações múltiplas permitiram identificar diferenças estatisticamente significativas entre os seguintes grupos: Controlo/Grupo D ( $p = 0,001$ ); Grupo A/ Grupo D ( $p = 0,013$ ) e Grupo B/ Grupo D ( $p = 0,027$ ). Assim, o valor do VR está significativamente relacionado com a doença ( $p_{\text{Kruskal-Wallis}} < 0,001$ )

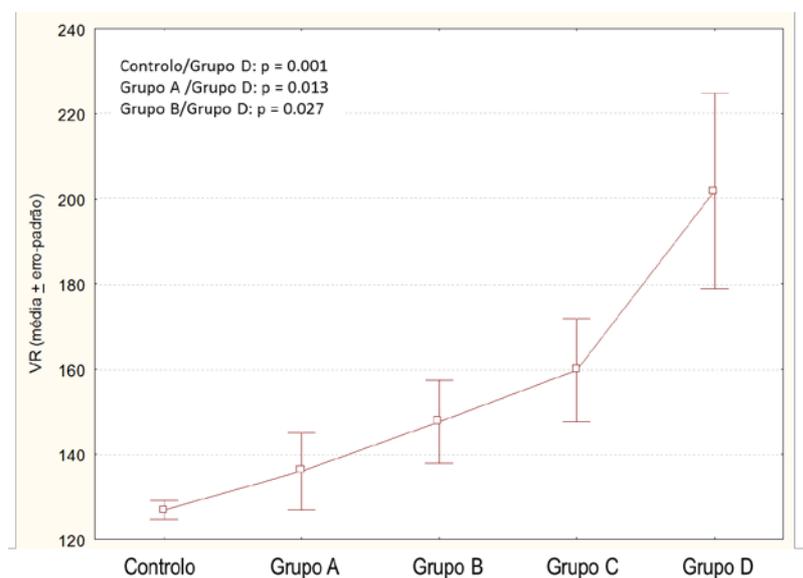


Fig. 16- Evolução do VR em função da gravidade da DPOC

Pelo contrário, a CPT, com uma média global de 112,28%; SEM=2,02; IC<sub>95%</sub>: 108,26-116,31, mostrou valores praticamente sobreponíveis entre os diferentes Grupos e os Controlos (Quadro XVI), não sendo influenciados significativamente pela gravidade da afecção ( $p = 0,336$ ).

**Quadro XVI - Estudo Funcional Respiratório - CPT (%)**

Grupo	n	Média	Erro Padrão	IC <sub>95</sub> (Média)	Mínimo	Máximo
Grupo Controlo	19	115,0	2,34	110,09-119,91	83,0	128,0
Grupo A	11	116,55	4,51	106,51-126,58	92	141,0
Grupo B	21	107,33	4,33	98,30-116,37	77	157,0
Grupo C	20	109,86	4,87	99,67-120,05	76,0	157,0
Grupo D	8	119,0	7,14	102,12-135,88	89,0	146,0
Total	79	112,28	2,02	108,26-116,31	76	157,0

**p=0,336**

Deste modo, não admira que a evolução da relação VR/CPT apresentasse resultados praticamente sobreponíveis aos do VR considerado isoladamente (Quadro XVII). Com efeito, o valor médio total de 130,93%; SEM=2,91; IC<sub>95%</sub>: 125,13-136,73, já de si elevado, parece exceder os níveis superiores e significativamente elevados ( $p < 0,001$  e  $r = 0,702$ ) a partir do Grupo B.

**Quadro XVII - Estudo Funcional Ventilatório-VR/CPT (%)**

Grupo	n	Média	Erro Padrão	IC <sub>95</sub> (Média)	Mínimo	Máximo
Grupo Controlo	18	108,94	0,72	107,42-110,47	103,0	115,0
Grupo A	11	113,46	5,48	101,25-125,66	82,0	143,0
Grupo B	21	133,77	3,96	125,50-142,03	105,0	174,0
Grupo C	20	141,46	5,00	130,99-151,93	80,0	182,0
Grupo D	8	170,63	8,80	149,82-191,43	127,0	208,0
Total	78	130,93	2,91	125,13-136,73	80,0	208,0

**r=0,702; p<0,001; Controlo <B/C/D; A<C/D**

Com efeito, também neste caso (Fig. 17) as comparações múltiplas mostram

diferenças estatisticamente significativas ao longo dos grupos considerados: Controlo/Grupo B ( $p=0,001$ ); Controlo/Grupo C ( $p<0,001$ ); Controlo/Grupo D ( $p<0,001$ ); Grupo A/Grupo B ( $p=0,028$ ); Grupo A/Grupo C ( $p=0,001$ ); Grupo A/Grupo D ( $p<0,001$ ); Grupo B/Grupo D ( $p<0,001$ ); Grupo C/Grupo D ( $p=0,002$ ).

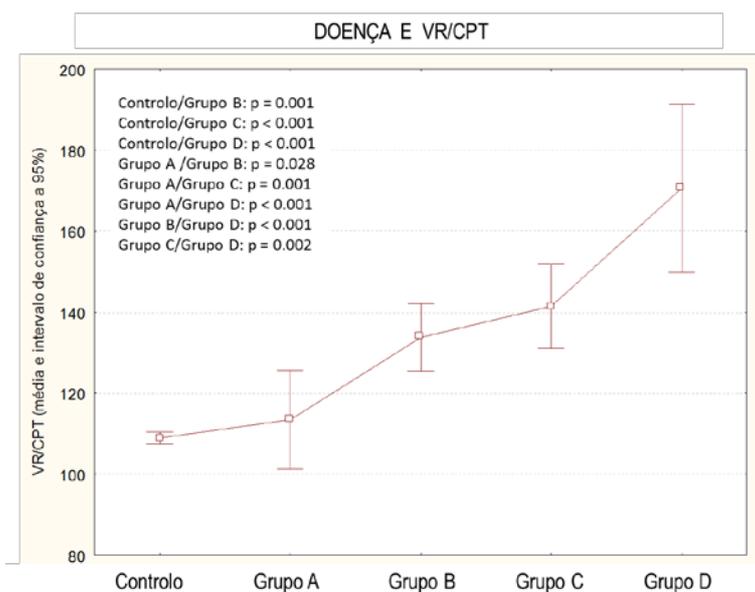


Fig. 17- Evolução da VR/CPT e gravidade da DPOC

Nestas circunstâncias, a relação VR/CPT correlacionava-se significativamente com a doença ( $p$  ANOVA  $<0,001$ ).

O estudo da difusão álveolo-capilar pelo monóxido de carbono (Quadro XVIII), efectuado em 68 indivíduos, mostrava uma significativa queda deste parâmetro tanto no SB ( $p<0,001$  e  $r=0,684$ ) como em relação ao VA ( $p<0,001$ ;  $r=0,524$ ), sobretudo a partir da transição do Grupo B para o C (78,64/50,99 e 97,55/67,47 respectivamente).

### Quadro XVIII - Estudo Funcional Respiratório - DLCO SB/DLCO Va (%)

Grupo	n	Média	P <sub>25</sub>	P <sub>50</sub>	P <sub>75</sub>	Mínimo	Máximo
Controlo SB	16	109,50 ±1,39	105,25	109,00	114,75	100,00	118,00
Controlo VA	16	114,44± 1,46	110,13	113,50	119,75	106,00	128,00
Grupo A SB	9	79,92±15,74	13,50	92,00	115,75	54,00	151,00
Grupo A VA	9	75,92±14,54	13,00	93,00	115,50	52,00	132,00
Grupo B SB	20	78,64±6,90	68,50	81,00	97,00	51,00	137,00
Grupo B VA	20	97,55±8,90	77,00	104,00	124,25	56,00	166,00
Grupo C SB	17	50,99±5,94	39,40	53,50	67,75	38,00	88,00
Grupo C VA	17	67,47±9,12	37,33	75,00	99,00	34,00	161,00
Grupo D SB	6	33,13±9,86	5,25	31,50	52,25	21,00	82,00
Grupo D VA	6	42,25±11,51	6,25	45,00	72,25	25,00	86,00

**DLCO SB; r= 0,684; p<0,001; Controlo>B/C/D**  
**DLCO VA; r=0,524; p<0,001; Controlo>C/D; B>D**

Por isso a DLCO se correlacionava significativamente (p ANOVA<0,001) com a doença em estudo, tanto em relação ao SB como ao VA.

Na verdade, a observação das Figs. 18 A e B está de acordo com o resultado das comparações múltiplas: Controlo/Grupo B (p=0,007); Controlo/Grupo C (p<0,001); Controlo/Grupo D (p<0,001); Grupo A/Grupo C (p<0,001); Grupo A/Grupo D (p<0,001); Grupo B/Grupo C (p=0,001); Grupo B/ Grupo D (p<0,001), pelo que diz respeito à DLCO SB; e Controlo/Grupo C (p =0,001); Controlo/Grupo D (p<0,001) no que se refere à DLCO VA.

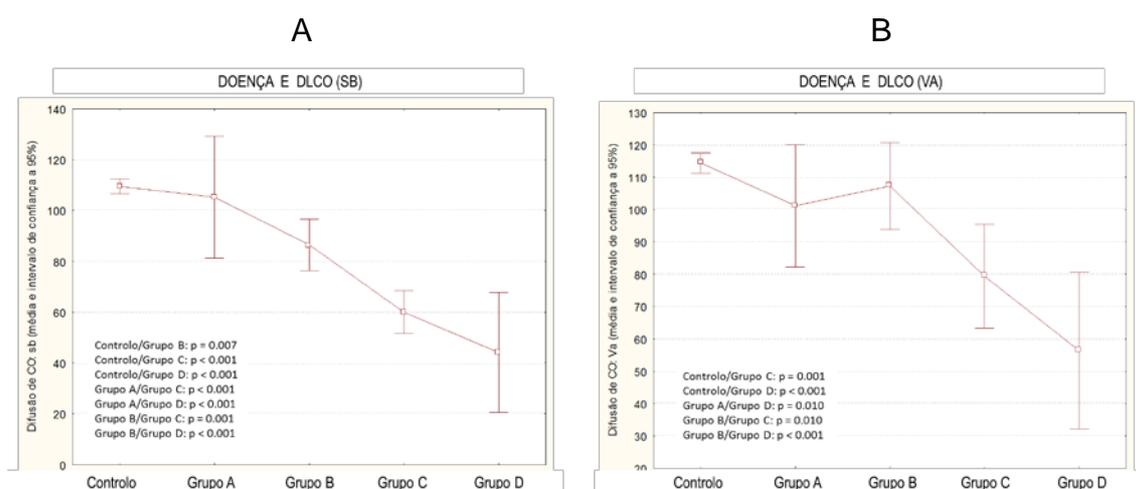


Fig. 18 A e B- Evolução da DLCO em SB (A) e em VA (B)

## B-Da Vertente Gasimétrica Arterial

O cálculo do pH (Quadro XIX) não mostrou alterações significativas dos seus valores ( $p=0,626$ ), os quais eram muito idênticos nos diversos grupos, com uma média de 7,42; SEM=0,004; IC<sub>95%</sub>: 7,42-7,43.

**Quadro XIX - Estudo Funcional Respiratório- Gasimetria Arterial (pH)**

Grupo	n	Média	Erro-Padrão	IC95 (Média)	Mínimo	Máximo
Grupo A	12	7,42	0,005	7,41-7,43	7,39	7,45
Grupo B	19	7,41	0,007	7,41-7,44	7,39	7,53
Grupo C	20	7,43	0,007	7,41-7,44	7,38	7,50
Grupo D	8	7,41	0,008	7,39-7,43	7,38	7,45
Total	59	7,42	0,004	7,42-7,43	7,38	7,53

**p=0,626**

Já a PaO<sub>2</sub> diminuía progressiva e significativamente ( $p<0,001$ ;  $r=0,494$ ), sobretudo a partir do Grupo B (Quadro XX), com valores mais baixos nos Grupos C e D (69,25 e 55,00 mmHg), respectivamente.

**Quadro XX - Estudo Funcional Respiratório - Gasimetria Arterial (PaO<sub>2</sub> mmHg)**

Grupo	n	Média	Erro-Padrão	IC <sub>95</sub> (Média)	Mínimo	Máximo
Grupo A	12	76,50	1,48	73,24-79,76	70,0	85,0
Grupo B	19	71,47	1,40	68,54-74,41	61,0	79,0
Grupo C	20	69,25	1,25	66,63-71,87	62,0	82,0
Grupo D	8	55,00	3,40	45,61-64,39	40,0	74,0
Total	59	69,51	1,18	67,14-71,87	40,0	85,0

**r=0,494; p<0,001; D<A**

A Fig. 19 mostra-nos como a PaO<sub>2</sub> se correlacionava significativamente (p ANOVA<0,001) com a doença, através de comparações múltiplas: Grupo A/ Grupo C (p=0,021); Grupo A/Grupo D (p<0,001); Grupo B/Grupo D (p<0,001); Grupo C/Grupo D (p<0,001).

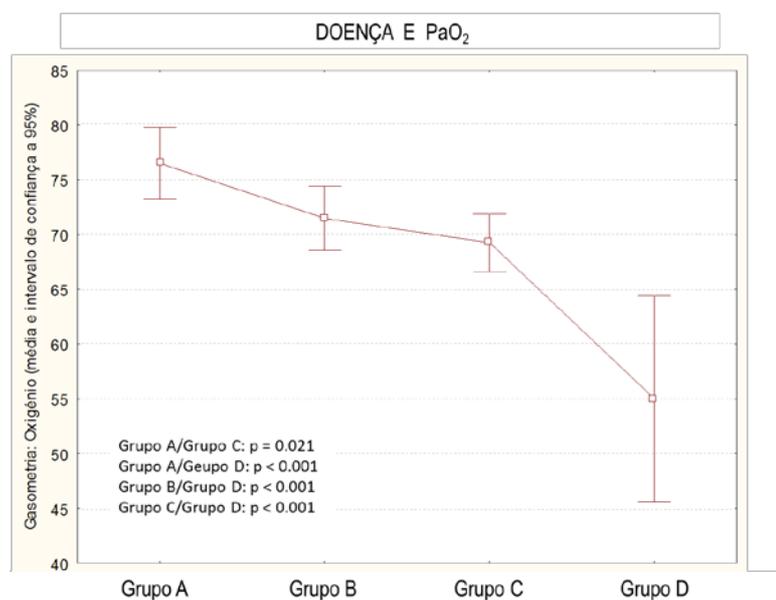


Fig. 19-Evolução da PaO<sub>2</sub> e gravidade da Doença

A PaCO<sub>2</sub> apontava no mesmo sentido que o parâmetro anterior, embora com evoluções diferentes. Com efeito, também neste caso (Quadro XXI), o valor que mais se afastava do normal correspondia ao Grupo D: 47,13 mmHg, oscilando entre um mínimo de 39 mmHg e o máximo de 55 mmHg, SEM=1,71;IC<sub>95%</sub>: 43,09-51,16.

**Quadro XXI - Estudo Funcional Respiratório- Gasimetria Arterial  
(PaCO<sub>2</sub> mmHg)**

Grupo	n	Média	Erro-Padrão	IC <sub>95</sub> (Média)	Mínimo	Máximo
Grupo A	12	39,92	1,17	37,34-42,49	33,0	44,0
Grupo B	19	41,00	0,80	39,32-42,68	36,0	48,0
Grupo C	20	40,65	1,20	38,13-43,17	31,0	49,0
Grupo D	8	47,13	1,71	43,09-51,16	39,0	55,0
Total	59	41,49	0,64	40,20-42,78	31,0	55,0

p= 0,013; D>A

Apesar de valores praticamente normais nos restantes grupos, a PaCO<sub>2</sub> correlacionava-se significativamente (pANOVA=0,013) com a doença, como se reconhece através da observação da Fig.20 e dos resultados obtidos com as comparações múltiplas: Grupo A/Grupo D (p=0,005); Grupo B/Grupo D (p=0,011); Grupo C/Grupo D (p=0,006).

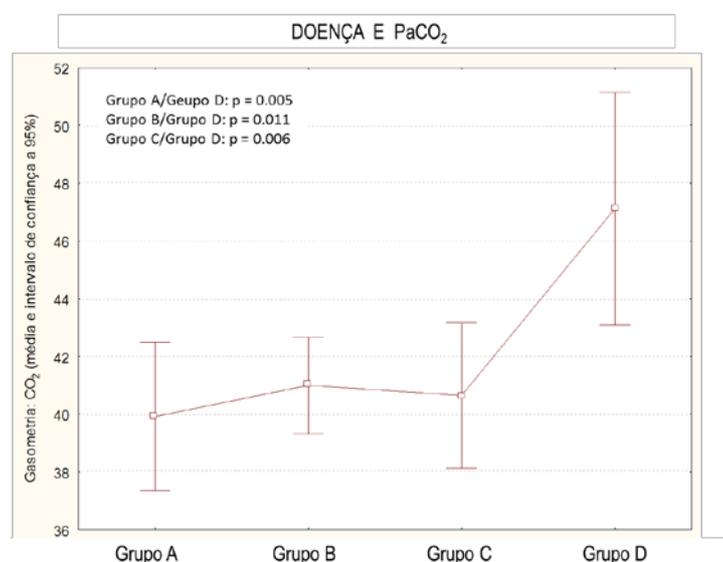


Fig.20-Evolução da PaCO<sub>2</sub> e gravidade da Doença

No mesmo sentido e de uma forma praticamente sobreponível evoluiu a Sat (Quadro XXII), com valores correspondentes ao Grupo D de 86,25% (máximo de 93 e mínimo de 77), SEM=2,16; IC<sub>95%</sub>: 81,14-91,36, francamente diminuídos, justificando um correlacionamento significativo (pKruskal-Wallis<0,001; r=0,633) deste parâmetro com a evolução da DPOC.

**Quadro XXII - Estudo Funcional Respiratório- Gasimetria Arterial (Sat%)**

Grupo	n	Média	Erro-Padrão	IC <sub>95</sub> (Média)	Mínimo	Máximo
Grupo A	12	95,08	0,39	94,21-95,96	93,0	98,0
Grupo B	22	94,64	0,29	94,02-95,26	91,0	96,0
Grupo C	20	93,15	0,38	92,34-93,96	90,0	97,0
Grupo D	8	86,25	2,16	81,14-91,36	77,0	93,0
Total	62	93,16	0,48	92,21-94,11	77,0	98,0

r=0,633; p<0,001; D<A/B

Estes resultados encontram-se igualmente expressos na Fig. 21, através das comparações múltiplas: Grupo A/Grupo D (p<0,001); Grupo B/Grupo D (p<0,001); Grupo C/Grupo D (p<0,001).

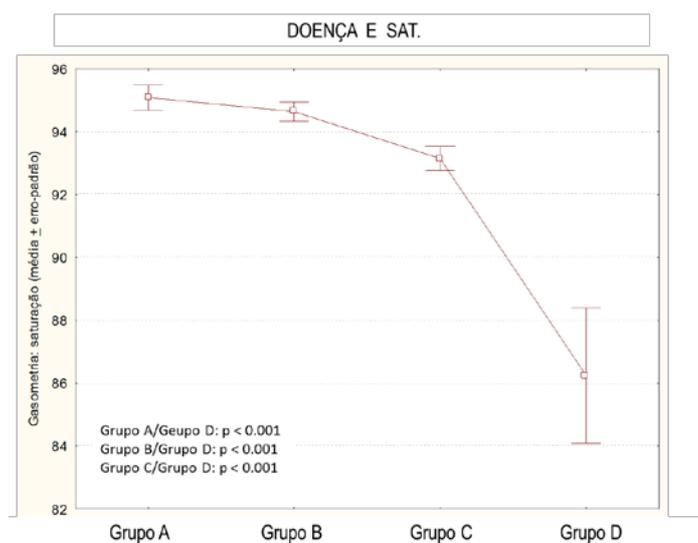


Fig.21- Valores da Sat ao longo da evolução da doença

## 5-DO ESTUDO DAS POPULAÇÕES E SUBPOPULAÇÕES CELULARES NO SANGUE PERIFÉRICO

Das populações celulares (Quadro XXIII), somente os linfócitos totais diminuía paralelamente ao agravamento da doença, aliás de uma forma significativa ( $p=0,005$ ). No Grupo D o seu valor médio de  $1467,25 \pm 258,98$  (MED $\pm$ SEM) era praticamente metade do que correspondia ao Grupo de Controlo:  $2572,11 \pm 170,36$  (MED $\pm$ SEM).

**Quadro XXIII - Avaliação de Populações Celulares (média)**

População	Controlo n=19	Grupo A n=13	Grupo B n=21	Grupo C n=20	Grupo D n=8	p
Linfócitos Totais (EP)	2572,11 $\pm$ 170,36	2402,92 $\pm$ 281,63	2059,09 $\pm$ 198,18	1885,48 $\pm$ 118,09	1467,25 $\pm$ 258,98	p=0,005
Linfócitos T (CD3) (EP)	73,09 $\pm$ 8,39	77,92 $\pm$ 6,18	73,45 $\pm$ 11,40	74,31 $\pm$ 5,01	75,28 $\pm$ 9,01	p=0,591
Linfócitos B (CD19) (EP)	10,41 $\pm$ 3,59	9,26 $\pm$ 3,46	11,61 $\pm$ 6,86	9,20 $\pm$ 3,95	9,45 $\pm$ 3,61	p=0,656
Monócitos (CD14) (EP)	5,76 $\pm$ 2,21	6,29 $\pm$ 1,86	6,20 $\pm$ 2,29	6,56 $\pm$ 3,15	6,76 $\pm$ 2,75	p=0,761

Os monócitos (CD14) apresentavam, entre os grupos considerados, variações muito ligeiras, sem qualquer significância (Quadro XXIII).

Ao diferenciarem-se as populações linfocitárias T e B, constatou-se que os grupos patológicos (Quadro XXIII) e o Grupo de Controlo revelavam percentagens muito aproximadas, sem diferenciação significativa.

Mas em relação aos fenótipos linfocitários T, considerados no Quadro XXIV, ao contrário das células CD4 e CD8, os linfócitos T- $\gamma\delta$  e T-DN, embora sem diferenças estatisticamente significativas, exibiam uma tendência evolutiva consubstanciada, em relação ao Grupo de Controlo, numa elevação crescente

do seu número nos Grupos A e B, seguida de uma queda contínua nos Grupos C e D, atingindo neste último, valores bem inferiores ao grupo normal.

**Quadro XXIV - Avaliação de Subpopulações Linfocitárias T (média)**

Subpopulação	Controlo n=19	Grupo A n=13	Grupo B n=21	Grupo C n=20	Grupo D n=8	p
Linfócitos T (CD4) (EP)	42,61 ± 6,89	45,60 ± 12,85	44,47 ± 10,48	42,17 ± 10,63	43,50 ± 11,95	p=0,842
Linfócitos T (CD8) (EP)	25,42 ± 7,61	25,14 ± 11,01	21,82 ± 7,22	26,14 ± 9,53	26,68 ± 15,08	p=0,636
Linfócitos T ( $\gamma\delta$ ) (EP)	2,91 ± 3,09	4,82 ± 3,95	4,31 ± 5,08	3,67 ± 3,28	1,81 ± 1,47	p=0,290
Linfócitos T (DN) (EP)	3,13 ± 2,71	4,18 ± 4,46	4,93 ± 5,97	3,33 ± 2,63	2,18 ± 1,68	p=0,518

**Quadro XXV-Populações Celulares com Actividade *Natural-Killer***

População	Controlo n=19	Grupo A n=13	Grupo B n=21	Grupo C n=20	Grupo D N=8	p
CD56 [EP]	15,43 ± 9,31	13,56 ± 7,17	14,91 ± 8,85	15,38 ± 6,59	15,39 ± 7,65	p=0,925
CD16CD56 [EP]	13,83 ± 8,86	12,10 ± 9,33	12,11 ± 6,25	13,57 ± 6,41	12,69 ± 6,75	p=0,841
CD3CD56 [EP]	6,87 ± 9,05	7,92 ± 4,04	6,61 ± 7,01	6,47 ± 4,04	7,21 ± 7,14	p=0,384

Quanto ao estudo de elementos celulares com capacidade *Natural-killer*, também não se detectaram diferenças estatisticamente significativas (Quadro

XXV), salientando-se, no entanto, um muito discreto aumento no Grupo D em relação ao Grupo de Controlo da actividade das células T-NK ( $6,87 \pm 9,05 / 7,21 \pm 7,14$ ;  $p=0,384$ ), e, ainda neste contexto, uma moderada diminuição das células NK (CD16CD56) ( $13,83 \pm 8,86 / 12,69 \pm 6,75$  com  $p=0,841$ ).

**QUADRO XXVI-Subpopulações Linfocitárias com Actividade Citolítica/Citotóxica (média)**

Subpopulação	Controlo n=19	Grupo A n=13	Grupo B n=21	Grupo C n=20	Grupo D n=8	p
CD8 [EP]	25,42 ± 7,61	25,14 ± 11,01	21,82 ± 7,22	26,14 ± 9,53	26,68 ± 15,08	p=0,636
	6,97 ± 4,29	7,03 ± 5,37	5,90 ± 3,59	7,34 ± 2,84	6,60 ± 3,26	
CD8CD56 [EP]	3,80 ± 4,36	4,63 ± 4,03	3,67 ± 2,24	3,83 ± 3,22	4,78 ± 4,02	p=0,851

Igualmente em relação às subpopulações com actividade citolítica/citotóxica (Quadro XXVI), a sua diferenciação ao longo dos grupos considerados não foi significativa, apresentando variações muito ligeiras, embora os linfócitos T-CD8 citotóxicos (CD3CD8CD16) aumentassem no Grupo D em relação ao Grupo de Controlo ( $3,80 \pm 4,36 / 4,78 \pm 4,02$  com  $p=0,539$ ).

Quanto à dinâmica das células com actividade reguladora (Quadro XXVII), apontava para variações muito pequenas que ocorriam sem significado estatístico, embora se tenha constatado que a expressão molécula CD25 foi sempre mais elevada no Grupo D em relação ao Grupo Controlo, ao contrário da expressão de CD127 a qual variava em sentido oposto. Salienta-se no entanto, que as células reguladoras CD4CD25CD127 apresentavam valores mais elevados no grupo mais grave, por comparação com o Grupo Controlo

(2,58±1,02/3,08±0,86 com p=0,348).

**Quadro XXVII - Subpopulações Celulares com Actividade Reguladora**

Subpopulação	Controlo n=19	Grupo A n=13	Grupo B n=21	Grupo C n=20	Grupo D n=8	p
CD25 (EP)	21,91 ± 9,64	18,07 ± 4,72	23,48 ± 11,91	24,01 ± 15,47	27,21 ± 16,96	p=0,780
CD3CD25 (EP)	18,92 ± 9,48	15,55 ± 4,24	19,99 ± 12,12	20,86 ± 15,61	24,06 ± 17,26	p=0,956
CD4CD25 (EP)	12,16 ± 5,23	11,56 ± 4,49	15,35 ± 9,95	13,97 ± 11,93	14,33 ± 8,08	p=0,771
CD127 (EP)	54,27 ± 10,99	55,42 ± 11,00	49,24 ± 12,06	49,79 ± 12,41	49,84 ± 6,52	p=0,367
CD4CD127 (EP)	37,62 ± 6,93	40,15 ± 10,15	36,23 ± 10,59	34,57 ± 12,30	35,09 ± 7,14	p=0,533
CD4CD25CD127 (EP)	2,58 ± 1,02	2,60 ± 0,91	3,35 ± 1,76	2,65 ± 1,48	3,08 ± 0,86	p=0,348

**Quadro XXVIII- Expressão da Activação dos Linfócitos B e Monócitos**

População	Controlo n=19	Grupo A n=13	Grupo B n=21	Grupo C n=20	Grupo D n=8	p
CD14CD180 (EP)	4,38 ± 1,47	4,93 ± 1,59	5,20 ± 2,12	5,62 ± 2,97	5,54 ± 2,84	p=0,723
CD19CD180 (EP)	8,16 ± 4,03	6,58 ± 3,49	7,99 ± 6,56	5,14 ± 2,68	5,99 ± 3,11	p=0,432

A expressão da molécula CD180 (Quadro XXVIII) evidenciou uma tendência evolutiva oposta quando associada às células da linha monócito-macrofágica

( $4,38 \pm 1,47 / 5,54 \pm 2,84$  com  $p=0,723$ ) ou aos linfócitos B ( $8,16 \pm 4,03 / 5,99 \pm 3,11$  com  $p=0,432$ ).

Quanto aos receptores quimiocínicos estudados o comportamento do CCR3 e do CCR5 foi muito diferenciado (Quadro XXIX).

**Quadro XXIX - Receptores Celulares (média)**

Receptor	Controlo n=19	Grupo A n=13	Grupo B n=21	Grupo C n=20	Grupo D n=8	p
CCR3 (EP)	9,23 ± 4,02	10,13 ± 4,38	9,37 ± 4,85	9,01 ± 4,52	9,06 ± 1,95	p=0,911
CCR3 CD4 (EP)	3,47 ± 0,45	4,34 ± 0,77	3,29 ± 0,39	3,11 ± 0,55	2,74 ± 0,46	p=0,514
CCR3 CD14 (EP)	8,74 ± 6,37	14,58 ± 20,42	8,82 ± 5,14	6,78 ± 4,34	6,45 ± 3,74	p=0,637
CCR5 (EP)	4,42 ± 2,43	5,44 ± 6,02	5,90 ± 3,54	4,65 ± 6,93	2,58 ± 1,75	<b>p=0,042</b> <b>B &gt; C/D</b>
CCR5 CD4 (EP)	1,39 ± 1,04	1,15 ± 3,57	1,85 ± 1,59	2,22 ± 4,24	1,25 ± 0,91	p=0,276
CCR5 CD14 (EP)	11,23 ± 6,73	12,66 ± 11,91	11,86 ± 7,61	9,53 ± 6,90	6,60 ± 4,56	p=0,182
CCR3 CCR5 (EP)	0,70 ± 0,47	1,21 ± 1,28	1,06 ± 0,80	0,82 ± 1,30	0,48 ± 0,25	<b>p=0,015</b> <b>B &gt; C/D</b>
CCR3 CCR5 CD14 (EP)	1,67 ± 1,10	3,09 ± 3,34	1,94 ± 1,63	1,52 ± 1,50	0,88 ± 0,64	p=0,200

Com efeito, enquanto o receptor CCR3, isoladamente, não apresentava variações dignas de registo ( $p=0,911$ ), o CCR5 mostrava uma queda significativa ( $p=0,042$ ) no grupo mais grave ( $4,42 \pm 2,43 / 2,58 \pm 1,75$ ), após uma ligeira elevação nos grupos menos graves. Esta evolução mantinha-se quando eram avaliados simultaneamente os dois receptores (CCR3CCR5), com variações semelhantes ao comportamento isolado do CCR5, apresentando valores de

0,70±0,47/0,48±0,25, igualmente significativos (p=0,015).

### III PARTE

## **INTERPRETAÇÃO GLOBAL E DISCUSSÃO GERAL DOS RESULTADOS**

*A imaginação é a mais científica das faculdades*

Albert Einstein



O nosso estudo incluiu para além de um conjunto de indivíduos normais que constituiu o Grupo de Controlo, sessenta e dois doentes portadores de DPOC com alterações funcionais respiratórias, de maior ou menor intensidade, reconhecidas através da realização de espirometria prévia.

Esse valor do FEV<sub>1</sub>-PBD, juntamente com os elementos recolhidos através do exame clínico-laboratorial, permitiu-nos distribuir esses doentes pelos diferentes grupos representativos do risco evolutivo de gravidade de acordo com as recentes recomendações do programa GOLD. Aliás, a análise dos múltiplos factores preditivos desse risco, com o recurso ao método de árvores de decisão (uma das principais técnicas, *Data Mining*) facilitou a identificação e diferenciação das múltiplas variáveis consideradas e utilizadas ao longo do estudo, no contexto da formulação dos diferentes grupos. Curiosamente, o *ranking* de importância desses factores preditivos coincide, precisamente, com aqueles que são aconselhados pelo estudo GOLD de 2011 (Fig. 22), destacando-se, por ordem decrescente: FEV<sub>1</sub> (100), MMRC (97), Bode index (85), Exacerbações (79), Sat (49) e PaO<sub>2</sub> (34), entre outros de menor relevância.

E não se afigura que nestas circunstâncias, a idade ou o género tenham influenciado essa distribuição, já que, em qualquer dos casos, os diversos grupos considerados apresentavam inclusão de doentes em proporções muito semelhantes, embora se tenha reconhecido que a DPOC atinge preferencialmente os grupos etários mais idosos e o sexo masculino. Nestes grupos a diminuição da homeostasia decorria a par dos mecanismos de

reparação, por múltiplos factores: genéticos, ambientais e orgânicos, conduzindo à acumulação de lesões moleculares, alterações do DNA e encurtamento dos telómeros, do que resultaria uma maior vulnerabilidade ao *stress* oxidativo [307], levando a que, embora lentamente, o pulmão do idoso se aproxime, sob o ponto de vista funcional, do da DPOC.

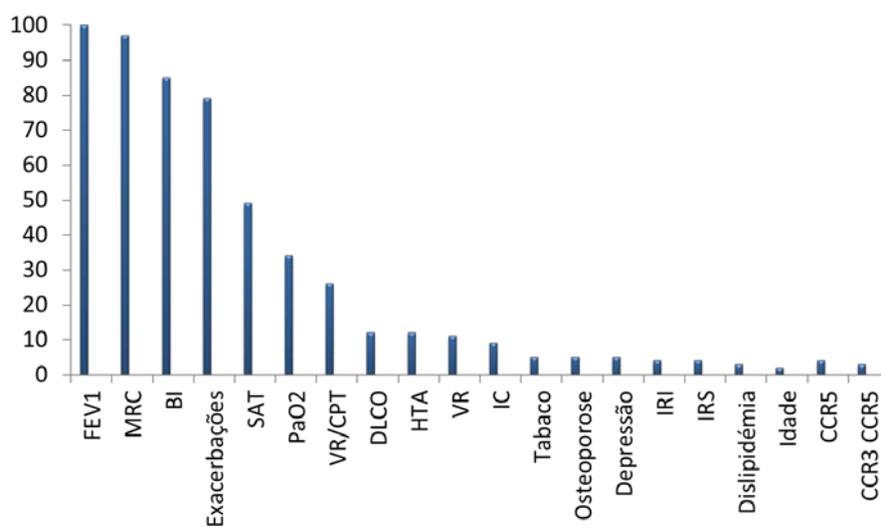


Fig.22-Importância dos Factores Preditivos da DPOC

Tanto nesta afecção como no envelhecimento, se pode assistir a uma acumulação de macrófagos e à activação de factores de transcrição nuclear, o que poderá originar uma exagerada produção de citocinas pro-inflamatórias (IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , etc.), telómeros substancialmente mais curtos e atracção de células mononucleares do sangue periférico [308,309]. Os nossos resultados mostram de acordo, aliás, com a literatura [307], que os mais idosos eram os mais atingidos, tanto em número como na gravidade da DPOC.

Entretanto dos resultados obtidos com o presente estudo, julgamos que o aspecto que merece um destaque particular, consiste na significativa queda dos linfócitos totais paralelamente à evolução da gravidade clínica (Quadro XXIII) aliás, bem patente na observação da Fig.23. Esta perturbação celular

poderá reflectir quer o aumento da apoptose a nível pulmonar, que parece encontrar-se exacerbada nas fases evoluídas da doença, quer a nível do sangue periférico, embora os mecanismos subjacentes não se encontrem totalmente esclarecidos.

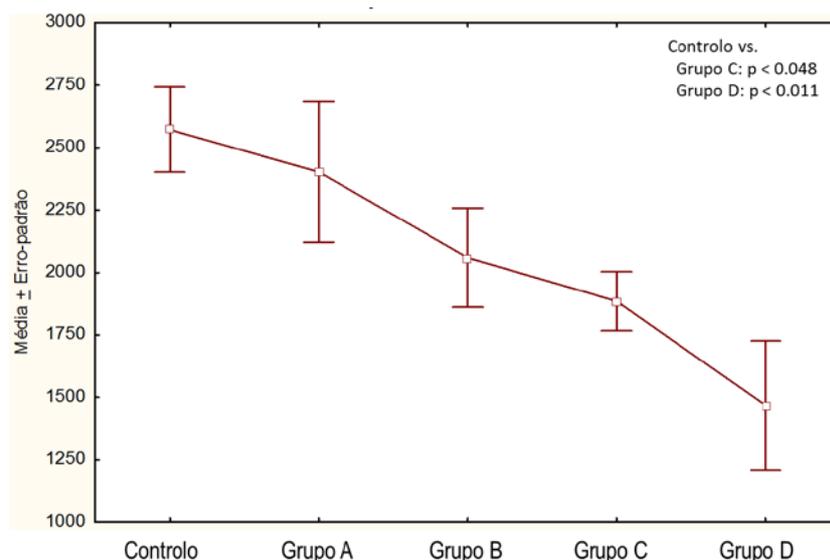


Fig.23- Evolução da Contagem de Linfócitos Totais em Função da Gravidade da DPOC

A análise do correlacionamento dos resultados do estudo celular em função do género (Quadro XXX) mostrou ligeiras e pontuais variações, das quais assinalamos apenas aquelas que continham significado estatístico: maior citotoxicidade entre os homens no Grupo A (CD8;  $p=0,032$ ), ao contrário do que ocorria no Grupo C a partir dos linfócitos T *Natural Killer* - CD3CD16 ( $p=0,032$ ), dos citotóxicos CD3CD8CD16 ( $p=0,047$ ) e onde, uma significativa ( $p=0,047$ ) elevação da activação dos linfócitos B - CD19CD180 poderá corresponder a uma acrescida capacidade de reconhecimento bacteriano através dos receptores da família TLR, ou esta expressão, depender de uma maior frequência de infecções neste Grupo; aliás, os linfócitos B estão neste Grupo C globalmente mais elevados nas mulheres ( $p=0,032$ ), as quais mostram no Grupo A, um significativo aumento ( $p=0,032$ ) das células T- $\gamma\delta$  em

relação aos homens, com largas consequências face às multifacetadas funções destes elementos celulares, nomeadamente uma eventual actividade pro-inflamatória.

**QUADRO XXX- Relação entre o Género e as Populações Linfocitárias**

Parâmetro	Grupo	Células	P <sub>Mann-Whitney</sub>	Decisão
<b>Género</b>	<b>Controlo</b>	CD25	=0,009	M>F
		CD3CD25	=0,016	M>F
		CD4CD25	=0,009	M>F
	<b>A</b>	CD8	=0,032	M>F
		DN	=0,031	M<F
		Yδ	=0,032	M<F
	<b>C</b>	CD19	=0,012	M<F
		CD3CD16	=0,032	M<F
		CD3CD8CD16	=0,047	M<F
		CD19CD180	=0,047	M<F

M (masculino); F (feminino)

Pudemos igualmente constatar que os hábitos tabágicos se encontravam associados ao desencadeamento da DPOC, embora apenas quatro indivíduos fossem fumadores activos.

No entanto cerca de 82% dos doentes eram ex-fumadores e a carga tabágica era significativamente ( $p<0,001$ ) mais elevada em relação aos controlos, com progressivo aumento paralelamente à gravidade. De facto, o consumo de tabaco encontrava-se associado à evolução da doença para os Grupos B, C e D (Quadro XXXI).

### QUADRO XXXI- Gravidade do Risco Tabágico entre os Ex-Fumadores

Risco tabágico – Ex-fumador	OR	p	IC <sub>95%</sub>
Normal para doente do Grupo A	6,93	=0,024	1,29 a 37,22
Normal para doente do Grupo A e evolução para os Grupos B, C ou D	14,16	<0,001	4,05 a 49,54
Normal e doente do Grupo A e evolução para os Grupos B, C ou D	8,41	<0,001	2,73 a 25,95

A circunstância de 82% dos doentes serem ex-fumadores, não afastava o risco deste factor ter contribuído para a instalação da DPOC, ou para se assistir a uma evolução mais grave, nestes indivíduos. Com efeito, os ex-fumadores, relativamente a quem nunca fumou, apresentavam cerca de sete vezes mais probabilidades de se tornarem doentes (Grupo A) e à volta de catorze vezes mais de evolução para um grupo superior a A; tanto aqueles que não apresentavam doença, como os que integravam o Grupo A, evoluíam para os Grupos B, C e D em cerca de oito vezes e meia.

Assim, estes resultados estariam de acordo com aqueles que parece demonstrarem o facto da evicção tabágica não resolver completamente o processo inflamatório sistémico entretanto desencadeado, o qual no fumador activo, se encontra sobejamente reconhecido, e que poderia contribuir, como veremos, para o progressivo aumento, nestes doentes, da patologia sistémica que os atingia, paralelamente à gravidade da situação clínica respiratória e da obstrução brônquica funcional, mantendo em circulação um excesso de células pro-inflamatórias.

Com efeito, estudos levados a cabo no parênquima, em biópsias brônquicas ou através de marcadores da inflamação, revelaram a persistência do processo inflamatório local nos ex-fumadores [433,434,435], facto aliás confirmado por Miller [437] ao estudar longitudinalmente DPOCs entre um e quatro anos após cessação tabágica, e demonstrar que nestes doentes se mantinha o carácter evolutivo do enfisema que os atingia.

Deste modo os resultados obtidos encontram-se de acordo com aqueles que constataram que a evicção da agressão inalatória, particularmente da representada pelo tabaco, não anula a progressão da gravidade da doença. Com efeito, ao aceitar-se que nos consumidores de tabaco e, sobretudo, nos portadores de DPOC se assiste patogénica e clinicamente à instalação de um processo inflamatório sistémico, que se afigura hoje incontroverso [1006,1007,1008,1009,1010,1011], teremos de reconhecer que estes resultados parecem estar de acordo com a gravidade evolutiva da DPOC, quando analisados em relação ao risco transmitido pelos factores inalatórios (Fig.24).

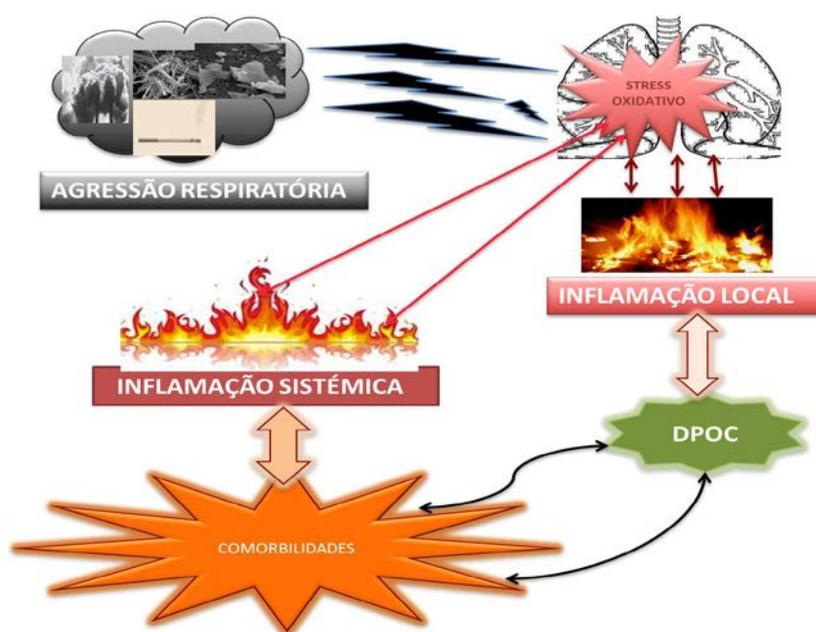


Fig. 24-Importância da Agressão Respiratória e do Stress oxidativo no processo inflamatório que conduz à DPOC e às suas Comorbilidades

De facto, embora estes mecanismos patogénicos subjacentes não se encontrem ainda totalmente esclarecidos, sabe-se como o tabaco é susceptível de provocar não só uma inflamação brônquica mas igualmente sistémica,

celular e humoral, *stress* oxidativo, alterações funcionais dos endotélios vasculares e aumento das concentrações de vários factores pró-coagulantes circulantes [1006].

Ora, o *stress* oxidativo, que é presentemente reconhecido como um importante factor predisponente da patogenia da DPOC, associado às exacerbações, diminui substancialmente a capacidade antioxidante nestes doentes por muito tempo após ter cessado a exposição tabágica activa, dada a continuidade de produção de ROS com origem nas respectivas fontes endógenas [405].

Por isso, os doentes que integravam o nosso estudo, apresentavam diferentes graus de gravidade da sua DPOC, a qual se afigurou independente do facto de serem fumadores activos ou ex-fumadores, mas sim da respectiva carga tabágica, agravada, como é largamente reconhecido, pelo aumento da idade e por pertencerem maioritariamente ao sexo masculino.

No mesmo sentido apontava a agressão respiratória representada pelo risco inalatório profissional, consideravelmente pesado em qualquer dos grupos, nomeadamente quando comparado com o dos Controlos ( $p < 0,030$ ).

De facto, quando ele existia, o risco de um indivíduo normal passar a integrar o Grupo A, isto é, contrair a doença, era de cerca de doze vezes maior, e o risco deste grupo evoluir para os Grupos B, C ou D é cerca de quatro vezes e meia superior (Quadro XXXII).

#### QUADRO XXXII-Importância do Risco Inalatório Profissional

Risco Profissional Inalatório	OR	p	IC <sub>95%</sub>
Normal para doente do Grupo A	12,22	=0,028	1,31 a 14,39
Evolução do grupo A para os Grupos B, C ou D	4,54	=0,007	1,51 a 13,53

Ao associarmos a carga tabágica, como num ex-fumador saudável, ao risco inalatório profissional, foi possível constatar que este tem uma probabilidade

perto de seis vezes maior de passar a integrar o Grupo A (passar a doente) e de cerca de 6,7 vezes mais elevada de evoluir para os Grupos B, C ou D (Quadro XXXIII e Fig. 25).

### QUADRO XXXIII- Associação dos Riscos Tabágico e Profissional Inalatório

Risco tabágico – Ex-fumador (saudável) + Risco Profissional Inalatório	OR	p	IC <sub>95%</sub>
Saudável para doente do Grupo A	6,13	=0,032	1,17 a 32,10
Do Grupo A evoluir para os Grupos B, C ou D	6,65	=0,003	1,93 a 22,89

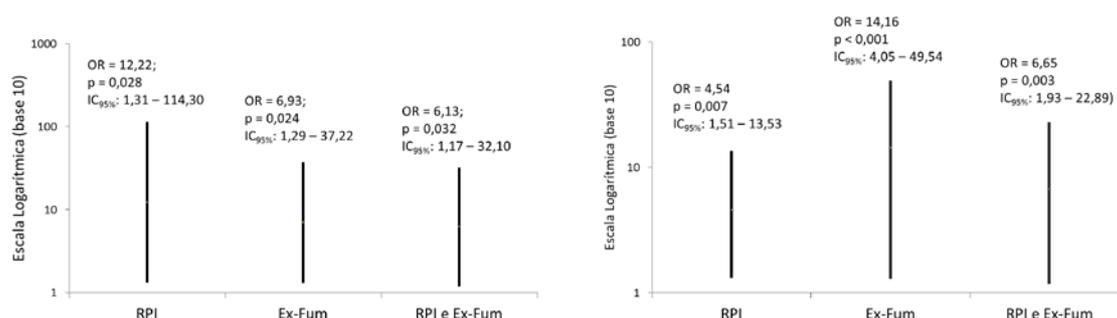


Fig. 25- Riscos Tabágico e Profissional Respiratório considerados isoladamente e em conjunto nos Ex-Fumadores

Também em relação a estes dois parâmetros, consumo tabágico e risco profissional inalatório, se constatou a existência de pequenos e pontuais relacionamentos, num ou noutro grupo, com as células e receptores estudados no sangue periférico (Quadro XXXIV).

**QUADRO XXXIV-Relacionamento dos Riscos Tabágico e Profissional Inalatório com alguns Elementos Celulares e Receptores Estudados**

Parâmetro	Grupo	Células/Receptor	p <sub>Mann-Whitney</sub>	Decisão
Risco Profissional Inalatório	Grupo B	CD14 CD14CD180	=0.004 =0.006	N<S N<S
	Grupo C	CD3CD8CD56	=0.046	N>S
	Grupo D	CD19 CD4CCR3	=0.046 =0.044	N>S N>S
Não Fumador vs. Ex-Fumador	Grupo A	CD8	=0.014	NF<Ex-F
	Grupo C	CD56CD8	=0.025	NF<Ex-F
		CD4CD25CD127	=0.025	NF>Ex-F
	Grupo D	γδ	=0.040	NF>Ex-F
		CD56	=0.046	NF>Ex-F
		CD3CD56	=0.046	NF<Ex-F
CD4CD25		=0.046	NF<Ex-F	
CD4CD25CD127	=0.046	NF<Ex-F		
CCR3CCR5	=0.039	NF<Ex-F		

N (não); S (sim); NF (Não Fumador); Ex-F (Ex-Fumador)

Salienta-se, nesta relação, que os indivíduos do Grupo B, submetidos a um acrescido risco profissional inalatório, apresentavam maior número de monócitos (CD14), bem como da sua actividade, expressa através das células CD14CD180 ( $p=0,004$  e  $p=0,006$ , respectivamente); que no Grupo D, tanto os linfócitos B (CD19) como a expressão do receptor CCR3 ligado aos linfócitos CD4 não se relacionavam, observando-se um comportamento similar no Grupo C, no que dizia respeito à actividade citotóxica representada pelos linfócitos CD3CD8CD56.

Quanto aos hábitos e carga tabágica, constatá-mos uma maior capacidade linfocitária citotóxica nos ex-fumadores dos Grupos A (CD8), C (CD56CD8) e D (CD3CD56) ( $p$  variando entre 0,014 e 0,046), e uma maior actividade reguladora das células T(CD4CD25CD127) nos não fumadores do Grupo C ( $p=0,025$ ), a qual se invertia com o agravamento da situação clínica - Grupo D ( $p=0,046$ ). Entretanto, o significativo aumento ( $p=0,039$ ) da expressão dos receptores CCR3CCR5 entre os ex-fumadores do Grupo D em relação aos não

fumadores, poderá corresponder a uma maior resposta inflamatória que se mantém entre os primeiros.

Genericamente, os doentes apresentavam um moderado, mas não significativo aumento de peso corporal, com valores muito aproximados entre os diversos grupos patológicos e entre estes, e o Grupo de Controlo (Quadro XI e Fig. 14). Assim, e embora se tivesse constatado a existência de alguns obesos dispersos, não nos parece que este factor tenha tido uma influência decisiva nomeadamente, no desencadeamento da obesidade, como patologia sistémica associada à DPOC no conjunto global estudado.

Em relação ao BODE Index, foi detectada uma forte correlacção com o desencadeamento e progressão da doença ( $p < 0,001$ ;  $r_s = 0,937$ ), particularmente no Grupo D. Não admira pois, que outros parâmetros (Fig.26) integradores do BODE Index evoluíssem em moldes semelhantes aos assinalados, por exemplo, pela queda do  $FEV_1$ -PBD ( $p < 0,001$ ;  $r_s = 0,943$ ) e do  $FEV_1/CVF$ -PBD ( $p < 0,001$   $r_s = 0,855$ ), sempre na perspectiva de que os grupos de risco acrescido, apresentavam maior BODE Index e menor  $FEV_1$ .

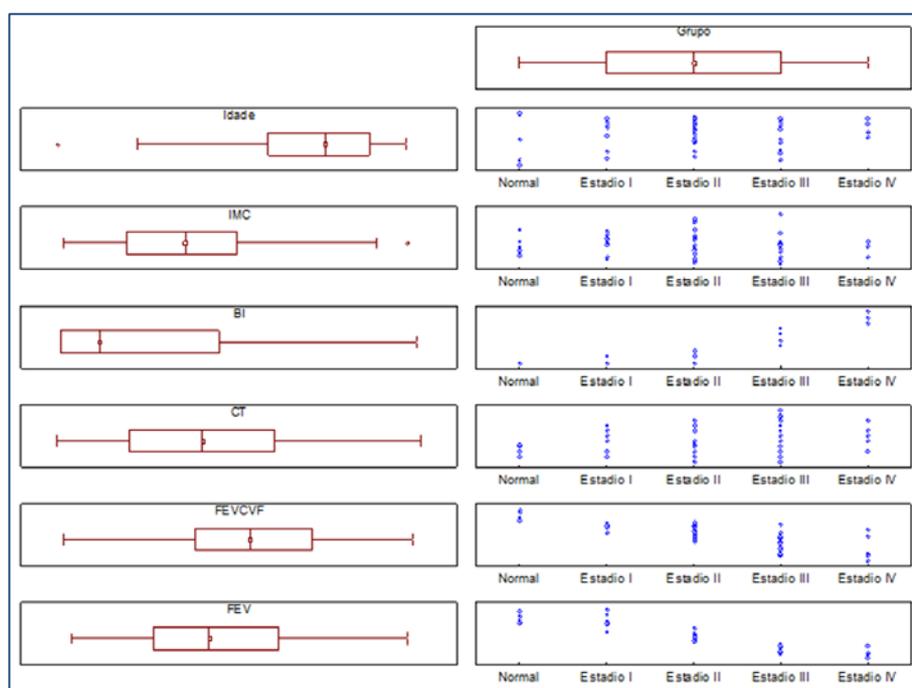


Fig. 26- Evolução de Diferentes Parâmetros correlacionando o Bode Index e o  $FEV_1$

O início e progressão da doença parecem estar ainda associadas a uma maior carga tabágica (fumadores e ex-fumadores) embora a correlação seja mais ténue ( $p=0,004$ ;  $r_s=0,374$ ) com o avançar da idade ( $p<0,013$ ;  $r_s=0,276$ ) (Fig.27).

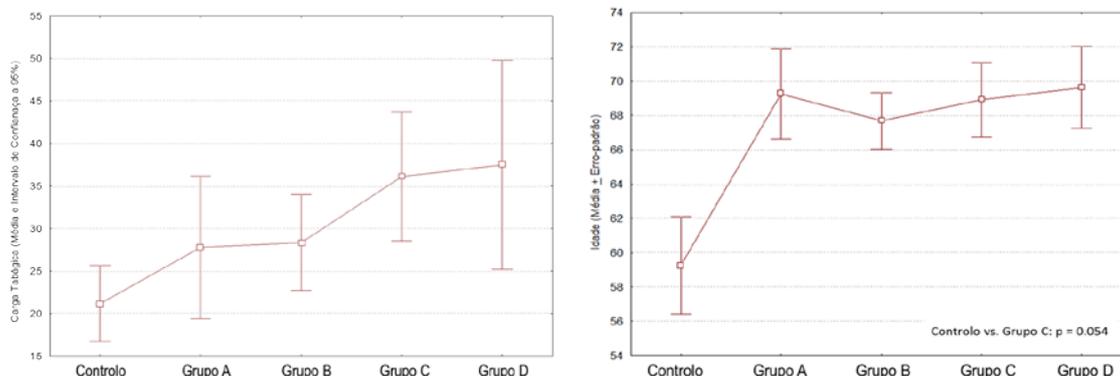


Fig.27-Relacionamento da Carga Tabágica e da Idade com a Gravidade Evolutiva da Doença

Assim, o BODE Index, como importante painel de apreciação da DPOC, é susceptível de nos fornecer uma fundamentada visão acerca da gravidade clínico-funcional que atinge este tipo de doentes, como é hoje amplamente reconhecido (Fig.28), integrando-se no conceito de que o acesso ao grau de gravidade da DPOC, apenas se afigura possível, através da incorporação de parâmetros multidimensionais na sua análise individual [1012].

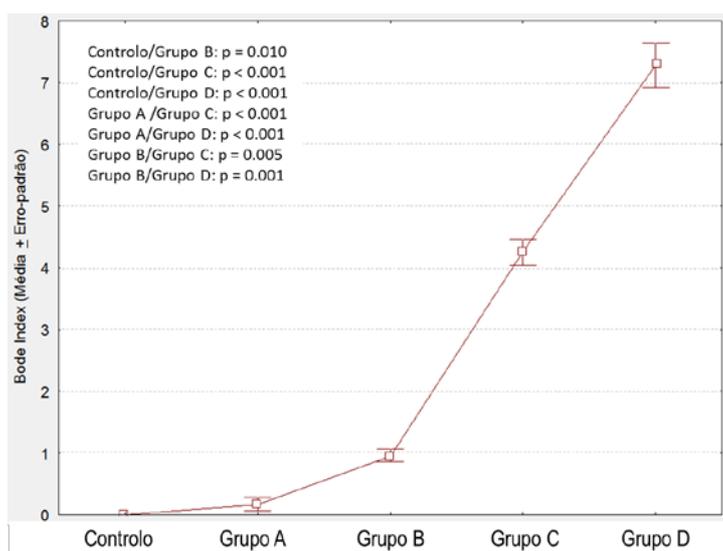


Fig. 28- Bode Index e Gravidade da DPOC

Sob o ponto de vista clínico, a dispneia atingia todos os doentes, sendo particularmente grave (graus 2 a 4) nos Grupos B e D e, como seria de aguardar, aumentava paralelamente à gravidade da DPOC; o mesmo se verificava quando se associava tosse e sobretudo a expectoração (Quadros V e VI). Os grupos menos atingidos, A e B, eram os únicos que pontualmente se relacionavam significativamente com algumas variações dos fenótipos celulares e com os receptores estudados, no sentido de uma maior actividade citotóxica no Grupo A (CD56 e CD16CD56) ( $p=0,017$ ), e de uma menor expressão dos receptores ligados aos monócitos (CCR3CD14 e CCR3CCR5CD14) nos indivíduos do Grupo B, traduzindo eventualmente uma menor actividade inflamatória ( $p=0,011$  a  $0,030$  respectivamente) (Quadro XXXV), contrariamente ao observado quando a expectoração se associava à tosse e à dispneia, em que a actividade citotóxica no Grupo A passava a estar dependente das células T- $\gamma\delta$  ( $p=0,027$ ); e no Grupo B, se assistia a uma expressão significativa dos receptores celulares ligados aos monócitos ( $p$  variando entre  $0,012$  e  $p 0,005$ ) traduzindo um eventual agravamento do processo inflamatório (Quadro XXXVI).

**QUADRO XXXV-Relação dos Sintomas (Tosse e Dispneia) com as Populações Celulares e Receptores**

Parâmetro	Grupo	Células/Receptores	$P_{\text{MannWhitney}}$	Decisão
<b>Tosse+Dispneia</b>	A	CD16CD56	=0,017	N<S
		CD56	=0,017	N<S
		CD3	=0,027	N>S
		$\gamma\delta$	=0,027	N>S
	B	CCR3	=0,007	N>S
		CCR3CD14	=0,011	N>S
		CCR3CCR5 CD14	=0,030	N>S

N (não); S (sim)

**QUADRO XXXVI-Relação dos Sintomas (Tosse, Dispneia e Expectorção) com as Populações Celulares e Receptores**

Parâmetro	Grupo	Células/Receptores	P <sub>Man-Whitney</sub>	Decisão
<b>Tosse+Dispneia + Expectorção</b>	A	CD16CD56	=0,017	N>S
		CD56	=0,017	N>S
		CD3	=0,027	N<S
		γδ	=0,027	N<S
	B	CCR3	=0,005	N<S
		CCR3 CD14	=0,012	N<S
		CCR3CCR5 CD14	=0,022	N<S
		CCR5CD14	=0,044	N<S

N (não); S (sim)

Igualmente, todos os doentes referiam exacerbações da sua DPOC, mas o número anual destes episódios aumentava progressivamente com a gravidade dos quadros clínicos (Quadro VII). E embora este parâmetro não tenha feito parte deste estudo, dado que a agudização da doença constituiu um critério de exclusão, parece-nos importante realçar a sua presença já nas fases iniciais da doença, e o impacto que potencialmente poderão ter no despiste precoce da afecção.

A exploração funcional respiratória, nas suas vertentes ventilatória e gasimétrica, mostrou-se de acordo com os resultados que se aguardavam, particularmente quanto à sua deterioração a par da evolução do risco de gravidade, associando um progressivo e significativo ( $p<0,001$ ) aumento do VR e da VR/CPT (Fig.29) à significativa ( $p<0,001$ ) diminuição da difusão alvéolo-capilar, traduzida na queda da DLCO (Fig.30), da PaO<sub>2</sub> e da Sat (Fig.31).

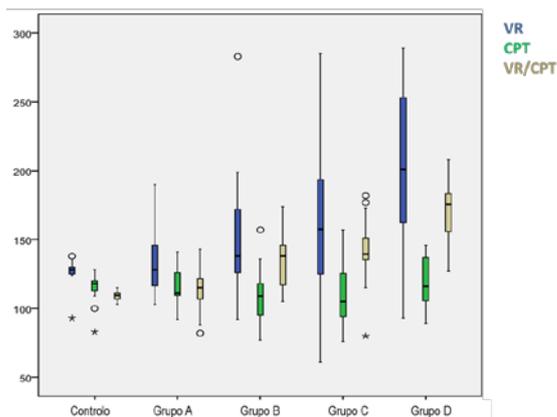


Fig.29- Evolução do VR e da VR/CPT

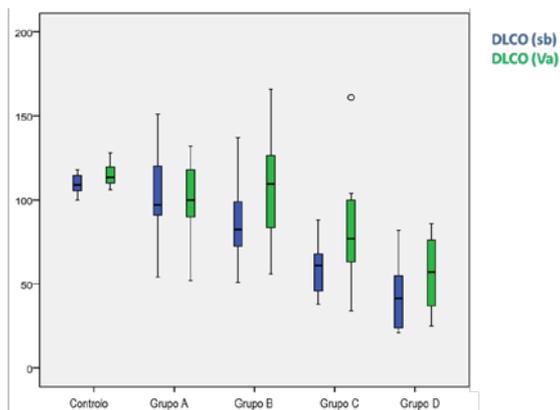


Fig.30- Evolução da DLCO

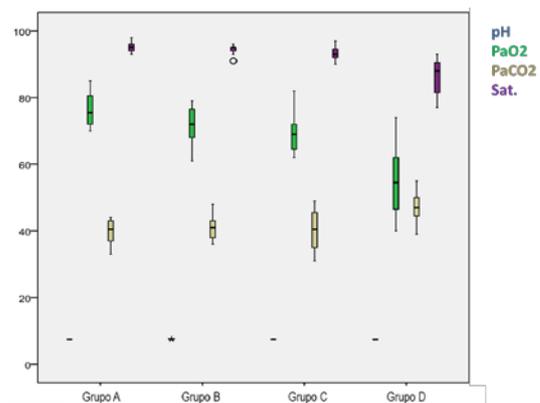


Fig.31- Evolução Gasimétrica

Este tipo de análise permitiu-nos reconhecer a expressiva gravidade do grupo D, pois nestas circunstâncias, para além dessas alterações, os doentes que o constituíam não teriam capacidade de utilizar eventuais mecanismos de compensação susceptíveis de impedir a queda na faixa patológica dos valores da PaCO<sub>2</sub> e por isso, estes se mostravam significativamente ( $p=0,013$ ) elevados em relação aos restantes grupos, sobretudo ao Grupo A.

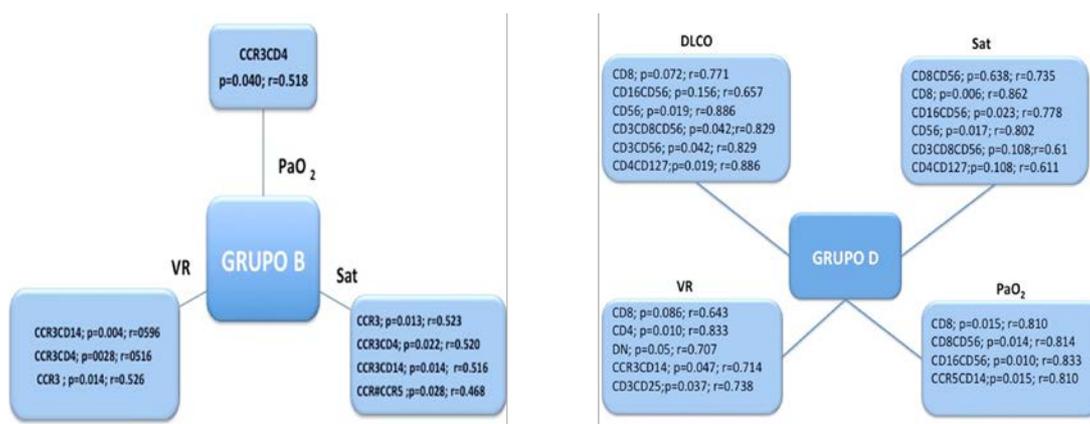


Fig.32-Relação das Populações Celulares e Receptores com alguns Parâmetros Funcionais Respiratórios nos Grupos B e D

As relações dos vários parâmetros funcionais com o espectro celular investigado (Fig.32) parecem apontar, com a evolução da afecção, para um agravamento dos parâmetros mais adstritos à área de trocas gasosas, na dependência fundamentalmente, de fenómenos de citotoxicidade, como se pode observar no Grupo D - DLCO: CD56 (p=0,019); CD3CD8CD56 (p=0,042) CD3CD56 (p=0,042). Já o VR evidenciou um relacionamento mais marcado com a actividade inflamatória dos receptores particularmente com o CCR3 quer isolado (CCR3-p=0,014) quer ligado aos monócitos (CCR3CD14-p=0,004) quer aos linfócitos CD4 (CCR3CD4-p=0,028) no Grupo B, constatando-se um comportamento semelhante no Grupo D (CCR3CD14-p=0,047).

Estas perturbações, a par da carga tabágica e do estado inflamatório sistémico ligado às eventuais dinâmicas celular e citocínica que tais distúrbios acarretam, não teriam deixado de influenciar o agravamento da situação clínica através de outros quadros patológicos associados, identificados como comorbilidades, nomeadamente os de natureza cardiovascular e, entre estes, a hipertensão arterial e a insuficiência cardíaca, os quais apresentavam uma evolução significativamente (p<0,001) paralela no âmbito dos grupos de gravidade (Quadro IX).

Aliás, fenómenos patogénicos semelhantes a nível pulmonar, particularmente decorrentes da actividade proteásica relacionada também com a atracção a essas áreas de um excesso de polimorfonucleares e de macrófagos, justificariam que as principais alterações radiológicas – enfisema centrolobular e bronquite crónica – tivessem tido uma evolução paralela e estatisticamente significativa ( $p=0,013$ ; e  $p=0,017$ , respectivamente) (Quadro XIV).

Neste contexto, assinala-se ainda que o número de doentes atingidos por enfisema panlobular, embora diminuto, enquadrava-se preferencialmente nos Grupos C e D, atestando assim a influência dos fenótipos ZZ na criação das condições locais, e eventualmente sistémicas, responsáveis pela destruição do pulmão - excesso de proteases e de *stress* oxidativo - contribuindo substancialmente para as alterações da difusão alvéolo-capilar e para a insuficiência respiratória global, que atestava a gravidade clínico-funcional dos indivíduos que integravam esses grupos.

Assinala-se o comportamento dos diversos fenótipos celulares e receptores estudados nos dois tipos de enfisema. Com efeito, do conjunto das alterações destacamos a precocidade da actividade reguladora (CD4CD25CD127) nos grupos menos atingidos pelo enfisema centrolobular (A e B), numa eventual tentativa de controlo do excesso de respostas efectoras ( $p$  entre 0,028 e 0,040) (Quadro XXXVII), mantendo-se ainda de forma expressiva e significativa, no Grupo C ( $p =0,040$ ) dos portadores de enfisema panlobular (Quadro XXXVIII). Curiosamente, não se constatou nenhuma relação significativa com a actividade citotóxica, quer na fase precoce quer mais avançada, nestes dois tipos de enfisema.

**QUADRO XXXVII- Relação do Enfisema Centrolobular com as Populações Linfocitárias**

Parâmetro	Grupo	Células/Receptores	P <sub>Mann-Whitney</sub>	Decisão
<b>Enfisema Centrolobular</b>	<b>A</b>	CD3CD25	=0,009	N<S
		CD25	=0,019	N<S
		CD4CD25CD127	=0,028	N<S
	<b>B</b>	CD3CD8CD56	=0,034	N>S
		CD4CD25CD127	=0,040	N<S
		CD25	=0,048	N<S
	<b>C</b>	CD16	=0,039	N<S

**QUADRO XXXVIII- Relação do Enfisema Panlobular com as Populações Celulares**

Parâmetro	Grupo	Células/Receptores	P <sub>Mann-Whitney</sub>	Decisão
<b>Enfisema Panlobular</b>	<b>C</b>	CD3CD25	=0,007	N<S
		CD4CD25	=0,007	N<S
		CD25	=0,007	N<S
		CD4CD25CD127	=0,013	N<S
		CD8CD56	=0,015	N>S
		CCR3CCR5	=0,037	N<S
	<b>D</b>	CCR3CCR5 CD14	=0,043	N<S
		CCR5CD14	=0,046	N<S

Em relação aos antecedentes infecciosos prévios e, face ao elevado número de doentes que relatavam terem sido atingidos por infecções respiratórias inespecíficas, cujo número crescia significativamente ( $p < 0,001$ ) (Quadro X) interrogamo-nos se esse paralelismo em relação à gravidade, terá contribuído como elemento causal da DPOC (particularmente se contraídas na infância),

ou se eram apenas consequência das alterações broncopulmonares que a partir de certo momento evolutivo, criaram as condições propícias ao desencadeamento destas complicações. Aliás, e embora em menor número, assaltam-nos as mesmas dúvidas em relação aos doentes em cujos exames radiológicos se detectaram sinais inequívocos de antiga infecção tuberculosa. Julgamos, e defendemo-lo abertamente, que têm razão os autores que hoje apontam para o enquadramento da DPOC na patologia sistémica. Com efeito, neste estudo, são várias as comorbilidades que atingiam excessiva e significativamente estes doentes, todas elas ligadas a mecanismos patogénicos com importante implicação sistémica em relação aos quais, o stress oxidativo que atinge os compartimentos subcelulares é um dos principais responsáveis e com percentagens muito elevadas nos Grupos de maior risco (C e D), isto é, naqueles em que os fenómenos inflamatórios e o *stress* oxidativo poderiam influenciar decisivamente o desencadeamento de patologia sistémica associada. Assim, pode-se dizer que, genericamente, entre os Controlos (saudáveis) e os doentes se verificou a presença significativa de comorbilidades mais frequentemente entre estes últimos:

<b>Comorbilidade</b>	<b>Significância</b>	<b>OR</b>	<b>IC<sub>95%</sub></b>
HTA	$p_{\chi^2} < 0,001$	15,00	3,85-58,37
Dislipidémia	$p_{\chi^2} < 0,001$	26,07	5,39-126,15
Insuf Cardíaca	$p_{\text{Fisher}} < 0,008$		
Inf. Resp. Inf	$p_{\text{Fisher}} < 0,002$	21,43	2,32-198,19
Inf. Resp. Sup	$p_{\chi^2} < 0,001$		

Aliás, logo no início da diferenciação dos doentes pelo risco de gravidade, viria a constatar-se que mesmo os menos atingidos (Grupo A) revelavam já um maior número de quadros patológicos associados, em relação aos indivíduos normais:

<b>Comorbilidade</b>	<b>Significância</b>	<b>OR</b>	<b>IC<sub>95%</sub></b>
HTA	$p_{\text{Fisher}}=0,006$	10,67	1,91-59,62
Dislipidemia	$p_{\text{Fisher}}=0,007$	11,90	1,81-76,53
Osteoporose	$p_{\text{Fisher}}=0,007$	18,00	1,79-181,32
Inf. Resp. Sup	$p_{\text{Fisher}}=0,016$		

Nestas circunstâncias, ao aceitar-se a importância da DPOC no desencadeamento de patologia associada, estes resultados sugerem que essa influência, nomeadamente do quadro inflamatório local e sistémico que acompanha a DPOC, se manifesta desde a sua fase mais inicial. Não admira pois que o agravamento da obstrução funcional e o eclodir de exacerbações que acompanham estes doentes, venha a conferir à DPOC características verdadeiramente sistémicas.

Entre os grupos iniciais mais próximos existiam poucas diferenças. Desta forma, aquilo que diferenciava o indivíduo do Grupo A de outro do Grupo B é que o primeiro associava mais frequente e significativamente, um acréscimo de osteoporose ( $p_{\text{Fisher}}=0,031$ ; OR=6,33; IC<sub>95%</sub>1,01-21,07); e um doente do Grupo C era atingido em relação a um do Grupo B por outras afecções, tais como: osteoporose ( $p_{\text{Fisher}}=0,044$ ; OR=4,61; IC<sub>95%</sub>1,01-21,07) e depressão ( $p_{\text{Fisher}}=0,038$ ).

Estas pequenas diferenças entre os graus de gravidade mais baixos, davam lugar, nos Grupos C e D, a praticamente à mesma e pesada associação de outras patologias. Na verdade, os Grupos C e D afastavam-se dos normais e dos Grupos A e B pelos seguintes parâmetros:

<b>Comorbilidade</b>	<b>Significância</b>	<b>OR</b>	<b>IC<sub>95%</sub></b>
Dislipidemia	$p_{\chi^2}=0,001$	6,44	1,96-21,19
Ins. Cardíaca	$p_{\chi^2}<0,001$	9,19	2,59-32,94
Osteoporose	$p_{\chi^2}=0,036$	2,96	1,05-8,29
Depressão	$p_{\text{Fisher}}=0,016$	7,29	1,36-39,06

A inflamação local e sistémica no contexto patogénico e eventual agravamento da DPOC e das suas comorbilidades, é hoje consensualmente reconhecida, e a sua relevância levou alguns autores, como Fabri [1006], a considerar que elas integravam uma verdadeira *síndrome inflamatória sistémica crónica* (Fig.33) que viria a proporcionar o actual conceito de inflamasoma. O seu diagnóstico no contexto deste trabalho poder-se-á obter desde que estejam presentes pelo menos três das seguintes situações: mais de quarenta anos de idade; carga tabágica superior a 10 UMA; sintomas e anormal função respiratória compatível com DPOC; insuficiência cardíaca crónica; síndrome metabólica; elevação da PCR.

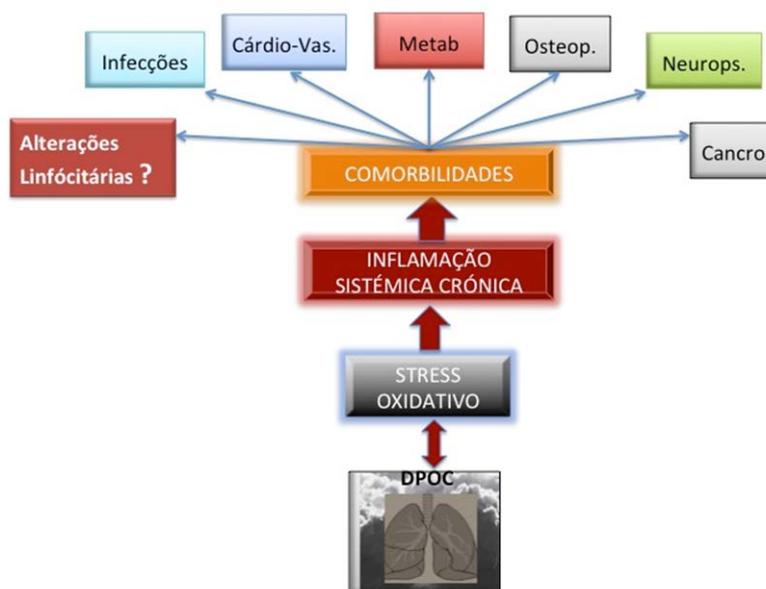


Fig.33-Principais Comorbilidades Susceptíveis de acompanhar a DPOC

Ora, como pudemos constatar, ao conjunto de doentes que estudámos correspondia a grande maioria destas situações, e a importância das comorbilidades que os atingia aumentava paralela e significativamente ao agravamento da situação clínica, sobretudo nos Grupos de maior risco (C e D), embora logo na diferenciação inicial dos doentes pelo risco de gravidade, se tenha constatado que mesmo os indivíduos menos atingidos (Grupo A)

revelavam já um maior e significativo número de quadros patológicos associados, em relação ao Grupo de Controlo.

Estes resultados parecem equivaler aos que alguns autores encontraram ao efectuarem nestas situações o estudo através de biomarcadores inflamatórios no sangue periférico [1007,1008,1009,1010,1011,1013]. Assim, por exemplo, Agusti [1008] pôde verificar que através da utilização de seis biomarcadores, 16% dos doentes apresentavam um padrão de inflamação sistémica persistente com significativo aumento da mortalidade e da frequência do número de exacerbações anuais por comparação com os não inflamados.

Quanto à análise da relação entre algumas das comorbilidades e as populações celulares (Quadro XXXIX) destacam-se aquelas que revelaram interesse estatisticamente significativo.

**QUADRO XXXIX-Relação entre Comorbilidades e Populações Celulares**

Comorbilidade	Grupo	Pop. Celulares	P <sub>Mann-Whitney</sub>	Decisão
<b>HTA</b>	<b>B</b>	CD19CD180	=0,045	S>N
<b>Dislipidémia</b>	<b>C</b>	CD8CD56	=0,016	S>N
<b>Insuficiência Cardíaca</b>	<b>C</b>	CD3CD56	=0,039	S>N
		CD3CD8CD56	=0,028	S>N
	<b>D</b>	CD4CD25CD127	=0,037	S>N
<b>Osteoporose</b>	<b>C</b>	CD19	=0,023	S>N
	<b>D</b>	CD4	=0,037	S>N
		CD4CD25CD127	=0,037	S>N
<b>Infecção Resp. Superior</b>	<b>A</b>	CD14CD180	=0,041	S>N
	<b>B</b>	CD19CD180	=0,044	S>N
	<b>C</b>	CD19	=0,042	S>N

Assim:

- Maior actividade TLR (CD19CD180) dos linfócitos B nos hipertensos do grupo B ( $p=0,045$ ).

- Uma acrescida actividade citotóxica (CD8CD56) nos dislipidémicos do grupo C ( $p=0,016$ ).
- Um aumento da actividade citotóxica (linfócitos T-NK e CD3CD8CD56) ( $p$  entre 0,028 e 0,039) nos insuficientes cardíacos dos Grupos B e D e da actividade reguladora (CD4CD25CD127) neste último conjunto ( $p=0,037$ ).
- Um maior número de linfócitos B (CD19) ( $p=0,023$ ) nos osteoporóticos do Grupo C, acompanhado no Grupo D pelo aumento dos linfócitos T-CD4 ( $p=0,037$ ) e da actividade das células T reguladoras (CD4CD25CD127) ( $p=0,037$ ).
- Uma maior actividade dos monócitos activados ( $p=0,041$ ) no Grupo A e dos linfócitos B activados ( $p=0,044$ ) nos Grupo B e C, em qualquer dos casos evidenciando uma acrescida capacidade de reconhecimento bacteriano nos portadores de infecção respiratória das vias aéreas superiores.

Nas circunstâncias acima descritas, esta análise, que procurou detectar o eventual relacionamento dos marcadores imunológicos utilizados neste estudo com as diferentes comorbilidades, só muito pontualmente se revelou positiva e, mesmo assim, sem relevante interesse prático na sua caracterização.

Pelo contrário, a utilização desses marcadores como preditivos da presença de doença, ou da sua evolução ao longo dos diferentes grupos considerados, afigurou-se altamente compensadora, dando assim expressão concreta a um dos objectivos deste projecto de investigação. Com efeito, os marcadores celulares CD3 e T- $\gamma\delta$  podem ser utilizados para diferenciar os indivíduos normais dos doentes:

- $CD3 \leq 74,2$  – o indivíduo é saudável (sensibilidade = 91,67% e valor predictivo negativo = 92,3%).
- $T-\gamma\delta \leq 3,6$  – o indivíduo é saudável em 76,2% dos casos.

- $T-\gamma\delta > 3,6$  – 84,21% são doentes e, destes 70% integravam o Grupo A.
- Com estes critérios, tendo aplicado uma regressão logística, constatou-se que o facto de um indivíduo apresentar um valor de  $CD3 > 74,2$  representa, por si só, um risco 19 vezes mais elevado ( $OR=18,86$ ;  $p=0,010$ ) de integrar o Grupo A (Fig.34).
- Considerando-se o caso de um indivíduo revelar a presença de  $CD3 > 74,2$  e, simultaneamente,  $T-\gamma\delta > 3,6$ , o risco de ele corresponder a um doente do Grupo A é sete vezes e meia superior ( $OR=7,47$ ;  $p=0,019$ ), calculando-se que possa variar entre 1,4 e 40,25, com 95% de índice de confiança (Fig.34).

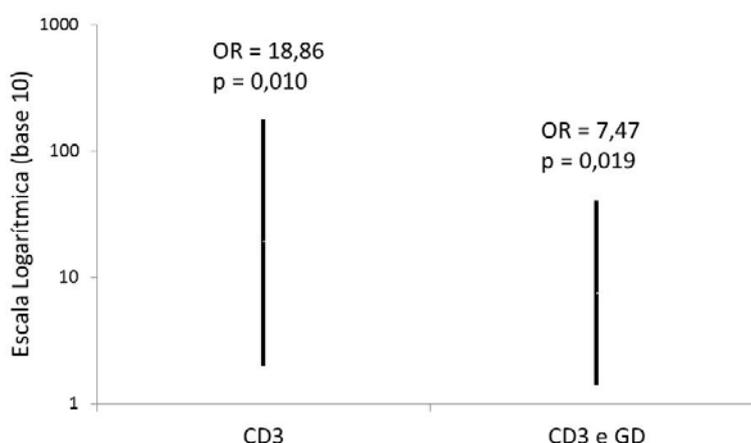


Fig.34-Importância das Células CD3 e  $T-\gamma\delta$  como Predictivos de Doença

A utilização isolada ou simultânea dos linfócitos CD8 citotóxicos ( $CD8CD56$ ) e dos receptores ( $CCR5$  e  $CCR3CCR5$ ), permite avaliar o agravamento da situação clínica, com a passagem de um doente do Grupo B para o Grupo C, com uma sensibilidade igual ao valor preditivo negativo que é de 100%, isto é, todas as situações com  $CD8CD56 \leq 3,7$  correspondiam a doentes do Grupo C. O receptor  $CCR5$  mostrou maior sensibilidade do que especificidade (melhor para afastar a presença de doença) (Fig.35-A) e o  $CCR3CCR5$  maior

especificidade do que sensibilidade (melhor para confirmar a presença da afecção) (Fig.35-B)

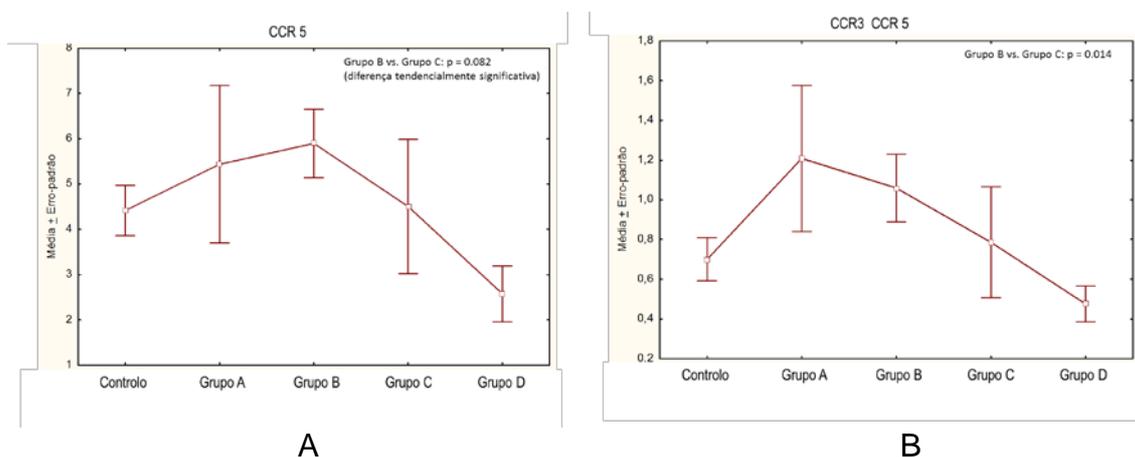


Fig. 35 -Evolução dos Receptores Celulares CCR5 (A) e CCR3CCR5 (B) em Função da Gravidade da DPOC

Assim:

- $CCR5 \leq 0,9$  é preditor da progressão da doença do Grupo B para o Grupo C ( $p=0,006$ ;  $OR=8,5$ ;  $IC_{95\%}$ : 1,84 a 39,23) com uma acuidade de 79,1%.
- A presença simultânea de valores de  $CCR3CCR5 \leq 0,4$  e de  $CD8CD56 > 3,7$  aumenta o risco de passagem para o Grupo C, de cerca de 16 vezes mais ( $p<0,001$ ;  $OR=15,83$ ;  $IC_{95\%}$ : 3,39 a 74,03).
- Com  $CCR5 \leq 0,9$ ;  $CCR3CCR5 \leq 0,4$  e  $CD8CD56 > 3,7$  o risco de progressão da doença do Grupo B para o Grupo C é 25 vezes superior ( $p<0,001$ ;  $OR=25,0$ ;  $IC_{95\%}$ : 4,41 a 141,68) (Fig.36).

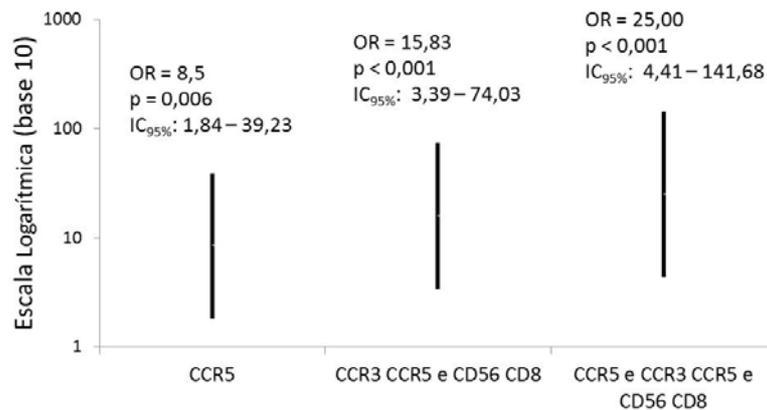


Fig.36-Células e Receptores na evolução da gravidade da DPOC

Verifica-se, assim, que a utilização simultânea destes marcadores detecta mais eficazmente o risco de progressão da gravidade da DPOC, do que quando considerados isoladamente.

Com a utilização de quatro marcadores - CCR5, CCR3CCR5, CCR5CD14 e CCR3CCR5CD14 - é possível prever um importante agravamento da situação (Grupos C ou D) a partir de indivíduos normais, ou de doentes nos Grupos A e/ou B (Quadro XL).

#### QUADRO XL-Marcadores e Gravidade da DPOC

Marcador isolado ou em associação	p	OR	IC <sub>95%</sub>	Acuidade
CCR3CCR5 ≤3,4	0,001	6,38	2,5 a 18,68	73,2%
CCR5CD14 ≤6,8 + CCR3CCR5CD14≤1,3	0,001	6,13	2,08 a 18,03	73,2%
CCR3CCR5≤3.4 + CCR5CD14≤6,8 + CCR3CCR5CD14≤1,3	0,002	7,49	2,11 a 26,54	73,2%

Mesmo quando se consideram os dois receptores associados aos monócitos, (CCR3CCR5CD14) cujo valor seja superior ou igual a 1,3 e os restantes

apresentem valores normais, apesar do valor de p ser de 0,071, revelando apenas uma tendência, o risco de progressão para os Grupos C ou D aumenta 3,37 vezes (Fig.37).

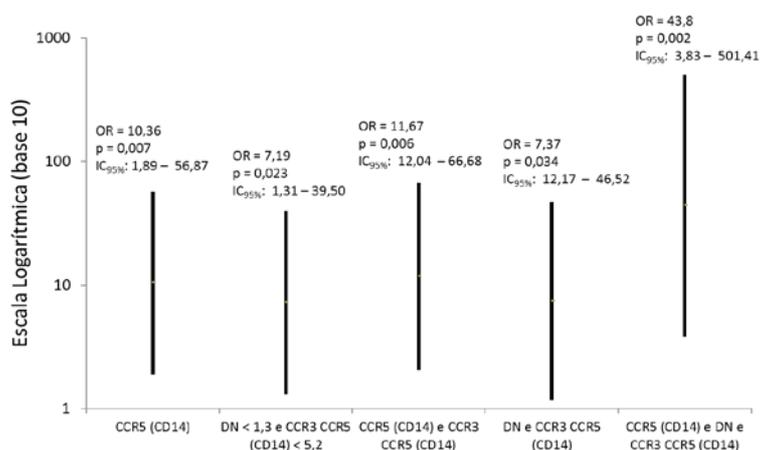


Fig.37-Marcadores e Progressão da Gravidade da DPOC

Os marcadores apresentados no Quadro XLI e Fig. 38 são predictivos da progressão, tanto a partir da normalidade como de qualquer outro conjunto, para o grupo D e, portanto, do agravamento máximo da situação clínica.

#### QUADRO XLI-Marcadores Predictivos da Progressão da DPOC

Marcador isolado ou em associação	p	OR	IC95%	Acuidade
CCR5CD14≤5,2	0,007	10,36	1,89 a 56,87	90,2%
DN≤1,3	0,023	7,19	1,31 a 39,50	90,2%
CCR5CD14≤5,2 + CCR3CCR5CD14≤1,0 + CCR3CCR5CD14≤1,3	0,006	11,67	2,04 a 66,68	90,2%
DN≤1 + CCR3CCR5CD14≤1,0	0,034	7,37	1,17 a 46,52	90,2%
CCR5CD14≤5,2 + DN≤1,3 + CCR3CCR5CD14≤1,0	0,002	43,8	3,83 a 50,41	92,7%

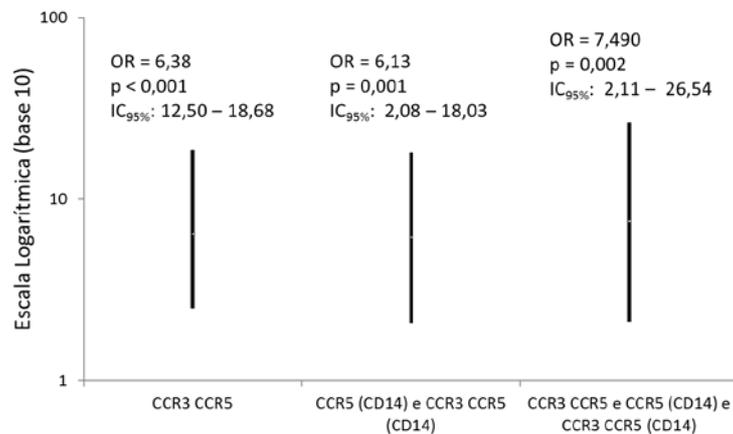


Fig.38-Receptores Celulares e Progressão da Doença

Aliás, já a simples análise dos resultados nos revelava que os valores dos receptores, tanto do CCR5 como do conjunto CCR3CCR5, dos doentes correspondentes ao Grupo B, eram significativamente superiores aos dos Grupos C e D ( $p=0,042$  e  $p=0,015$ , respectivamente), atestando assim o interesse da sua utilização na confirmação da DPOC e do acompanhamento da sua gravidade ao longo da evolução clínica.

A heterogeneidade clínica da DPOC, nomeadamente a sua associação a tão alargado painel de comorbilidades (Fig.33) dependentes de um mecanismo central representado pelo grau e pelo tipo de inflamação sistémica, a qual só parece constante em cerca de 30% dos casos, e em 50% das situações evolui intermitentemente [1007], levou nos últimos anos a definirem-se neste contexto, diferentes fenótipos clínicos que permitiriam caracterizar as diversas formas desta afecção e a sua classificação em subgrupos [1014], os quais, porventura na dependência de factores genéticos [1015], associados a tão numerosos factores de risco, onde se incluem os ambientais [1014,1016], melhorariam substancialmente a abordagem prognóstica desta afecção individualmente considerada [1017,1018,1019].

Deste modo, tem vindo a ser aconselhada, entre outros, a diferenciação destes doentes em inflamados sistémicos e não inflamados [1008], em exacerbadores frequentes e não frequentes [1018], em declinadores rápidos ou lentos na

dependência de uma queda anormal acelerada, ou lenta, da função respiratória [1016].

Sem que haja consenso no número e definição dos diferentes fenótipos, Miravittles [1014], ao eleger a importância de diferentes factores como as exacerbações, considera ser possível efectuar o seguinte agrupamento destes doentes:

<b>Exacerbadores pouco frequentes</b>	Com bronquite crónica e enfisema, exacerbações/ano <2
<b>Exacerbadores frequentes</b>	Com predomínio de enfisema, exacerbações/ano >2
<b>Overlap DPOC/Asma</b>	Doentes asmáticos que fumam, com sinais de menor reversibilidade da sua obstrução brônquica, portadores de rinite alérgica, hiperreactividade brônquica, pieira e elevação da IgE sérica [1021,1021]

A percentagem deste último fenótipo misto, é desconhecida mas calcula-se que ronde os 13% atingindo, segundo Soriano [1022], 23% nos indivíduos com idades entre os 50 e 59 anos e 52% nos DPOCs entre os 70 e 79 anos de idade.

Esta proposta classificativa consta aliás das actuais *Spanish COPD Guidelines* (Ges EPOC).

Ainda recentemente Bárbara C e al. puderam, como nós, constatar o pesado número de comorbilidades nas situações mais graves de DPOC [1023].

As perturbações que tivemos oportunidade de observar na evolução das populações linfocitárias estudadas e dos seus receptores CCR5 e CCR3CCR5, parecem directa e significativamente relacionadas com a DPOC, podendo constituir em alguns casos um factor preditivo de doença e da sua gravidade.

Serão elas apenas mais um biomarcador sistémico a juntar a tantos outros já identificados e descritos ultimamente [1007,1008,1009,1011,1013]? Aliás, já se suspeitava que o *stress* oxidativo induzido pelo tabaco influenciava uma prematura senescência dos linfócitos em fumadores [759].

Em qualquer dos casos, embora se desconheçam os mecanismos íntimos subjacentes a estes desvios, julgamos poder admitir que os doentes cuja DPOC se vinha a agravar progressivamente, são ao mesmo tempo atingidos por uma diminuição das suas defesas imunitárias, sendo parcialmente afectado o seu perfil Th<sub>1</sub>, como parecia atestar a evolução do receptor CCR3CCR5.

Em tais circunstâncias, as alterações detectadas tanto nas populações linfocitárias como nos receptores no sangue periférico dos doentes que tivemos oportunidade de estudar, poderão configurar a descrição de mais um de mais um fenótipo clínico e contribuir para uma abordagem mais personalizada desta situação, reforçando assim, uma adequada capacidade de intervenção preventiva e terapêutica (Fig.39).

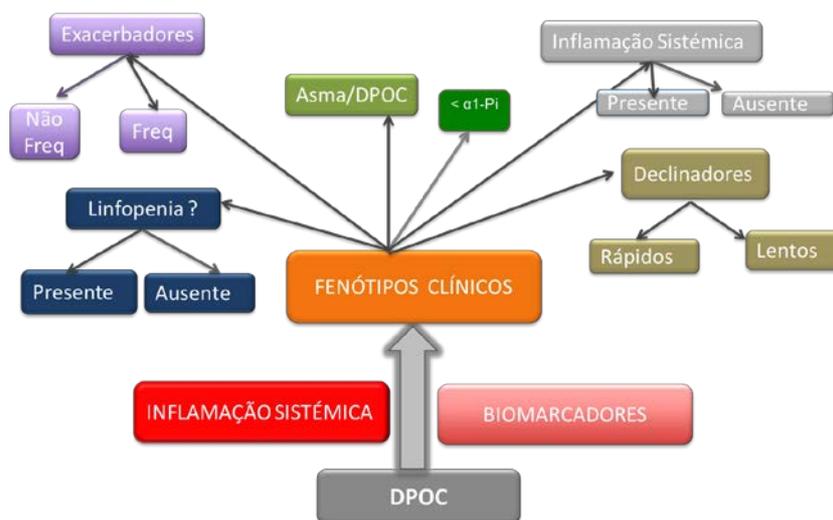


Fig.39-Fenótipos Clínicos ligados à DPOC, incluindo um novo Perfil dependente de eventuais ligações linfocitárias, assinalado a azul

No entanto, apesar dos resultados obtidos indiciarem fortemente a existência

de mais este fenótipo, não devemos afastar a hipótese de que as alterações detectadas neste trabalho, possam ser uma consequência da diminuição do número de células e dos seus receptores no sangue circulante, decorrente de uma atracção citocínica e quimioquímica aos diversos órgãos e locais atingidos no âmbito do processo inflamatório sistémico que atinge estes doentes, o qual se encontra dependente do *stress* oxidativo cronicamente instalado [1011]. Assim, só o aprofundamento desta via de investigação parece susceptível de esclarecer as dúvidas que este estudo nos suscitou, face aos dos resultados obtidos.

## IV PARTE

### **CONCLUSÕES FINAIS E RESUMO**



## CONCLUSÕES

Da apreciação deste projecto de investigação julgamos ser possível extrair as seguintes conclusões:

- A gravidade da DPOC encontra-se intimamente dependente do tipo e quantidade dos factores de risco subjacentes.
- O *stress* oxidativo responsável pela inflamação local e sistémica típica da DPOC está na base deste processo inflamatório e não cessa com a evicção tabágica.
- Para o agravamento do *stress* oxidativo contribuem igualmente as exacerbações da doença desencadeadas ao longo da sua evolução.
- As recentes descobertas no âmbito da fisiopatologia e da patogenia desta afecção apontam para o interesse de se definirem fenótipos clínicos no contexto da sua heterogeneidade.
- O conhecimento dos fenótipos clínicos, de que são já exemplo os DPOC portadores ou não de inflamação sistémica, os declinadores funcionais rápidos ou lentos, os exacerbadores pouco ou muito frequentes, os

deficitários em  $\alpha_1$ -Pi e os *overlap* DPOC/Asma, entre outros, constituem actualmente o principal alvo sobre o qual incide a investigação que permitirá a compreensão futura desta patologia.

- As variações detectadas em algumas populações celulares e o seu relacionamento com os diferentes parâmetros estudados - clínicos, laboratoriais e funcionais respiratórios - poderão contribuir para uma melhor compreensão dos fenómenos patogénicos, locais e sistémicos, que ocorrem na DPOC, nomeadamente quanto ao seu grau de gravidade e às comorbilidades que a acompanham.
- Nos indivíduos portadores de DPOC, o estudo das populações e subpopulações linfocitárias no sangue periférico afigura-se uma medida de particular interesse preditivo no diagnóstico da afecção e, sobretudo, na avaliação do grau de risco de gravidade da situação clínica.
- Os receptores CCR5 e CCR3CCR5 constituem excelentes marcadores da detecção e evolução da DPOC. A queda progressiva dos valores de linfócitos circulantes e dos receptores CCR5 e CCR3CCR5 poderá traduzir uma diminuição das defesas imunitárias na DPOC, estando de acordo com o elevado número de infecções respiratórias que habitualmente a acompanham.
- Estas alterações parecem sugerir a identificação de mais um fenótipo clínico, embora não se possa afastar a circunstância de elas se encontrarem ligadas a uma dinâmica do processo inflamatório sistémico que frequentemente atinge estes doentes.

## RESUMO

Esta dissertação foi dividida em três partes. Na primeira efectuámos, em revisão, uma actualização sobre as novas perspectivas da fisiopatologia e da patogenia no enquadramento sistémico da DPOC. A segunda parte foi dedicada à investigação realizada em 81 indivíduos. Na terceira tentámos realizar uma análise global dos resultados com particular incidência na sua interpretação patogénica.

### **PRIMEIRA PARTE**

1-Iniciámos a primeira parte deste trabalho com uma sucinta introdução geral do tema e uma referência aos múltiplos trabalhos desenvolvidos ao longo das últimas décadas consubstanciados na revisão GOLD.

2-O segundo capítulo foi dedicado a uma actualização epidemiológica da DPOC, nomeadamente em relação aos índices de prevalência e incidência, tanto mundiais como do nosso país, às variações em função do género e da idade, salientando-se as diminutas taxas de diagnóstico e tratamento.

3-No terceiro capítulo abordámos diversos factores de risco da DPOC, com excepção do tabaco, o qual foi tratado num capítulo próprio face à sua relevância neste contexto. Assim, foi analisada a importância da poluição ambiental e da doméstica, a exposição ocupacional, o envolvimento genético,

as infecções respiratórias e os factores socio-económicos. Uma referência especial foi dedicada à DPOC em não fumadores.

4-O objectivo do quarto capítulo incidiu sobre a contribuição do envelhecimento para as manifestações sistémicas da DPOC.

Iniciado pela análise bibliográfica das variações estatísticas que se têm dirigido, ao longo das últimas décadas, ao envelhecimento das populações, abordou seguidamente a sua relação com os respectivos factores desencadeantes, com as moléculas anti-envelhecimento, com o *stress* oxidativo e a inflamação e, por último, com as alterações funcionais respiratórias e imunológicas.

5-Em relação ao quinto capítulo, este dedicou-se à análise da influência da exposição crónica ao tabaco no contexto da inflamação sistémica.

6-O capítulo sexto segue, naturalmente, o conteúdo do anterior já que ele foi dedicado a abordar a DPOC e o *stress* oxidativo em múltiplos aspectos, entre os quais se destaca: a abordagem bioquímica da oxidação particularmente no âmbito da formação de radicais oxidantes e peroxidação lipídica, no relacionamento entre os oxidantes e as células, e os oxidantes e a inflamação na DPOC; na actividade antioxidante e seus agentes, alguns aspectos da apoptose; na relação entre os oxidantes e a sensibilidade do receptor dos glucocorticóides; e, finalmente, o *stress* oxidativo face ao balanço proteases/antiproteases.

7-No sétimo capítulo abordaram-se as alterações estruturais e inflamatórias locais e sistémicas.

8-Por último, o capítulo oitavo debruçou-se sobre o envolvimento celular na inflamação local e sistémica, quer na vertente inata quer na adquirida: monócitos/macrófagos, eosinófilos e mastócitos, células dendríticas, *natural killer*, T-*natural killer*, T- $\gamma\delta$ , e linfócitos.

## **SEGUNDA PARTE**

1-Abrimos a segunda parte desta dissertação efectuando uma curta e genérica

exposição sobre os objectivos da presente investigação: detecção no sangue periférico de eventuais alterações das suas populações linfocitárias, nomeadamente o seu relacionamento com a detecção da DPOC e com o risco individual da sua gravidade no âmbito do rebate sistémico desta afecção.

2-O segundo capítulo foi dedicado ao material e métodos.

a)-A Amostra Médica era constituída por 69 doentes portadores de DPOC em fase estável e 19 indivíduos normais (Grupo de Controlo).

A distribuição dos doentes foi efectuada pelos quatro grupos de gravidade progressivamente crescente da Classificação GOLD (2013): 13 no Grupo A, 21 no Grupo B, 20 no Grupo C e 8 no Grupo D. Sessenta e seis (81,7%) eram do género masculino e 15 (18,29%) do feminino.

A idade global variava entre os 33 e os 81 anos, com uma relativa homogeneidade entre os grupos considerados.

A maioria era ex-fumadora e apenas 4 indivíduos eram fumadores activos; entre estes e os ex-fumadores a carga tabágica total oscilava entre os 10 e 60 UMA.

b)-A metodologia utilizada neste estudo compreendia os seguintes parâmetros: abordagem clínico-laboratorial na qual se incluía a eventual existência de comorbilidades e complementarmente, o estudo da  $\alpha_1$ .Pi, a pesquisa de reacções alérgicas, e a realização de exames electrocardiográficos e radiológicos.

O estudo da função respiratória abarcava globalmente a difusão alvéolo-capilar e a gasimetria arterial; a primeira e a segunda foram realizadas por pletismografia e a gasimetria por leitura da amostra sanguínea recolhida num aparelho ABL-5 (Radiometer).

A tipagem linfocitária foi efectuada por citometria de fluxo após incubação do sangue periférico com os anticorpos monoclonais pretendidos e leitura através do *software* de aquisição de 10.000 eventos.

c)-A abordagem estatística dos resultados utilizou os testes Qui-quadrado, exacto de Fisher, Kolmogorov-Sminov, Kruskal-Wallis e Mann-Whitney. A análise foi efectuada através do SPSS, versão 19, com avaliação a um

nível de significância de 0,05.

3-Do numeroso conjunto de dados obtidos permitimo-nos destacar os seguintes, pela relevância assumida face aos objectivos delineados:

Do **estudo clínico-laboratorial** sobressaía, quanto às queixas respiratórias, a presença de dispneia que atingia todos os grupos, sendo particularmente grave nos Grupos B e D, onde afectava todos os indivíduos. A dispneia e a tosse consideradas em conjunto afectava em percentagens sobreponíveis os doentes dos Grupos A, B e C, e sempre que aos anteriores sintomas se associava a expectoração a percentagem praticamente duplicava.

Todos os doentes referiam **exacerbações** com uma tendência para o seu aumento a par do agravamento da doença. O **risco profissional inalatório** ultrapassava sempre o número de doentes, dado o facto de muitos destes indivíduos exercerem mais que uma actividade ocupacional. Apenas uma percentagem mínima, em cada grupo, era portadora de uma deficiência em  $\alpha_1$ -**Pi**, sendo curioso que aos grupos mais avançados (C e D) correspondiam os níveis séricos mais baixos.

Este estudo viria a revelar a presença de um considerável número de outros **processos patológicos** associados à DPOC com eventual relevância no enquadramento sistémico desta afecção, e particular destaque para as infecções respiratórias superior e inferiores, hipertensão arterial, insuficiência cardíaca, *diabetes mellitus*, dislipidémia, excesso de peso, osteoporose, depressão e neoplasias, habitualmente com um progressivo e significativo agravamento face à importância evolutiva da DPOC.

Do **estudo radiológico** salientam-se, entre as variadas e numerosas alterações, os dois tipos de enfisema - centro e panlobulares - e as lesões que integram o padrão de bronquite crónica, assistindo-se ao longo da evolução da doença a uma variação em sentido inverso entre o enfisema e a bronquite crónica, à medida que se agravava a situação clínica.

Do **estudo funcional respiratório** destaca-se a progressiva e significativa queda do FEV<sub>1</sub>-PBD ao longo dos diferentes grupos considerados bem como da relação FEV<sub>1</sub>/FVC-PBD. Também a par da marcha do risco de gravidade se

pôde reconhecer um progressivo e significativo aumento do VR e da relação VR/CPT.

A diminuição da DLCO, da PaO<sub>2</sub> e da Sat traduzia uma significativa queda da difusão alvéolo-capilar.

Do **estudo das populações linfocitárias no sangue periférico** sobressaía, entre os numerosos exames efectuados, de uma forma muito relevante e significativa, a **progressiva diminuição do número de linfócitos totais**, a par do agravamento da doença, com um valor no grupo de maior risco a atingir praticamente metade do que foi determinado no Grupo de Controlo. Quanto aos receptores estudados, o CCR5 e o CCR3CCR5 sofriam uma **significativa diminuição** da sua expressão no grupo de maior gravidade.

4-Numa apreciação global dos resultados desta investigação julgamos que as perturbações observadas nas populações linfocitárias e nos seus receptores CCR5 e CCR3CCR5 parecem directamente relacionadas com os quadros de DPOC estudados, podendo constituir, em alguns casos, um **factor preditivo** de doença e do seu **grau de gravidade**.

Em tais circunstâncias, as alterações relatadas poderão configurar a descrição de mais um **fenótipo clínico**, permitindo uma abordagem mais personalizada da doença e uma mais adequada intervenção preventiva e terapêutica.

Mas teremos de admitir a hipótese destas alterações poderem constituir um epifenómeno resultante de uma diminuição do número de células circulantes decorrente da atracção citocínica e quimioquímica aos diversos órgãos e locais atingidos pelo processo inflamatório sistémico crónico com origem no *stress* oxidativo e/ ou nas alterações por ele induzidas.

## **ABSTRACT**

This dissertation has been divided into three parts. The first part is a review of the new physiopathology and pathogenic perspectives of the systemic aspects of COPD. The second part contains our own research project carried out with 81 individuals. The third part looks at a global analysis of the results with a particular emphasis on their pathogenic interpretation.

### **FIRST PART**

1-We started with a brief general introduction about COPD with particular reference to the extensive work undertaken in recent decades and embodied in GOLD guidelines.

2-The second chapter covers an epidemiologic update of COPD. It is mainly concerned with the global and national incidence, prevalence and burden of the disease and its variations according gender and age. There is particular reference to the impact of underdiagnosed and undertreated conditions in the actual burden of the disease.

3-In the third chapter we addressed several risk factors of the disease, leaving out tobacco which warrants a separate chapter, given its crucial importance in this area. We also analyzed the importance of the contribution of outdoor and indoor air pollution, occupational exposure, genetic factors, respiratory

infections, and social and economic factors. Special reference was given to COPD among non-smokers.

4-The fourth chapter focused on the potential contribution of aging to the systemic manifestations of COPD. Starting with a review of the contemporary literature on the several global statistic variations within the ageing population, we followed with an exploration of the relationship between ageing and oxidative stress and inflammation, anti-aging molecules, and finally, the functional and immunological abnormalities of the elderly.

5-The aim of the fifth section was to review and emphasize the impact of the chronic exposure to the tobacco smoke on the systemic inflammation.

6-The next section follows on naturally from the previous one. It is concerns the various and complex aspects of the oxidative stress particularly the biochemical phases of oxidation, the formation of oxygen radicals and lipid peroxidation, and the relationship between oxidants and cells and oxidants and inflammation in COPD; the function of several anti-oxidant mechanisms of protection; the relevance of apoptosis in emphysema; the relationship between oxidants and glucocorticoid receptor sensitivity; and finally the balance between proteases/anti-proteases.

7-In the seventh part we have reviewed the most important local and systemic structural and inflammatory abnormalities in COPD.

8-Finally in the eighth chapter, we have dealt with the particular cellular frame of the local and systemic inflammation, whether innate or acquired immunity: monocytes/macrophages, eosinophils and mastocytes, dendritic cells, natural killer cells, T-natural-killer, T- $\gamma\delta$  and lymphocytes.

## **SECOND PART**

1-We began the second part of the work with a brief generic outline of the aims of this research project: detection in the peripheral blood of any alterations in its lymphocyte populations, particularly the relationship between detecting COPD and the individual risk of severity in the context of the systemic inflammation of

the disease.

2-The second chapter concerns the material and methods.

a)-The Medical Sample was represented by **69 stable patients with COPD** and by 19 normal individuals (Control Group).

Patients were distributed according to the four severity groups of the GOLD classification (2013): 13 in Group A, 21 in Group B, 20 in Group C and 8 in Group D. 66 individuals (81.7%) were males and 15 (18.29%) females.

Their ages varied between 33 and 81 years, and was relatively homogenous among the groups in question.

The majority was ex-smokers and only 4 individuals were current smokers. The total rates of tobacco consumption varied between 10 and 60 packets/year.

b)-The methodology used was within the following parameters: clinical and laboratory approaches which included, the detection of possible comorbidities, completed by the  $\alpha_1$ -Pi study, detection of allergic reactions, and radiology and electrocardiography exams.

The respiratory function covered the alveolar-capillary diffusion, arterial blood gases; the first and the second were obtained through plethysmography and the blood gases through the ABL-5 (Radiometer).

The lymphocyte phenotyping was obtained by flow cytometry after incubation of the peripheral blood with monoclonal antibodies and the reading through software acquisition of 10.000 events.

c)- For the statistical analysis of the results we used the tests: Qui-square, e Fisher's Exact, Kolmogorov-Sminov, Kruskal-Wallis and Mann-Whitney. Data was analyzed using SPSS program version 19, with a significant statistical level of 0.05.

3-Of the vast amount of data, we would highlight the following as particularly relevant to our proposed aims:

From the **clinical and laboratorial study**, among the respiratory complains the dyspnea stood out. It was present in all groups, highest in Groups B and D, but affecting all the patients. Dyspnea and cough taken together were present in

similar percentages in the patients of the Groups A, B and C and whenever sputum was associated with the afore mentioned symptoms the percentage doubled.

All the patients reported **exacerbations** which tended to increase in line with the severity of the disease. The **occupational inhalation risk** always exceeded the number of the patients, due to the fact that most of them had more than one occupational activity. Only a minimum percentage of individuals in each group were carriers of a  **$\alpha_1$ .Pi deficiency**, curiously the most severe groups had the lowest serum values of this enzyme.

The study showed the presence of a considerable number of other **pathologic processes** associated with COPD, with potential relevance to the systemic impact of the disease: superior and inferior infections, arterial hypertension, cardiac insufficiency, diabetes mellitus, dyslipidemia, excess of weight, osteoporosis, depression and neoplasms, often associated with a progressive and significant burden in the more advanced stages of COPD.

The most important **radiological findings**, among the many diverse ones, related with centrilobular and panlobular emphysema, as well as to the lesions characteristic of chronic bronchitis. As the disease progressed we noticed an inverse correlation between the emphysema and chronic bronchitis.

The **functional respiratory** assessment showed the progressive and significant drop in the FEV<sub>1</sub>-PBD among the different groups as well as in the FEV<sub>1</sub>/FVC-PBD. The RV and the RV/TLC relationship rose significantly according to the severity of the disease.

We also noticed a significant decrease in the alveolar-capillary diffusion, PaO<sub>2</sub> and Sat.

What stood out from the study of the **lymphocyte populations in the peripheral** blood, was the remarkably significant decrease in the total lymphocyte counts, in line with the severity of the disease; in the highest risk group this went down to almost half that of the Control Group. As for the expression of the cellular receptors, the CCR5 and CCR3CCR5 **significant decreased** in the most severe group.

4-Looking at the research results globally it would appear that the abnormalities detected both in the lymphocyte populations and the CCR5 and CCR3CCR5 receptors were directly related with COPD, and in certain cases might be used as predictive factors for the disease and its severity grading.

In the circumstances, these findings may represent one more **clinical phenotype**, that could lead to a more personalized approach to the disease and better preventive and therapeutic measures.

However, we have also to concede that these alterations could have resulted from a decrease in the number of the circulating cells, due to the cytokine and chemokine attraction to the organs or sites, dependent on the chronic systemic inflammatory process induced or modified by the oxidative stress.

## BIBLIOGRAFIA



- [1]-Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD). *Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease* (UPDATED) 2013:1-76
- [2]-Murray CJ, Lopez AD. Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: Global Burden of Disease Study. *Lancet* 1997; 349: 1498-1504
- [3]-World Health Organization. *The World Report 2004: Changing History*. [www.who.int/whr/2004/en/](http://www.who.int/whr/2004/en/)
- [4]-Bousquet J, Khaltaev N. Global surveillance prevention and control of chronic respiratory diseases: a comprehensive approach (updated 2007; accessed June 30, 2011). Available from: <http://www.who.int/gard/publications/GARD%20Book%202007.pdf>
- [5]-Bousquet J, Kiley J, Bateman ED, Viegi G, Khaltaev N, et al. Prioritized research agenda for prevention and control of chronic respiratory diseases. *Eur Respir J* 2010; 36: 995-1001
- [6]-Mathers CD, Roncar D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Med* 2006; 3:2011-2030
- [7]-Halbert RJ, Natoli JL, Gano A, et al. Global burden COPD: systematic review and meta-analysis. *Eur Respir J* 2006; 28: 523-532
- [8]-Epidemiology of chronic obstructive pulmonary disease. *In*: Postma DS, Siafakas N, eds. *Management of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*. *Eur Respir Mon* 1998, 7: 41-73
- [9]-Mannino DM, Buist AS. Global Burden of COPD: risk factors, prevalence, and future trends. *Lancet* 2007; 370: 765-773
- [10]-Franchi M. EFA Book on chronic obstructive pulmonary disease in Europe. *Sharing and Caring*. Brussels, *European Federation of Airway Diseases*, 2010.
- [11]-Viegi G, Pedreschi M, Pistelli F, et al. Prevalence of airways obstruction in a general population. European Respiratory Society vs. American Thoracic Society Definition. *Chest* 2000; 117: Suppl.2, 339S-345S
- [12]-Menezes AM, Perez-Padilla R, Jardim JR, et al. Chronic obstructive pulmonary disease in five Latin American cities (the PLATINO study): a prevalence study.

*Lancet* 2005; 366: 1875-1881.

- [13]-Murtagh E, Heaney L, Gingles J, et al. Prevalence of obstructive lung disease in a general population sample: the NICECOPD Study. *Eur J Epidemiol* 2005; 20: 443-453
- [14]-Schimhofer L, Lamprecht B, Vollmer WM, et al. COPD prevalence in Salzburg, Austria: Results from the Burden of Obstructive Lung Disease (BOLD) Study. *Chest* 2007; 131:29-36
- [15]-Soriano JB, Ancochea J, Miravittles M, et al. Recent trends in COPD prevalence in Spain: a repeated cross-sectional survey 1997-2007. *Eur Respir J* 2010; 36: 758-765
- [16]-Doença Pulmonar Obstrutiva Crónica *in* Relatório do Observatório Nacional de Doenças Respiratórias (ONDR) 2007: 138
- [17]-Bárbara C, Rodrigues F, Dias H, Cardoso J, et al. COPD prevalence in Portugal. The Burden of Obstructive Lung Disease Study (BOLD). *Book of ERS Congress Barcelona* 2010
- [18]-Lindeberg A, Jonsson AC, Ronmark E, et al. Ten-year cumulative incidence of COPD and risk factors for incident disease in a symptomatic cohort. *Chest* 2005; 127:1544-1552
- [19]-Johannessen A, Omenaas E, Bakke P, et al. Incidence of GOLD-defined chronic obstructive pulmonary disease in a general adult population. *Int J Tuberc Lung Dis* 2005; 9: 926-932
- [20]-Lokke A, Lange P, Scharling H, Fabricius P, et al. Developing COPD: a 25 year follow up study of the general population. *Thorax* 2006; 61: 935-939
- [21]-Mannino D, Homa D, Akinbami L, et al. Chronic obstructive pulmonary disease surveillance-United States, 1971-2000. *Morb Mortal Wkly Rep*. 2002; 51: 1-16
- [22]-Buist AS, McBurnie MA, Vollmer WM, et al. International variation in the prevalence of COPD (the BOLD Study): a population-based prevalence study. *Lancet* 2007; 370: 741-750
- [23]-Tashkin DP, Altose MD, Connet JE, et al. The Lung Health Study Research Group – Methacholine reactivity predicts changes in lung function over time in smokers

with early chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153: 1802-1811

- [24]-Hospers JJ, Postma DS, Rijcken B, Weiss ST, Schouten JP. Histamine airway hyper-responsiveness and mortality from chronic obstructive pulmonary disease: a cohort study. *Lancet* 2000; 356: 1313-1317
- [25]-Paoletti P, Carrozzi L, Viegi G, Modena P, Ballerin L, et al. Distribution of bronchial responsiveness in a general population: effect of sex, age, smoking, and level of pulmonary function. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 151: 1770-1777
- [26]-Kohlhaufi M, Brand P, Scheuch G, Meyer TS, Shulz H, Haussinger K, et al. Increased fine particle deposition in women with asymptomatic nonspecific airway hyper-responsiveness. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159: 902-906
- [27]-Taylor DR, Reid WD, Paré PD, Fleetham JA. Cigarette smoke inhalation patterns and bronchial reactivity. *Thorax* 1988; 43: 65-70
- [28]-De Torres JP, Casanova C, Hernandez C, et al. Gender and COPD in patients attending a pulmonary clinic. *Chest* 2005; 128:2012-2016
- [29]-Prescott E, Bjerg AM, Andersen PK, et al. Gender difference in smoking effects on lung function and risk of hospitalization for COPD: results from a Danish longitudinal population study. *Eur Respir J* 1997; 10: 822-827
- [30]-Martinez FJ, Curtis JL, Sciurba F, et al. Sex differences in severe pulmonary emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 176:243-252
- [31]-Dransfield MT, Washko GR, Foreman MG, et al. Gender differences in the severity of CT emphysema in COPD. *Chest* 2007; 132:464-470
- [32]-Connett JE, Murray RP, Buist AS, et al. Changes in smoking status affect women more than men: results of the Lung Health Study. *Am J Epidemiol* 2003; 157: 973-979
- [33]-Sin Don D, Cohen Ben-Zaken, Day A, Coxson H, Paré PD. Understanding the Biological differences in susceptibility to chronic obstructive pulmonary disease between men and women. *Proc Am Thorac Soc* 2007; 4: 671-674
- [34]-Dransfield MT, Davis JJ, Gerald LB, Bailey WC. Racial and gender differences in susceptibility to tobacco smoke among patients with chronic obstructive pulmonary

- disease. *Resp Med* 2006; 100:1110-1116.
- [35]-De Marco R, Accordini S I Cerveri I, Corsico A, Sunyer J, et al. For the European Community Respiratory Health Survey (ECRHS) Study Group. An International Survey of Chronic Obstructive Pulmonary Disease in Young adults according to GOLD stages. *Thorax* 2004; 59: 120-125
- [36]-World Health Organization: Chronic Obstructive Pulmonary Disease health topic Burden of COPD in [www.who.int/respiratory/copd/burden/en/index.html](http://www.who.int/respiratory/copd/burden/en/index.html) (último acesso em Março 2013)
- [37]-World Health Organization Chronic Obstructive Pulmonary Disease health topic [www.who.int/respiratory/en/](http://www.who.int/respiratory/en/) (último acesso em Março de 2013)
- [38]-Murray CJL, Lopez AD. Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: global burden of disease study. *Lancet* 1997; 349:1498-1504
- [39]-Eurostat. Causes of Death. Standardised death rate (per 100.000 inhabitants) (Annual data; accessed September 2013) <http://nui.epp.eurostat.ec.europa.eu/nui/show.do?dataset=heth.cdasdr&lang=en>
- [40]-Rycroft CE, Heyes A, Lanza L, et al. Epidemiology of chronic obstructive pulmonary disease: a literature review. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 2012; 7: 457-494
- [41]-Burrows B, Knudson RJ, Cline MG, Lebowitz MD. Quantitative relationships between cigarette smoking and ventilatory function. *Am Rev Respir Dis* 1977; 115:195-205
- [42]-Behera D, Jindal SK, Malhotra HS. Ventilatory function in nonsmoking rural Indian women using different cooking fuels. *Respiration* 1994; 61:89-92
- [43]-Kiraz K, Kart L, Demir R, et al. Chronic pulmonary disease in rural women exposed to biomass fumes. *Clin Invest Med* 2003; 26:243-248
- [44]-Regalado J, Perez-Padilla R, Sansores R, et al. The effect of biomass burning on respiratory symptoms and lung function in rural Mexican women. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 174: 901-905
- [45]-Smith KR. Indoor air pollution in developing countries: recommendations for

research. *Indoor Air* 2002; 12: 198-207

- [46]-Hancox RJ, Poulton R, Greene JM, McLachlan CR, et al. Associations between birth weight, early childhood weight gain and adult lung function. *Thorax* 2009; 64:228-232
- [47]-Murray C, A Lopez, eds. *The Global Burden of Disease*. Cambridge MA: Harvard School of Public Health, World Health Organization, and World Bank, 1996
- [48]-Attfield MD. Longitudinal decline in FEV<sub>1</sub> in United States coal miners. *Thorax* 1985; 40:132-137
- [49]-Balmes J, Becklake M, Blanc P, et al. American Thoracic Society Statement: occupational contribution to the burden of airway disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167: 787-797
- [50]-C. Raheison and P-O. Girodet. Epidemiology of COPD. *Eur Respir Rev* 2009; 18: 114, 213-221
- [51]-Hnidzo E, Sullivan PA, Bang KM, et al. Association between chronic obstructive pulmonary disease and employment by industry and occupation in US population: a study of the data from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Am J Epidemiol* 2002; 156: 738-746
- [52]-Blanc PD, Iribarren C, Trupin L, et al. Occupational exposures and the risk of COPD: dusty trades revisited. *Thorax* 2009; 64: 6-12
- [53]-Ulvestad B, Bakke B, Eduard W, Kongerud J, et al. Cumulative exposure to dust causes accelerated decline in lung function in tunnel workers. *Occup Environ Med* 2001; 58: 663-669
- [54]-Bergdahl IA, Toren K, Eriksson K, et al. Increased mortality in COPD among construction workers exposed to inorganic dust. *Eur Resp J* 2004; 23: 402-406
- [55]-Hajdukova Z, Pelclova D, Nakládalova M. The role of exposure to coal mine dust in chronic bronchitis, COPD, and allergic airway diseases among smoking and nonsmoking miners. *Chest* 2009; 136: 24S-b-24S
- [56]-Melville AM, Pless-Mullooli T, Afolabi OA, Stenton SC. COPD prevalence and its association with occupational exposures in a general population. *Eur Respir J* 2010; 36: 488-493

- [57]-Rodriguez E, Ferrer J, Martí S, Zock J-P, et al. Impact of occupational exposure on severity of COPD. *Chest* 2008; 134: 1237-1243
- [58]-Blanc PD, Burney P, Janson C, et al. The prevalence and predictors of respiratory-related work limitation and occupational disability in an international study. *Chest* 2003; 124: 1153-1159
- [59]-Blanc PD, Eisner MD, Trupin L, et al. The association between occupational factors and adverse health outcomes in chronic obstructive pulmonary disease. *Occup Environ Med* 2004; 61: 661-667
- [60]-Lamprecht B, Schirrhofer L, Kaiser B, Studnicka M, Buist AS. Farming and the prevalence of non-reversible airways obstruction: results from a population-based study. *Am J Ind Med* 2007; 50:421-426
- [61]-Eduard W, Pearce N, Douwes J. Chronic bronchitis, COPD and lung function in farmers: the role of biological agents. *Chest* 2009; 136 (3): 716-725
- [62]-Trupin L, Earnest G, San Pedro M, et al. The occupational burden of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2003; 22:462-469
- [63]-Zhou Y, Wang C, Yao W, Chen P, Kang J, et al. COPD in Chinese nonsmokers. *Eur Respir J* 2009; 35: 509-518
- [64]-Gauderman WJ, Avol E, Gilliland F, et al. The effect of air pollution on lung development from 10 to 18 years of age. *N Engl J Med* 2004; 351: 1057-1067
- [65]-Hersh CP, Hokanson JE, Lynch DA, Washko GR, et al. Family history is a risk factor for COPD. *Chest* 2011; 140 (2): 343-350
- [66]-Sandford AJ, Weir TD, Paré PD. Genetic risk factors for chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 1997; 10: 1380-1391
- [67]-Laurell CB, Eriksson S. The electrophoretic alpha-1-globulin pattern of serum in alpha -1-antitrypsin deficiency. *Scand J Clin Invest* 1963; 15:132-140
- [68]-Tomashefski JF, Crystal RG, Wiedemann HP, Macha E, Stoller JK. The bronchopulmonary pathology of alpha-1antitrypsin (AAT) deficiency: findings of the Death Review Committee of the national registry for individuals with severe deficiency of alpha-1 antitrypsin. *Hum Pathol* 2004; 35: 1452-1461
- [69]- DeMeo DL, Silverman EK.  $\alpha_1$ -Antitrypsin deficiency: Genetic aspects of  $\alpha_1$ -

antitrypsin deficiency: phenotypes and genetic modifiers of emphysema risk. *Thorax* 2004; 59: 259-264

- [70]-Darlington GJ, Astrin KH, Muirhead SP, et al. Assignment of human alpha 1-antitrypsin to chromosome 14 by somatic cell hybrid analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; 79:870-873
- [71]-Barnes PJ, Shapiro SD, Pauwels RA. Chronic obstructive pulmonary disease: molecular and cellular mechanisms. *Eur Respir J* 2003; 22: 672-688
- [72]-Abboud RT, Vimalanathan S. Pathogenesis of COPD. Part I. The role of protease-antiprotease imbalance in emphysema. *Int J Tuberc Lung Dis* 2008; 12:361-367
- [73]-Cichy J, Potempa J, Travis J. Biosynthesis of  $\alpha_1$ -proteinase inhibitor by human lung-derived epithelial cells. *J Biol Chem* 2001; 276:33293-33296
- [74]-Venembre P, Boutten A, Seta N, et al. Secretion of alpha 1-antitrypsin by alveolar epithelial cells. *FEBS Lett* 1994; 346:171-174
- [75]-Paakko P, Kirby M, du Bois RM, et al. Activated neutrophils secrete stored alpha1-antitrypsin. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154:1829-1833
- [76]-Mornex JF, Chytil-Weir A, Martinet Y, et al. Expression of the alpha1-antitrypsin gene in mononuclear phagocytes of normal and alpha 1-antitrypsin deficient individuals *J Clin Invest* 1986; 77:1952-1961
- [77]-Tuder RM, Petrache I, Elias JA, Voelkel NF, Henson PM. Apoptosis and emphysema: the missing link. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003; 28:551-554
- [78]-Daemen MA, Heemskerk VH, Van't Veer C, Denecker G, et al. Functional protection by acute phase proteins alpha<sub>1</sub>-acid glycoprotein and alpha<sub>1</sub>-antitrypsin against ischemia-reperfusion injury by preventing apoptosis and inflammation. *Circulation* 2000; 102 (12): 1420-1426
- [79]-Ikebe N, Akaike T, Miyamoto Y, Hayashida K, Yoshitake J, et al. Protective effect of S-nitrosylated alpha<sub>1</sub>-protease inhibitor on hepatic ischemia-reperfusion injury. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; 295: 904-911
- [80]-Johnson D, Travis J. The oxidative inactivation of human alpha<sub>1</sub>-proteinase inhibitor: further evidence for methionine at the reactive center. *J Biol Chem* 1979; 254: 4022-4026

- [81]-Hubbard RC, Ogushi F, FellsGA, Cantin AM, Jallat S, et al. Oxidants spontaneously released by alveolar macrophages of cigarette smokers can inactivate the active site of alpha<sub>1</sub>-antitrypsin, rendering it ineffective as an inhibitor of neutrophil elastase. *J Clin Invest* 1987; 80:1289-1295
- [82]-Crystal RG. The alpha<sub>1</sub>-antitripsyngene and its deficiency states. *Trends Genet* 1989; 5:411-417
- [83]-Brantly ML, Paul LD, Miller BH, Falk RT, et al. Clinical features and natural history of the destructive lung disease associated with alpha<sub>1</sub>-antitrypsin deficiency of adults with pulmonary symptoms. *Am Rev Respir Dis* 1988; 138:327-336
- [84]-De Serres FJ. Worldwide racial and ethnic distribution of alpha<sub>1</sub>-antitrypsin deficiency. Summary of an analysis of published genetic epidemiology surveys. *Chest* 2002; 122: 1818-1829
- [85]-Fagerhol MK. Serum Pi types in Norwegians. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1967; 70:421-428
- [86]-Hoffmann JJ, van den Broek WG. Distribution of alpha<sub>1</sub>-antitrypsin phenotypes in two Dutch population groups. *Hum Genet* 1976; 32: 43-48
- [87]-Sesboue R, Charlionet R, Vercaigne D, et al. Genetic variants of serum alpha<sub>1</sub>-antitrypsin (Pi types) in Bretons. *Hum Hered* 1978; 28:280-284
- [88]-Blanco I, Bustillo EF, Rodriguez MC. Alpha<sub>1</sub>-antitrypsin Pi phenotypes S and Z in Europe: an analysis of the published surveys. *Clin Genet* 2001; 60: 31-41
- [89]-Sveger T. Liver disease in alpha<sub>1</sub>-antitrypsin deficiency detected by screening of 200.000 infants. *N Engl J Med* 1976; 294:1316-1321
- [90]-Dahl M, Tybjaerg-Hansen A, Lange P, et al. Change in lung function and morbidity from chronic obstructive pulmonary disease in alpha<sub>1</sub>-antitrypsin MZ heterozygotes: a longitudinal study of the general population. *Ann Intern Med* 2002; 136: 270-279
- [91]-Hutchison DCS. Alpha<sub>1</sub>-antitrypsin in Europe: geographical distribution of Pi types S and Z. *Resp Med* 1998; 92: 367-377
- [92]-Dahl M, Tybjaerg-Hansen A, Lange P, et al. Change in lung function and morbidity from chronic obstructive pulmonary disease in alpha<sub>1</sub>-antitrypsin MZ

heterozygotes: a longitudinal study of the general population. *Ann Intern Med* 2002; 136:270-279

- [93]-Hersh CP, Dahl M, Ly NP, Berkey CS, Nordestgaard BG, Silverman EK. Chronic obstructive pulmonary disease in  $\alpha_1$ -antitrypsin PI MZ heterozygotes: a meta-analysis. *Thorax* 2004; 59: 843-849.
- [94]-Martin JP, Sesboue R, Charlionet R, et al. Genetic variants of serum alpha<sub>1</sub>-antitrypsin (Pi types) in Portuguese. *Hum Hered* 1980; 30:129-135
- [95]-Dahl M, Hersh CP, Ly NP, Berkey CS, et al. The protease inhibitor Pi S allele and COPD: a meta-analysis. *Eur Respir J* 2005; 26:67-76
- [96]-Colp C, Pappas J, Moran D, Lieberman J. Variants of alpha<sub>1</sub>-antitrypsin in Puerto Rican children with asthma. *Chest* 1993; 103 (3): 812-815
- [97]-Luisetti M, Seersholm N.  $\alpha_1$ -Antitrypsin deficiency. Epidemiology of  $\alpha_1$ -antitrypsin deficiency. *Thorax* 2004; 59: 164-169
- [98]-Senn O, Russi EW, Imboden M, Probst-Hensch NM.  $\alpha_1$ -Antitrypsin deficiency and lung disease: risk modification by occupational and environmental inhalants. *Eur Respir J* 2005; 26:909-917
- [99]-Piitulainen E, Eriksson S. Decline in FEV<sub>1</sub> related to smoking status in individuals with severe alpha<sub>1</sub>-antitrypsin deficiency (Pi ZZ). *Eur Respir J* 1999; 13:247-251
- [100]-Eriksson S, Lindell SE, Wiberg R. Effects of smoking and intermediate alpha<sub>1</sub>-antitrypsin deficiency (PiMZ) on lung function. *Eur J Respir Dis.*1985; 67:279-285
- [101]-Senn O, Russi EW, Imboden M, Probst-Hensch NM.  $\alpha_1$ -Antitrypsin deficiency and lung disease: risk modification by occupational and environmental inhalants. *Eur Respir J* 2005; 26: 909-917
- [102]-Joos L, He JQ, Shepherdson MB, et al. The role of matrix metalloproteinase polymorphisms in the rate of decline in lung function. *Hum Mol Genet* 2002; 11: 569-576
- [103]-Lomas DA. The selective advantage of  $\alpha_1$  -Antitrypsin deficiency. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 173: 1072-1077.
- [104]-Silverman EK, Vestbo J, Agusti A, Anderson W, Bakke PS, Barnes KC, et al. Opportunities and challenges in the genetics of COPD 2010: An international

- COPD genetics conference report. *J Chronic Obstructive Pul Dis* 2011; 8:121-135
- [105]-Knudson R, James Jackson Jr. The young pulmonologist who described familial emphysema: an historical footnote. *Chest* 1985; 87:673-676
- [106]-McClearn GE, Svartengren M, Pedersen NL, et al. Genetic and environmental influences on pulmonary function in aging Swedish twins. *J Gerontol* 1994; 49: 264-268
- [107]-Gottlieb DJ, Wilk JB, Harmon M, et al. Heritability of longitudinal change in lung function: the Framingham study. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164: 1655-1659
- [108]-Wan ES, Silverman EK. Genetics of COPD and emphysema. *Chest* 2009; 136: 859-866
- [109]-Joos L, He JQ, Shepherdson MB, et al. The role of matrix metalloproteinase polymorphisms in the rate of decline in lung function. *Hum Mol Genet* 2002; 11: 569-576
- [110]-Minematsu N, Nakamura H, Tateno H, Nakajima T, et al. Genetic polymorphism in matrix metalloproteinase-9 and pulmonary emphysema. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 289: 116-119
- [111]-Haq Imran, Lowrey G E, Kalsheker N, Johnson SR. Matrix metalloproteinase-12 (MMP-12) SNP affects MMP activity, lung macrophage infiltration and protects against emphysema in COPD. *Thorax* 2011; 66: 970-976
- [112]-Hirano K, Sakamoto T, Uchida Y, et al. Tissue inhibitor of metalloproteinase -2 gene polymorphisms in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2001; 18: 748-752
- [113]-Yamada N, Yamaya M, Okinaga S, et al. Microsatellite polymorphism in the heme oxygenase-1 gene promoter is associated with susceptibility to emphysema. *Am J Hum Genet* 2000; 66: 187-195
- [114]-Petersen SV, Oury TD, Ostergaard L, Valnickova Z, et al. Extracellular superoxide dismutase (EC-SOD) binds to type I collagen and protects against oxidative fragmentation. *J Biol Chem* 2004; 279: 13705-13710
- [115]-Kliment CR, Tobolewski JM, Manni ML, Tan RJ, et al. Extracellular superoxide dismutase protects against matrix degradation of heparin sulfate in the lung.

*Antioxid Redox Signal* 2008; 10: 261-268

- [116]- Gao F, Koenitzer JR, Tobolewski JM, Jiang D, et al. Extracellular superoxide dismutase inhibits inflammation by preventing oxidative fragmentation of hyaluronan. *J Biol Chem* 2008; 283: 6058-6066.
- [117]-Dahl M, Bowler RP, Juul K, Crapo JD, et al. Superoxide dismutase 3 polymorphism associated with reduced lung function in two large populations. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 178: 906-912
- [118]-Oury TD, Day BJ, Crapo JD. Extracellular superoxide dismutase in vessels and airways of humans and baboons. *Free Rad Biol Med* 1996; 20: 957-965
- [119]-Juul K, Tybjaerg-Hansen A, Marklund S, Lange P, et al. Genetically increased antioxidative protection and decreased chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 173: 858-864
- [120]-Young RP, Hopkins R, Black PN, Eddy C, et al. Functional variants of antioxidant genes in smokers with COPD and those with normal lung function. *Thorax* 2006; 61: 394-399
- [121]-Siedlinski M, van Diemen CC, Postma DS, Vonk JM, et al. Superoxide dismutases, lung function and bronchial responsiveness in a general population. *Eur Respir J* 2009; 33: 986-992
- [122]-Forsberg L, Lyrenas L, de Faire U, Morgenstern R. A common functional C-T substitution polymorphism in the promoter region of the human catalase gene influences transcription factor binding, reporter gene transcription and is correlated to blood catalase levels. *Free Radic Biol Med* 2001; 30: 500-505
- [123]-Mak JC, Ho SP, Yu WC, et al. Polymorphisms and functional activity in superoxide dismutase and catalase genes in smokers with COPD. *Eur Respir J* 2007; 30: 684-690
- [124]-Cheng SL, Yu CJ, Yang PC. Genetic polymorphisms of cytochrome p450 and matrix metalloproteinase in chronic obstructive pulmonary disease. *Biochem Genet* 2009; 47: 591-601
- [125]-Minematsu N, Nakamura H, Iwata M, et al. Association of CYP2A6 deletion polymorphism with smoking habit and development of pulmonary emphysema. *Thorax* 2003; 58: 623-628

- [126]-Brogger J, Steen VM, Eiken HG, Gulsvik A, Bakke P. Genetic associations between COPD and polymorphisms in TNF, ADRB2 and EPHX1. *Eur Respir J* 2006; 27: 682-688
- [127]-Gsur A, Zydek T, Schnattinger K, et al. Association of microsomal epoxide hydrolase polymorphisms and lung cancer risk. *Br J Cancer* 2003; 89:702-706
- [128]-Lee WJ, Brennan P, Boffetta P, et al. Microsomal epoxide hydrolase polymorphisms and lung cancer risk: a quantitative review. *Biomarkers* 2002; 7: 230-241
- [129]-Huang WY, Chattee N, Chanock S, et al. Microsomal epoxide hydrolase polymorphisms and risk for advanced colorectal adenoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14: 152-157
- [130]-Baranova H, Perriot J, Albuissou E, et al. Peculiarities of the GSTM1 0/0 in French heavy smokers with various types of chronic bronchitis. *Hum Genet* 1997; 99: 822-826
- [131]-Ishii T, Matsuse T, Teramoto S, et al. Glutathione S-transferase P1 (GSTP1) polymorphism in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 1999; 54: 693-696
- [132]-Sakao S, Tatsumi K, Igari H, et al. Association of tumor necrosis factor alpha gene promoter polymorphism with the presence of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163: 420-422
- [133]-Van der Pouw Kraan TC, Kucukaycan M, Bakker AM, et al. Chronic obstructive pulmonary disease is associated with the -1055 IL-13 promoter polymorphism. *Genes Immun* 2003; 3: 436-439
- [134]-Donaldson GC, Seemungal TA, Patel IS, et al. Airway and systemic inflammation and decline in lung function in patients with COPD. *Chest* 2005; 128: 1995-2004
- [135]-Walston JD, Fallin MD, Cushman M, et al. IL-6 gene variation is associated with IL-6 and C-reactive protein levels, but not cardiovascular outcomes in the Cardiovascular Health Study. *Hum Genet* 2007; 122: 485-494
- [136]-He J-Q, Foreman MG, Shumansky K, Zhang X, et al. Associations of IL6

- polymorphisms with lung function decline and COPD. *Thorax* 2009; 64: 698-704
- [137]-Hizawa N, Yamaguchi E, Konno S, et al. A functional polymorphism in the RANTES gene promoter is associated with the development of late-onset asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166: 686-690
- [138]-Walter MJ, Morton JD, Kajiwara N, Agapov E, et al. Viral induction of a chronic asthma phenotype and genetic segregation from the acute response. *J Clin. Invest* 2002; 110: 165-175
- [139]-Hizawa N, Makita H, Nasuhara Y, Hasegawa M, et al. Functional single nucleotide polymorphisms of the CCL5 gene and non emphysematous phenotype in COPD patients. *Eur Respir J* 2008; 32: 372-378
- [140]-Foreman MG, Kong X, DeMeo DL, Pillai SG, Hersh CP, et al. Polymorphisms in surfactant protein-D are associated with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2011; 44: 316-322
- [141]-Pastva AM, Wright JR, Williams KL. Immunomodulatory roles of surfactant proteins A and D: implications in lung disease. *Proc Am Thorac Soc* 2007; 4: 252-257.
- [142]-Lomas DA, Silverman EK, Edwards LD, Locantore LW, et al. Serum surfactant protein D is steroid sensitive and associated with exacerbations of COPD. *Eur Respir J* 2009; 34: 95-102
- [143]-Sims MW, Tal-Singer RM, Kierstein S, Musani AI, et al. Chronic obstructive pulmonary disease and inhaled steroids alter surfactant protein D (SP-D) levels: a cross-sectional study. *Respir Res* 2008; 9:13
- [144]-Johnson M. Molecular mechanisms of  $\beta_2$ -adrenergic receptor function, response, and regulation. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117:18-24
- [145]-Green SA, Cole G, Jacinto M, et al. A polymorphism of the human  $\beta_2$ -adrenergic receptor within the fourth transmembrane domain alters ligand binding and functional properties of the receptor. *J Biol Chem* 1993; 268: 23116-23121
- [146]-Thomsen M, Nordestgaard BG, Sethi AA, et al.  $\beta_2$ -adrenergic receptor polymorphisms, asthma and COPD: two large population-based studies. *Eur Respir J* 2012; 39: 558-566

- [147]-Bakke PS, Zhu G, Gulsvik A, Kong X, Agusti AGN, Calverley PMA, et al. Candidate genes for COPD in two large data sets. *Eur Respir J* 2011; 37: 255-263
- [148]-Silverman EK, Vestbo J, Agusti A, Anderson W, Bakke PS, Barnes KC, et al. Opportunities and challenges in the genetics of COPD 2010: An international COPD genetics conference report. *J Chronic Obstructive Pul Dis* 2011; 8:121-135
- [149]-Pillai SG, Ge D, Zhu G, Kong X, Shianna KV, et al. A genoma-wide association study in chronic obstructive pulmonary disease (COPD): Identification of two major susceptibility loci. *PLoS Genet* 2009; 5 (3): e 1000421.doi: 10.1371/journal\_pgen.1000421
- [150]-Berrettini N, Yuang X, Tozzi F, Song K, et al. Alpha5/alpha3 nicotinic receptor subunit alleles increase risk for heavy smoking. *Mol Psychiatry* 2008; 4: 368-373
- [151]-Saccone SF, Hinrichs AL, Saccone NL, et al. Cholinergic nicotinic receptor genes implicated in a nicotine dependence association study targeting 348 candidate genes with 3713 SNPs. *Hum Mol Genet* 2007; 16: 36-49
- [152]-Thorgerirsson TE, Geller F, Sulem P, Rafnar T, et al. A variant associated with nicotine dependence, lung cancer and peripheral arterial disease. *Nature* 2008; 452: 638-642
- [153]-Wilk JB, Chen TH, Gottlieb DJ, et al. A genome-wide association study of pulmonary function measures in the Framingham Heart Study. *PLoS Genet* 2009; 5:e1000429
- [154]-Warburton D, Bellusci S, De Langhe S, et al. Molecular mechanisms of early lung specification and branching morphogenesis. *Pediatr Res* 2005; 57: 26R-37-R
- [155]-Chen MH, Wilson CW, Chuang PT. SnapShot: hedgehog signaling pathway. *Cell* 2007; 130: 386
- [156]-Zhou X, Baron RM, Hardin M, Cho MH, Zielinski J, et al. Identification of a chronic obstructive pulmonary disease genetic determinant that regulates HHIP. *Human Mol Genet* 2012; 21 (6): 1325-1335
- [157]-Young RP, Whittington CF, Hopkins RJ, Hay BA, et al. Chromosome 4q31 locus in COPD is also associated with lung cancer. *Eur Respir J* 2010; 36: 1375-1382
- [158]-DeMeo DL, Mariani T, Bhattacharya S, Srisuma S, Lange C, et al. Integration of

genomic and genetic approaches implicates IREB2 as a COPD susceptibility gene. *Am J Human Genetics* 2009; 85; 493 – 502

- [159]-Amos CI, Wu X, Broderick P, Gorlov IP, Gu J, Eisen T, et al. Genome-wide association scan of tag SNPs identifies susceptibility locus for lung cancer at 15q25.1. *Nat Genet* 2008; 40: 616-622
- [160]-Hung RJ, McKay JD, Gaborieau V, Boffetta P, Hashibe M, et al. A susceptibility locus for lung cancer maps to nicotine acetylcholine receptor subunits genes on 15q25. *Nature* 2008; 452:633-637
- [161]-Rouault TA. The role of iron regulatory proteins in mammalian iron homeostasis and disease. *Nat Chem Biol* 2006; 2: 406-414
- [162]-Nelson ME, O'Brien-Ladner AR, Wesselius LJ. Regional variation in iron and iron binding proteins within the lungs of smokers. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153:1353-1358
- [163]-O'Brien-Ladner AR, Nelson SR, Murphy WJ, Blumer BM, Wesselius LJ. Iron is a regulatory component of human IL-1 $\beta$  production. Support for regional variability in the lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000; 23: 112-119
- [164]-Hancock DB, Eijgelsheim M, Wilk JB, et al. Meta-analysis of genome-wide association studies identify multiple loci associated with pulmonary function. *Nat Genet* 2009; 42: 45-52
- [165]-Young RP, Hopkins RJ, Hay BA, Epton MJ, Gamble GD. FAM13A locus in COPD is independently associated with lung cancer-evidence of a molecular genetic link between COPD and lung cancer. *Clinical Genetics* 2011; 4:1-10
- [166]-Cho MH, Castaldi PJ, Wan ES, Siedlinski M, Hersh CP, et al. A genome-wide association study of COPD identifies a susceptibility locus on chromosome 19q13. *Human Mol Genetics* 2012; 2 (4): 947-957
- [167]-Thorgeirsson TE, Gudbjartsson DF, Surakka I, Vink JM, et al. Sequence variants at CHRN3-CHRNA6 and CYP2A6 affect smoking behavior. *Nat Genet* 2010; 42:448-453
- [168]-Tobacco and Genetics (TAG) Consortium 2010. Genome-wide meta-analysis identify multiple loci associated with smoking behavior. *Nat Genet* 2010; 42: 441-447

- [169]-Black RA, White JM. ADAMS: focus on the protease domain. *Current Opinion in Cell Biology* 1998; 10 (5): 654-659
- [170]-Primakoff P, Myles DG. The ADAM gene family: surface proteins with adhesion and protease activity. *Trends Genet* 2000; 16 (2): 83-87
- [171]-Schedel M, Depner M, Schoen C, Weiland SK, et al. The role of polymorphisms in ADAM33, a desintegrin and metallopeptidase 33, in childhood asthma and lung function in two German populations. *Respiratory Research* 2006; 7: 91
- [172]-Jongepier H, Boezen HM, Dijkstra A, Howard TD, et al. Polymorphisms of the ADAM33 gene are associated with accelerated lung function in asthma. *Clin Exp Allergy* 2004; 34 (5): 757-760
- [173]-Van Diemen CC, Postma DS, Vonk JM, Bruinenberg M, et al. A desintegrin and metalloprotease 33 polymorphisms and lung function decline in the general population. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172 (3): 329-333
- [174]-Gosman MM, Boezen HM, Van Diemen CC, et al. A desintegrin and metalloprotease 33 and chronic obstructive pulmonary disease pathophysiology. *Thorax* 2007; 62 (3): 242-247
- [175]-Wang X, Li L, Xiao J, Jin C, et al. Association of ADAM33 gene polymorphisms with COPD in a northeastern Chinese population. *BMC Medical Genetics* 2009; 10: 132 doi: 10.1186/1471-2350-10-132
- [176]-Kong X, Cho MH, Anderson W, Harvey O, et al. Genome-wide association study identifies BICD1 as a susceptibility gene for emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 2011; 183: 43-49
- [177]-Pillai SG, Kong X, Edwards LD, Cho MH, Anderson WH, et al. Loci identified by genome-wide association studies influence different disease-related phenotypes in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Crit Care Med* 2010 ; 182:1498-1505
- [178]-Shaheen SO, Barker DJP, Shiell AW, Crocker FJ, et al. The relationship between pneumonia in early childhood and impaired lung function in late adult life. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 149: 616-619
- [179]-Gold DR, Tager IB, Weiss ST, Tosteson TD, et al. Acute lower respiratory illness in childhood as a predictor of lung function and chronic respiratory symptoms. *Am J Respir Crit Care Med* 1989; 140: 877-884

- [180]-Lancaster JF, Tomaszefski JF. Tuberculosis: a cause of emphysema. *Am Rev Respir Dis* 1963; 87: 435-457
- [181]-Snider GL, Doctor L, Demas TA, Shaw AR. Obstructive airway disease in patients with treated pulmonary tuberculosis. *Am Rev Respir Dis* 1971; 103: 625-640
- [182]-Plit ML, Anderson R, Van Rensburg CE, et al. Influence of antimicrobial chemotherapy on spirometric parameters and pro-inflammatory indices in severe pulmonary tuberculosis. *Eur Respir J* 1998; 12:351-356
- [183]-Anno H, Tomaszefski JF. Studies on the impairment of respiratory function in pulmonary tuberculosis. *Am Rev Tuberc* 1955; 71:333-348
- [184]-Hallett WY, Martin CJ. The diffuse obstructive pulmonary syndrome in a tuberculosis sanatorium. I. Etiologic Factors. *Ann Intern Med* 1961; 54: 1146-1155
- [185]-Brashier B, Gangavane S, Valsa S, et al. Almost half the patients treated for pulmonary tuberculosis (TB) show evidence of obstructive airways disease (OAD). *European Respiratory Society Annual Congress, Stockholm-Sweden 2007*. Abstr.E2585
- [186]-Ehrlich RI, White N, Norman R, et al. Predictors of chronic bronchitis in South African adults. *Int J Tuberc Lung Dis* 2004; 8: 369-376
- [187]-Buist AS, McBurnie MA, Vollmer WM, et al. International variation in the prevalence of COPD (the BOLD Study): a population-based prevalence study. *Lancet* 2007; 370:741-750
- [188]-Menezes AM, Hallal PC, Perez-Padilla R, et al. Tuberculosis and airflow obstruction: evidence from the PLATINO study in Latin America. *Eur Respir J* 2007; 30:1180-1185
- [189]- WHO. Stop TB Partnership. Tuberculosis in countries. <http://www.stoptb.org/countries> (acedido em Maio 2012)
- [190]-Van Zyl Smit RN, Yew WW, Leung CC, Zumla A, et al. Global lung health: the colliding epidemics of tuberculosis, tobacco smoking, HIV and COPD. *Eur Respir J* 2010; 36: 27-33
- [191]-Matsuse T, Hayashi S, Kuwano K, Keunecke H, Jefferies WA, et al. Latent

- adenoviral infection in the pathogenesis of chronic airways obstruction. *Am Rev Respir Dis* 1992; 146:177-184
- [192]-Elliott WM, Hayashi S, Hogg JC. Immunodetection of adenoviral E1A proteins in human lung tissue. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1995; 12: 642-648
- [193]-Retamales I, Elliott WM, 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
- [194]-Liu F, Green MR. Promoter targeting by adenovirus E1a through interaction with different cellular DNA-binding domains. *Nature* 1994; 368: 520-525
- [195]-Behzad AR, Morimoto K, Gosselink J, Green J, Hogg JC, et al. Induction of mesenchymal cell phenotypes in lung epithelial cells by adenovirus E1A. *Eur Respir J* 2006; 28:1106-1116
- [196]-McManus TE, Marley A-M, Baxter N, Christie SN, et al. High levels of Epstein-Barr virus in COPD. *Eur Respir J* 2008; 31: 1221-1226
- [197]-Prescott E, Vestbo J. Socioeconomic status and chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 1999; 54:737-741
- [198]-Hegewald MJ, Crapo RO. Socioeconomic status and lung function. *Chest* 2007; 132:1608-1614
- [199]-Celli BR, Halbert RJ, Nordyke RJ, Schau B. Airway obstruction in never smokers: results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Am J Med* 2005; 118 (12): 1364-1372
- [200]-Behrendt CE. Mild and moderate-to severe COPD in nonsmokers: distinct demographic profiles. *Chest* 2005; 128:1239-1244
- [201]-Birring SS, Brightling CE, Bradding P, et al. Clinical, radiological and induced sputum features of chronic obstructive pulmonary disease in nonsmokers: a descriptive study. *Am.J Respir Crit Care Med* 2002; 166:1078-1083
- [202]-Lamprecht B, Schirnhofner L, Kaiser B, Buist S, et al. Non-reversible airway obstruction in never smokers: results from the Austrian BOLD study. *Respir Med* 2008; 102 (12): 1833-1838
- [203]-Lamprecht B, McBurnie MA, Vollmer WM, Gudmundsson G, et al. COPD in never

- smokers. Results from the population-based burden of obstructive lung disease study. *Chest* 2011; 139 (4): 752-763
- [204]-Zhou Y, Yao WW, Chen P, Kang J, Huang S, et al. COPD in Chinese nonsmokers. *Eur Respir J* 2009; 33: 509-518
- [205]-Fowler J, Godlee R. Emphysema of the lungs. London: Longmans, Ed. Green and Co. 1898: 171
- [206]-Vandenbergh E, Van de Woestijne KP, Gyselen A. Weight changes in the terminal stages of chronic obstructive pulmonary disease: relation to respiratory function and prognosis. *Am Rev Respir Dis* 1967; 95: 556-566
- [207]-Keith C Meyer. Aging. *Proc Am Thorac Soc*.2005; 2: 433-439
- [208]-Rafael Solana, Graham Pawelec, Raquel Tarazona. Aging and innate immunity. *Immunity* 2006; 24: 491-494
- [209]-Pawelec G, Barnett Y, Forsey R, Frasca D, Globerson A, Mcleod J, Caruso C, Franceschi C, Fulop T, Gupta S. T cells and aging. *Front. Biosci* 2002; 7: 1056-1083
- [210]-LM. Fabbri, F. Luppi, B. Beghé and K.F Rabe. Complex comorbidities of COPD. *Eur Respir J* 2008; 31: 204-212
- [211]-Christian R Gomez, Eric D Boehmer, Elizabeth J Kovacs. The aging immune system. *Curr Opin in Immunology* 2005; 17: 457b
- [212]-Franceschi C, Bonafate M, Valensin S, Olivieri F, De Luca M, Ottaviani E, De Benedicts G. Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunescence. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 908: 244-254
- [213]-Solana R, Tarazona R, Gayoso I, Lesur O, Dupuis G, Fulop T. Innate immunosenescence: Effect of aging on cells and receptors of the innate immune system in humans. *Seminars in Immunology* 2012; 24: 331-341
- [214]-Cesari M, Penninx BW, Newman AB et al. Inflammatory markers and onset of cardiovascular events: results from Health ABC Study. *Circulation* 2003; 108: 2317-2322
- [215]-Candore G, Colonna-Romano G, Lio D, Caruso C. Immunological and Immunogenetic markers of successful and unsuccessful ageing. *Advances in Cell Aging and Gerontology* 2003; 13: 29-45
- [216]-Promislow DE. DNA repair and the evolution of longevity: a critical analysis. *J*

*Theor Biol* 1994; 170:291-300

- [217]-World Population Ageing. 2007. United Nations Department of Economic and Social Affairs, population Division <http://www.un.org/esa/population/unpop.htm>
- [218]-WHO 10 Facts on Ageing and Life Course. April 2012. <http://www.who.int/features/factfiles/ageing/en/index.html>
- [219]-Censos 2011. Resultados Definitivos – Portugal. Instituto Nacional de Estatística. 1-530
- [220]-Kazuhiro Ito. Does lung aging have an impact on chronic obstructive pulmonary disease? *Journal of Organ Dysfunction* 2007; 3: 204-220
- [221]-Strehler BL. Time Cells and Aging. Academic Press New York 1977
- [222]-Alexander Burkle, Graziella Caselli, Claudio Franceschi, Erminia Mariani, Paolo Sansoni, Angela Santoni, et al. *Immunity and ageing* 2007; 4: 14. <http://www.Immunityageing.com/content/4/1/4>
- [223]-Harman D. Aging. A theory based on free radicals and radiation chemistry. *J Gerontol* 1956; 2: 298-300
- [224]-Kirkood TB. Understanding the odd science of aging. *Cell* 2005; 120:437-447
- [225]-Kazuhiro Ito, Peter J. Barnes. COPD as disease of accelerated lung aging. *Chest* 2009; 135: 173-180
- [226]-Campisi J, d'Adda Fagagna. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8 (9): 729-740
- [227]-Shay JW, Bacchetti S. A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer* 1997; 33 (5): 787-791
- [228]-Cassar L, Li H, Pinto AR, Nicholls C, Baynes, et al. Bone morphogenetic protein-7 Inhibits telomerase activity telomere maintenance and cervical tumor growth. *Cancer Res* 2008; 68 (22): 9157-9166
- [229]-Atzmon G, Gho M, Cawthon RM, Budagov T, Katz M, Yang X, Siegel G, Bergman A, et al. Evolution in Health and Medicine. Sackler Colloquium: Genetic variation in human telomerase is associated with telomere length in Ashkenazi centenarians. *Proc. Nat Acad Sci USA* 2010; Supp 1: 1710-1717
- [230]-Soti C, Csermely P. Aging Cellular Networks: Chaperones as major participants. *Exp Gerontol* 2003; 38: 1037-1040

- [231]-Carrard G, Bulteau AL, Petropoulos I, Friguet B. Impairment of proteasoma structure and function in aging. *Int J Biochem Cell Biol* 2002; 34: 1461-1474.
- [232]-Porcu M, Chiarugi A. The emerging therapeutic potential of sirtuin-interacting drugs: from cell death to lifespan extension. *Trends Pharmacol Sci* 2005; 26: 94-103.
- [233]-Grubisha O, Smith BC, Denu JM. Small molecule regulation of Sir2 protein deacetylases. *FEBS J* 2005; 272: 4607-4616
- [234]-Ito K, Lim S, Caramori G, et al. A Molecular mechanism of action of theophylline: Induction of histone deacetylase activity to decrease inflammatory gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99:8921-8926
- [235]-Mostoslavsky R, Chua KF, Lombard DB, Pang WW, Fisher MR, Gellon L et al. Genomic instability and aging-like phenotype in the absence of mammalian SIRT6. *Cell* 2006; 124:315-329
- [236]-Kaestner KII, Knochel W, Martinez D E. Unified nomenclature for the winged Helix/Forkhead transcription factors. *Genes Dev* 2000, 14:142-146
- [237]-Essers MA, Vries-Smits LM, Barker N, Polderman PE, Burgering BM, Korswagen HC. Functional interaction between beta-catenin and FOXO in oxidative stress signaling. *Science* 2005; 308:1181-1184
- [238]-Liu JW, Chandra D, Rudd MD, Butler AP, Pallotta V, Brown D, et al. Induction of prosurvival molecules by apoptotic stimuli: involvement of FOXO3a and ROS. *Oncogene* 2005; 24: 2020-2031
- [239]-Greer AL, Brunet A. FOXO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression. *Oncogene* 2005; 24: 7410-7425
- [240]-Wessels RJ, Fitzgerald E, Cypser JR, Tatar M, Bodmer R. Insulin regulation of heart function in aging fruit flies. *Nat Genet* 2004; 36:1275-1281
- [241]-Cohen HY, Lavu S, Bitterman KJ, Hekking B, Imahiyerobo TA, Miller C, et al. Acetylation of the C terminus of Ku70 by CBP and PCAF controls Bax mediated apoptosis. *Mol Cell* 2004; 13: 627-638
- [242]- Kuro M, Matsumura Y, Aizawa H, Kawaguchi H, Suga T, Utsugi T, et al. Mutation of the mouse Klotho gene leads to a syndrome resembling Ageing. *Nature* 1997;

390: 45-51

- [243]-Funada Y, Nishimura Y, Yokoyama M. Imbalance of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 is associated with pulmonary emphysema in Klotho mice. *Kobe J Med Sci* 2004; 50: 59-67
- [244]-Feng D, Kondo Y, Ishigami A, Kuramoto M, Machida T, Maruyama n. Senescence marker protein-30 as a novel antiaging molecule. *Ann NY Acad Sci* 2004; 1019: 360-63
- [245]-Maruyama N, Ishigami A, Kuramoto M, Handa S, Kubo S, Imasawa T, et al. Senescence marker protein-30 knockout mouse as an aging Model. *Ann NY Acad Sci* 2004; 1019: 383-387
- [246]- Ishigami A, Kondo Y, Nanba R, Ohsawa T, Handa S, Kubo S, et al. SMP39 deficiency in mice phospholipids in the liver and shortens the life span. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 315: 575-580
- [247]-Sato T, Seyama K, Sato Y, Mori H, Souma S, Akiyoshi T, et al. Senescence protein-30 protects mice lungs from oxidative stress, aging and smoking. *Am J Respir Crit care Med* 2006; 174:530-537
- [248]-Janssens JP, Pache JC, Nicod LP. Physiological changes in respiratory function associated with ageing. *Eur Respir J* 1999; 13:197-205
- [249]-Chan ED, Welsh CH. Geriatric Respiratory Medicine. *Chest* 1998; 114: 1704-1733
- [250]-Tolep K, Kelsen SG. Effect of aging on respiratory skeletal muscles. *Clin Chest Med* 1993; 14: 363-378
- [251]-Mahler DA, Rosiello RA, Loke J. The Aging Lung. *Clin Geriatr Med* 1986; 2: 215-225
- [252]-Mónica de La Fuente. Role of the immune system in aging. *Imunologia* 2008; 27 (4): 176-191
- [253]-Raham I. Regulation of nuclear factor-kappa  $\beta$ , activator protein-1, and glutathione levels by tumor necrosis factor alpha and dexamethasone in epithelial cells. *Biochem Pharmacol* 2000; 60:1041-1049
- [254]-Helenius M, Hannien M, Lehtinen SK, Salminen A. Changes associated with

- aging and replicative senescence in the regulation of transcription factor NF-Kappa  $\beta$ . *Biochem J* 1996; 318: 603-608
- [255]-Chen LF, Greene WC. Regulation of distinct biological activities of the NF-Kappa  $\beta$  transcription factor complex by acetylation. *J Mol Med* 2003; 81:549-557
- [256]-Kim HJ, Kim KW, Yu BP, Chung HY. The effect of age on cyclooxygenase-2 gene expression: NF-kappa  $\beta$  activation and Ikappa  $\beta$  -alpha degradation. *Free Radic Biol Med* 2000; 28: 10630-10635
- [257]-Musci G, Persichini T, Casadei m, Mazzone V, Venturini G, Polticelli F, et al. Nitrosative/ oxidative modifications and ageing. *Mech Ageing Dev* 2006; 127: 544-551
- [258]-Paik DC, Dillon J, Galicia E, Tilson MD. The Nitrite/collagen reaction: non-enzymatic nitration as a model system for age-related damage. *Connect Tissue Res* 2001; 42:111-122
- [259]-Turko IV, Murad F. Protein nitration in cardiovascular diseases. *Pharmacol Rev* 2002; 54: 619-634
- [260]-Gruver AL, Hudson LL, Sempowski GD. Immunosenescence and ageing *J Pathol* 2007; 211:144-156
- [261]-Shortman K. Cellular aspects of early T-cell development. *Curr Opin Immunol* 1992; 4(2): 140-146
- [262]-Arosa F A, Cardoso E. Linfócitos. In: Arosa FA, Cardoso EM, Pacheco FC. *Fundamentos de Immunologia*. Ed. Lidel, 2007: 128-46
- [263]-Pardoll D, Carrera A. Thimic Selection. *Curr Opin Immunol* 1992; 4(2): 162-165
- [264]-Naylor K, Li G, Vallejo AN, Lee WW, Koetz K, Bryl E, et al. The Influence of age on T cell generation and TCR diversity. *J Immunol* 2005; 174: 7446-7452
- [265]-Li W, Sofe MH, Yeh N, Sehra S, McCarthy BP, Patel DR, Brutkiewicz RR, Kaplan MH, Chang CH. Thymic selection pathway regulates the effector function of CD4 T cells. *J Exp Med* 2007; 204 (9): 2145-2157
- [266]-Bryl E, Gazda M, Foerster J, Witkowski JM. Age-related increase of frequency of new phenotypically distinct subpopulation of human peripheral blood T cells expressing lowered levels of CD4. *Blood* 2001; 98 (4): 1100-1107

- [267]-Posnett DN, Sinha R, Kabak S, Russo C. Clonal populations of T cells in normal elderly humans. The T cell equivalent to benign monoclonal gammopathy. *J Exp Med* 1994; 179:609-618
- [268]-Kovaiou RD, Grubeck-Loebenstien B. Age-Associated Changes within CD4+ T cells. *Immunol Lett* 2006; 107:8-14
- [269]-Vallejo AN. Immune remodeling: lessons from repertoire alterations during chronological aging and immune - mediated disease. *Trends Mol Med* 2007; 13: 94-102
- [270]-Hasler P, Zouali M. Immune receptor signaling aging and autoimmunity. *Cell Immunol* 2005; 233:102-108
- [271]-Spaulding C, Guo W, Effros RB. Resistance to apoptosis in human CD8+ cells that reach replicative senescence after multiple rounds of antigen-specific proliferation. *Exp Gerontol* 1999; 34: 633-644
- [272]-Lazuard L, Jenewein B, Wolf AM, Pfister G, Tzankov A, Grubeck-Loebenstien B. Age-related loss of naïve T cells and dysregulation of T cell/B cell interactions in human lymph nodes. *Immunology* 2005; 114 (1): 37-43
- [273]-Salerno-Gonçalves R, Sztein MB. Cell-mediated immunity and the challenges for vaccine development. *Trends Microbiol* 2006; 14: 536-542
- [274]-Gupta S, Bi R, Su K, Yel L, Chiplunkar S, Gollapudi S. Characterization of naïve memory and effector CD8+ cells: effect of age. *Exp Gerontol* 2004; 39 (4): 545-550
- [275]-Ruth Y, Lan, Ian R. Mackay, M. Eric Gershwin. Regulatory T cells in the prevention of mucosal inflammatory diseases: patrolling the border. *J Autoimmunity* 2007; 29: 272-280.
- [276]- Romano GC, Potestio M, Scialabba G, Mazzola A, Candore G, Lio D, et al. Early activation of gamma delta T lymphocytes in the elderly. *Mech Ageing Dev* 2000; 121 (1-3): 231-238
- [277]- Rogers AN, Vanburen DG, Hedblom EE, Tilahun ME, Telfer JC, Baldwin CL. Gamma delta T cell function varies with the expressed WC1 coreceptor. *J Immunol* 2005; 174(6): 3386-3393
- [278]-Born WK, Jin N, Ayditug MK, Wands JM, French JD, Roark CL, O'Brien RL. Gamma delta T lymphocytes- selectable cells within innate system? *J Clin*

- Immunol* 2007; 27(2): 133-144
- [279]-Aspinall R, Del Giudice G, Effros RB, Grubeck-Loebenstein, Sambhara S. Challenges for vaccination in the elderly. *Immun Ageing* 2007; 4: 9-18
- [280]-Murasko D, Gardner EM. Immunology of aging. In Principles of Geriatric Medicine and Gerontology. 5<sup>th</sup> edition: Edited by: Hazzard WR, Blass JP, Halter JB, Ouslander JG, Tinetti ME. New York: McGraw-Hill 2003: 35-51
- [281]-Argentati K, Re F, Donnini A, Tucci MG, Franceschi C, Bartozzi B, *et al.* Numerical and functional alterations of circulating gamma delta T lymphocytes in aged people and centenarians. *J Leukoc Biol* 2002; 72 (1): 65-71
- [282]-Colonna-Romano G, Aquino A, Bulati M, Lio D, Candore G, Oddo G, *et al.* Impairment of gamma /delta T lymphocytes in elderly: implications for immunosenescence. *Exp Gerontol* 2004; 39(10): 1439-1446
- [283]-Akbar AN, Vukmanovic-Stejic M, Taams LS, Macallan DC. The dynamic co-evolution of memory and regulatory CD4+ T cell in the periphery. *Nat Rev Immunol* 2007; 7 (3); 231-237
- [284]-Chen Z, Benoist C, Mathis D. How defects in central tolerance impinge on a deficiency in regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102 (41): 14735-14740
- [285]-Sakaguchi S, Ymaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* 2008; 133: 775-787
- [286]-Belkaid Y, Tarbell K. Regulatory T cells in the control of host microorganism interactions. *Annu Rev Immunol* 2009; 27:551-589
- [287]-Tang Q, Adams JY, Tooley AJ, Bi M, Fife BT, *et al.* Visualizing regulatory T cell control of autoimmune responses in non obese diabetic mice. *Nat Immunol* 2006; 7: 83-92
- [288]- Miyara M, Sakaguchi S. Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression. *Trends Mol Med* 2007; 13: 108-116
- [289]-von Boehmer H. Mechanisms of suppression by suppressor T cells. *Nat Immunol* 2005; 6: 338-344
- [290]-Fallarino F, Grohmann U, Hwang KW, Orabona C, Vacca C, *et al.* Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003; 4: 1206-1212

- [291]- McKinley L, Logar AJ, McAllister F, Zheng M, Steele C, *et al.* Regulatory T cells dampen pulmonary inflammation and lung injury in an animal model of pneumocystis pneumonia. *J Immunol* 2006; 177: 6215-6226
- [292]-Guilliams M, Oldenhove G, Noel W, Herin M, Brys L, *et al.* African trypanosomiasis: naturally occurring regulatory T cells favor trypano tolerance by limiting pathology associated with sustained type 1 inflammation. *J Immunol* 2007; 179: 2748-2757
- [293]-Enarsson K, Lundgren A, Kindlund B, Hermansson M, Roncador G, *et al.* Function and recruitment of mucosal regulatory T cells in human chronic Helicobacter pylori infection and gastric adenocarcinoma. *Clin Immunol* 2006; 121: 358-368
- [294]-Shimizu J, Moriizumi E. Aging-dependent generation of suppressive CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>R123<sup>lo</sup> CD103<sup>+</sup> T cells in mice. *Eur J Immunol* 2003; 33: 2449-2458
- [295]-Sharma S, Dominguez AL, Lutsgarten J. High accumulation of T regulatory cells prevents the activation of immune responses in aged animals. *J Immunol* 2006; 177: 8348-8355
- [296]-Lages CS, Suffia I, Velilla PA, Huang B, Warshaw G, *et al.* Functional regulatory T cells accumulate in aged hosts and promote chronic infectious disease reactivation. *J Immunol* 2008; 181: 1835-1848
- [297]-Stavnezer J. Immunoglobulin class switching. *Curr Opin Immunol* 1996; 8 (2): 199-205
- [298]-Thomas MD, Srivastava B, Allman D. Regulation of peripheral B cell maturation. *Cell Immunol* 2006; 239 (2): 92-102
- [299]-Boren E, Gershwin ME. Inflamm-aging, autoimmunity and the immune risk phenotype. *Autoimmun Rev* 2004; 3: 401-406
- [300]-Wang CQ, Udupa KB, Xiao H, Lipschitz DA. Effect of age on marrow macrophage number and function. *Aging* 1995; 7: 379-384
- [301]-Taro Kawai, Shizuo Akira. TLR signaling. *Seminars in Immunology* 2007; 19: 24-32
- [302]-Kensuke Miyake. Innate immune sensing of pathogens and danger signals by cell surface Toll-like receptors. *Seminars in Immunology* 2007; 19: 3-10

- [303]-Gisa Gerold, Arturo Zychlinsky, Juana de Diego. What is the role of Toll-like receptors in bacterial infections? *Seminars in Immunology* 2007 19: 41-47
- [304]-Solana R, Pawelec G, Tarazona R. Aging and innate immunity. *Immunity* 2006; 24: 491-494
- [305]-Zhang Y, Wallace DL, de Lara CM, Ghattas H, Griffin GE, Taylor GP, *et al.* In vivo kinetics of human natural killer cells: the effects of ageing and acute and chronic viral infection. *Immunology* 2007; 121:258:65-69
- [306]-Grolleau-Julius A, Ray D, Yung RL. The role of epigenetics in aging and autoimmunity. *Clin Rev Allerg Immunol* 2009. doi: 10.1007/s12016-009-8169-3
- [307]-Shahab L, Jarvis M, Britton J, West R. Prevalence, diagnosis and relation to tobacco dependence of chronic obstructive pulmonary disease in a nationally representative population sample. *Thorax* 2006; 61:1043-1047
- [308]-Tsuji T, Aoshiha K, Nagai A. Alveolar cell senescence in patients with pulmonary emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 174:886-893
- [309]-Morla M, Busquets X, Pons J, *et al.* Telomere shortening in smokers with and without COPD. *Eur Respir J* 2006; 27:525-528
- [310]-MacNee W. Oxidants/antioxidants and chronic obstructive pulmonary disease: pathogenesis to therapy. *Novartis Found Symp* 2001; 234: 169-185
- [311]-Nadeem A, Raj IIG, Chhabra SK. Increased oxidative stress and altered levels of antioxidants in chronic obstructive pulmonary disease. *Inflammation* 2005; 29:23-32
- [312]-Rajendrasozhan S, Yang SR, Kinnula VL, *et al.* SIRT1, an anti-inflammatory and antiaging protein, is decreased in lungs of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 177: 861-870
- [313]-Ito K, Ito M, Elliott WM, *et al.* Decreased histone deacetylase activity in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2005; 352: 1967-1976
- [314]-Ito K, Yamamura S, Essilfie-Quaye S, *et al.* Histone deacetylase 2-mediated deacetylation of the glucocorticoid receptor enables NF- $\kappa$ B suppression. *J Exp Med* 2006; 203: 7-13
- [315]-Ribarac-Stepic N, Vulovic M, Koricanac G, *et al.* Basal and glucocorticoid

induced changes of hepatic glucocorticoid receptor during aging: relation to activities of tyrosine aminotransferase and tryptophan oxygenase. *Biogerontology* 2005; 6: 113-131

[316]-WHO Report on global tobacco epidemic. 2009. Questions and Answers World Health Organization

[317]-WHO Global Report – Mortality attributable to tobacco. World Health Organization. 2012

[318]-WHO Report on the Global Tobacco Epidemic 2013. Enforcing bans on tobacco advertising, promotion and sponsorship. World Health Organization

[319]- Church DF, Pryor WA. Free radical chemistry of cigarette smoke and its toxicological implications. *Environ Health Perspect* 1985; 64: 111-126

[320]-Pryor WA. Biological effects of cigarette smoke. Wood smoke, and the smoke of plastics: the use of electron spin resonance. *Free Radic Biol Med* 1992;13: 659-676

[321]-Nakayama T, Church DF, Pryor WA. Quantitative analysis of the hydrogen peroxide formed in aqueous cigarette extracts. *Free Radic Biol Med* 1989; 7:9-15

[322]-Rochelle LG, Fischer BM, Adler KB. Concurrent Production of Reactive Oxygen and Nitrogen species by Airway Epithelial Cells in vitro. *Free Radic Biol Med* 1998; 24: 863-868

[323]-Zang L Y, Stone K, Pryor WA. Detection of Free Radicals in Aqueous Extracts of Cigarette tar by Electron Spin Resonance. *Free Radic Biol Med* 1995; 19: 161-1

[324]-Donaldson K, Brown DM, Mitchell C, Dineva M, Beswick PH, Gilmour P, *et al.* Free radical activity of PM10: iron mediated generation of hydroxyl radicals. *Environ Health Perspect* 1997; 105 (5): 1285-1289

[325]-MacNee W. Oxidative Stress and Lung Inflammation in Airways Disease. *Eur J Pharmacol* 2001; 429:195-207

[326]-Garcia Aymerich, Agusti A, Barbera JA, Belfa J, Farrero E, Ferrer A, *et al.* La Heterogeneidad fenotipica de la EPOC. *Arch Bronconeumol* 2009;45: 129-38

[327]-Sobradillo P, Garcia Aymerich J, Agusti A. Fenótipos Clínicos de la EPOC. *Arch Bronconeumol* 2010; 46: 8-11

- [328]-Vestbo J, Anderson W, Coxson HO, Crim C, Dawber F, Edwards et al. ECLIPSE investigators. Evaluation of COPD Longitudinally to Identify Predictive Surrogate End-points (ECLIPSE). *Eur Respir J* 2008; 31: 869-73
- [329]-Fletcher C, Peto R. The natural history of chronic airflow obstruction. *BMJ* 1977; 1: 1645-1648
- [330]-H van der Vaart, DS Postma, W Timens, N H T Ten Hacken. Acute effects of cigarette smoke on inflammation and oxidative stress: a review. *Thorax* 2004; 59:713-721
- [331]- Saetta M. Airway inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160: S17-S20
- [332]-Morrow JD, Frei B, Longmire AW, et al. Increase in circulating products of lipid peroxidation (F<sub>2</sub> isoprostanes) in smokers: smoking as a cause of oxidative damage. *N Engl J Med* 1995; 332: 1198-1203
- [333]-Helmerson J, Larsson A, Vessby B, et al. Active smoking and a history of smoking are associated with enhanced prostaglandin F<sub>(2α)</sub>, interleukin-6 and F<sub>2</sub>-isoprostane formation in elderly men. *Atherosclerosis* 2005; 181: 201-207
- [334]-Montuschi P, Collins JV, Ciabattoni G, Lazzeri N, et al. Exhaled 8-isoprostane as in vivo biomarker of lung oxidative stress in patients with COPD and healthy smokers. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162: 1175-1177
- [335]-Paredi P, Kharitonov SA, Leak D, Ward S, Cramer D, Barnes PJ. Exhaled ethane, a marker of lipid peroxidation is elevated in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162: 369-373
- [336]-Reilly M, Delanty S, Lawson JA. Modulation of oxidant stress in vivo in chronic cigarette smokers. *Circulation* 1996; 94:19-25
- [337]-Lawson JA, Rokach J, FitzGerald GA. Isoprostanes: formation, analysis and use as indices of lipid peroxidation in vivo. *J Biol Chem* 1999; 274: 24441-24444
- [338]-Morrow JD, Roberts LJ. The isoprostanes: unique bioactive products of lipid peroxidation. *Prog Lipid Res* 1997; 36: 1-21
- [339]-Gutteridge JM. Lipid Peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem* 1995; 41: 1819-1828
- [340]-Kinsella BT, O'Mahony DJ, FitzGerald GA. The human thromboxane A<sub>2</sub> receptor alpha isoform (TP alpha) functionally couples to the G proteins Gq and G11 *in vivo*

and is activated by the isoprostane-8-epi-prostaglandin F<sub>2</sub> alpha. *J Pharmacol Exp Ther* 1997; 281: 957-964

[341]-Takajo Y, Ikeda H, *et al.* Augmented oxidative stress of platelets in chronic smokers: mechanisms of impaired platelet-derived nitric oxide bioactivity and augmented platelet aggregability. *J Am Coll Cardiol* 2001; 38:1320-1327

[342]-Gniwotta C, Morrow JD, Roberts LJ II, *et al.* Prostaglandin F<sub>2</sub>-like compounds, F<sub>2</sub>-isoprostanes, are present in increased amounts in human atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17:3236-3241

[343]-Schwedhelm E, Bartling A, Lenzen H, *et al.* Urinary 8-isoprostaglandin F<sub>2α</sub> as a risk marker in patients with coronary heart disease: a matched case- control study. *Circulation* 2004; 109: 843-848

[344]-Rumley AG, Woodward M, Rumley A, *et al.* Plasma lipid peroxides: relationships to cardiovascular risk factors and prevalent cardiovascular disease. *Q J Med* 2004; 97: 809-816

[345]-Esterbauer H, Shaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med* 1991; 1: 81-128

[346]-Parola M, Bellomo G, Robino G, Barrera G, Dianzani MU. 4-hydroxynonenal as a biological signal: molecular basis and pathophysiological implications. *Antioxid Redox Signal* 1999; 1: 255-284

[347]-Rahman I, Van Shadewijk AA, Crowther A, *et al.* 4-hydroxy-2-nonenal, a specific lipid peroxidation product is elevated in lungs of patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166: 490-495

[348]-Ochs-Balcom HM, Grant BJ, Mui P, *et al.* Oxidative stress and pulmonary function in the general population. *Am J Epidemiol* 2005; 162:1137-1145

[349]-Pignatelli B, Li CQ, Boffetta P, *et al.* Nitrated and oxidized plasma proteins in smokers and lung cancer patients. *Cancer Res* 2001; 61:778-784

[350]-Petruzzeli S, Puntoni R, Mimotti P, *et al.* Plasma 3-nitrotyrosine in cigarette smokers. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156: 1902-1907

[351]- Eleni G Tzortzaki, Katerina Dimakou, Eirini Neofytou; Kyriaki Tsikritsaki, Katerina

- Samara, Maria Avgousti, *et al.* Oxidative DNA damage and somatic mutations. A link to the molecular pathogenesis of chronic inflammatory airway disease. *Chest* 2012; 141 (5): 1243-1250
- [352]-Valdes A M, Andrew T, Gardner JP, *et al.* Obesity, cigarette smoking, and telomere length in women. *Lancet* 2005; 366: 662-664
- [353]-M. Morlà, X Busquets, J. Pons, J. Salueda, W. MacNee and AGN Agusti. Telomere shortening in smokers with and without COPD. *Eur Resp J* 2006; 27: 525-528
- [354]-Amsellem V, Gary-Bobo G, Marcos E, Maitre B, Chaar V, *et al.* Telomere dysfunction causes sustained inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2011; 184 (12): 1358-1366
- [355]-Rahman I, Swarska R, Henry M, *et al.* Is there any relationship between plasma antioxidant capacity and lung function in smokers and in patients with chronic obstructive pulmonary disease? *Thorax* 2000; 55: 189-193
- [356]-Wei W, Kim Y, Boudreau N. Association of smoking with serum and dietary levels of antioxidants in adults: NHANES III, 1988-1994. *Am J Public Health* 2001; 91: 258-264
- [357]-Lykkesfeldt J, Christen S, Wallock LM, *et al.* Ascorbate is depleted by smoking and repleted by moderate supplementation: a study in male smokers and nonsmokers with matched dietary antioxidant intakes. *Am J Clin Nutr* 2000; 71: 530-536
- [358]-Schechtman G, Byrd JC, Gruchow HW. The influence of smoking on vitamin C status in adults. *Am J Public Health* 1989; 79:158-162
- [359]-Marangon K, Herbeth B, Lecomte E, *et al.* Diet, antioxidant status and smoking habits in French men. *Am J Clin Nutr* 1998; 67: 231-239
- [360]-Francina R Baldrick, J. Stuart Elborn, Jaine V Woodside, *et al.* Effect of fruit and vegetable intake on oxidative stress and inflammation in COPD: a randomized controlled trial. *Eur Resp J* 2012; 39: 1377-1384
- [361]-Moriarty SE, Shah JH, Lynn M, *et al.* Oxidation of glutathione and cysteine in human plasma associated with smoking. *Free Radic Biol Med* 2003; 35:1582-1588

- [362]-Friedman G D, Siegelaub AB, Seltzer CC, Feldman R, Collen MF. Smoking habits and leucocyte count. *Arch Environ Health* 1974; 29: 26-137
- [363]-Tell GS, Grimm RH, Vellar OD, Theodorsen L. The relationship of white cell count, platelet count, and hematocrit to cigarette smoking in adolescents: the Oslo Youth Study. *Circulation* 1985; 72: 971-974
- [364]-Zalokar JB, Richard JL, Claude JR, Pharm D. Leucocyte count, smoking and myocardial infarction. *N Engl J Med* 1981; 304:465-468
- [365]- Lampe JW, Stepaniants SB, Mao M, Radich JP, Dai H, Linsley PS, Friend SH, Potter JD. Signatures of environmental exposures using peripheral leucocyte gene expression: Tobacco smoke. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004; 13: 445-453
- [366]-Cosio MG, Saetta M, Agusti A. Immunologic aspects of chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2009; 360:2445-2454
- [367]-Qi Gan W, Man P, Sin DD. The interactions between cigarette smoking and reduced lung function on systemic inflammation. *Chest* 2005; 127:558-564
- [368]-Qi Gan W, Man P, Senthilselvan A, Sin D. Association between chronic obstructive pulmonary disease and systemic inflammation: a systematic review and a meta-analysis. *Thorax* 2004; 59: 574-580
- [369]-van Eeden SF, Hogg JC. The response of human bone marrow to chronic cigarette smoking. *Eur Respir J* 2000; 15:915-921
- [370]-Dash S, Sen S, Behera D. High neutrophil myeloperoxidase activity in smokers. *Blood* 1991; 77: 1619
- [371]-Elizabeth Sapey, James A. Stockley, Hannah Greenwood, Ali Ahmad, Darren Bailey, Janet M. Lord, *et al.* Behavioral and structural differences in migrating peripheral neutrophils from patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2011; 183: 1176-1186
- [372]-Ferson M, Edwards A, Lind A, Milton GW, Hersey P. Low natural Killer-cell activity and Immunoglobulin levels associated with smoking in human subjects. *Int J Cancer* 1979; 23: 603-609
- [373]-Tollerud DJ, Clark JW, Brown LM, *et al.* Association of cigarette smoking with decreased numbers of circulating natural killer cells. *Am Rev Respir Dis* 1989;

139:194-198

- [374]-Hughes DA, Haslam PL, Townsend PJ *et al.* Numerical and functional alterations in circulatory lymphocytes in cigarette smokers. *Clin Exp Immunol* 1985; 61: 459-466
- [375]-Tollerud DJ, Clark JW, Brown LM, *et al.* The effects of cigarette smoking on T cell subsets: a population based survey of healthy Caucasians. *Am Rev Respir Dis* 1989; 139:1446-1451
- [376]-Glader P, von Wachenfeldt K, Lofdahl CG. Systemic CD4+ T-cell activation is correlated with FEV<sub>1</sub> in smokers. *Respir Med* 2006; 100:1088-1093
- [377]-Koch A, Gaczkowski M, Sturton G, Staib P, Shinkothe T, Klein E, Rubbert A, *et al.* Modification of surface antigens in blood CD8+ T-lymphocytes in COPD: effects of smoking. *Eur Respir J* 2007; 29: 42-50
- [378]-Xuehai Zhu, Aneal S Gadgil, Rachel Givelber, M Patricia George, Michel W Stoner, *et al.* Peripheral T cell functions correlate with severity of chronic obstructive pulmonary disease. *Journal of Immunology* 2009; 182: 3270-3277
- [379]-Barceló B, Pons A, Fuster J, Salueda A, Noguera J, Ferrer M, Agusti AG. Intracellular cytokine profile of T lymphocytes in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Exp Immunol* 2006;145:474-479
- [380]-Barczyk A, W. Pierzchaia, O M Kon, B Cosio, IM Adcock, PJ Barnes. Cytokine production by bronchoalveolar lavage T lymphocytes in chronic obstructive pulmonary disease. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117:1484-1492
- [381]-Kim WD, WS Kim, Y Koh, SD Lee, CM Lim, DS Kim, Y J Cho. Abnormal peripheral blood T-lymphocyte subsets in a subgroup of patients with COPD. *Chest* 2002; 122: 437-444
- [382]-Lambert C, J McCue, M Portas, Y Ouyang, J Li, TG Rosano, A Lazis, BM Freed. Acrolein in cigarette smoke inhibits T-cell responses. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 116:916-922
- [383]-Sopori M. Effects of cigarette smoke on the immune system. *Nat Rev Immunol* 2002; 2: 372-376
- [384]-Corry-Anke Brandsma, Huib AM Kerstjens, Wouter H van Geffen, *et al.* Differentia switching to Ig G and Ig A in active smoking COPD patients and healthy

- controls. *Eur Respir J* 2012; 40: 313-321
- [385]-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
- [386]-Gosman MM, Willemse BW, Jansen DF, *et al.* Increased number of B-cells in bronchial biopsies in COPD. *Eur Respir J* 2006; 27: 60-64
- [387]-Arnson Y, Shoenfeld Y, Amital H. Effects of tobacco smoke on immunity, inflammation and autoimmunity. *J Autoimmun* 2010; 34: 1258-1265
- [388]-Sugiyama D, Nishimura K, Tamaki K, *et al.* Impact of smoking as a risk factor for developing rheumatoid arthritis: a meta-analysis of observational studies. *Ann Rheum Dis* 2010; 69: 70-81
- [389]-Costenbader KH, Kim DJ, Peerzada J, *et al.* Cigarette smoking and the risk of systemic lupus erythematosus. A meta-analysis. *Arthritis Rheum* 2004; 50:849-857
- [390]-Parikh-Patel A, Gold EB, Worman H, *et al.* Risk factors for primary biliary cirrhosis in a cohort of patients from the United States. *Hepatology* 2001; 33:16-21
- [391]-Handel AE, Williamson AJ, Di Santo J, *et al.* Smoking and multiple sclerosis: an update meta-analysis. *PLoS One* 2011; 6:e16149
- [392]-Hemminki K, Liu X, Ji J, *et al.* Subsequent COPD and lung cancer in patients with autoimmune disease. *Eur Respir J* 2011; 37: 463-465
- [393]-Lim HW, Hillsamer P, Banham AH, Kim CH. Cutting the edge: direct suppression of B cells by CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* 2005; 175:4180-4183
- [394]-Lim HW, Hillsamer P, Kim CH. Regulatory T cells can migrate to follicles upon T cell activation and suppress GC-Th cells and GC-Th cell driven B cells responses. *J Clin Invest* 2004; 114: 1640-1649
- [395]-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: 567-569
- [396]- Smyth LJ, Starkey C, Vestbo J, Singh D. CD4-regulatory cells in COPD patients. *Chest* 2007; 132:156-163
- [397]-Barceló B, Pons J, Ferrer JM, Salueda J, Fuster A, Agustí AGN. Phenotypic characterisation of T-lymphocytes in COPD: abnormal CD4+CD25+ regulatory T-lymphocyte response to tobacco smoking. *Eur Respir J* 2008; 31: 555-562

- [398]-Isajevs S, Taivans I, Strazda G, Kopeika U, Bukovskis M, Gordjusina V, *et al.* Decreased FOXP3 expression in small airways of smokers with COPD. *Eur Respir J* 2009; 33:61-67
- [399]-Corry-Anke Brandsma, Machteld N Hylkema, Marie Geerlings, Wouter H van Geffen, Dirkje S Postma, Wim Timens, Huib AM Kerstjens. Increased levels of (class switched) memory B cell in peripheral blood of current smokers. *Respiratory Research* 2009; 10:108
- [400]-Bazzano LA, He J, Muntner P, *et al.* Relationship between cigarette smoking and novel risk factors for cardiovascular disease in the United States. *Ann Intern Med* 2003; 138: 891-897
- [401]-Bermudez EA, Rafai N, Buring JE, *et al.* Relation between markers of systemic vascular inflammation and smoking in women. *Am J Cardiol* 2002; 89:1117-1119
- [402]-Frohlich M, Sund M, Frolich M, *et al.* Independent association of various smoking characteristics with markers of systemic inflammation in men: results from a representative sample of the general population (MONICA Augsburg Survey 1994 / 95). *Eur Heart J* 2003; 24: 1365-1372
- [403]-Wannamethee SG, Lowe GD, Shaper AG, *et al.* Associations between cigarette smoking, pipe/cigar smoking and smoking cessation, and haemostatic and inflammatory markers for cardiovascular disease. *Eur Heart J* 2005; 26: 1765-1773
- [404]-Kannel W B, D' Agostino R B, Belanger AJ. Fibrinogen, cigarette smoking and risk of cardiovascular disease: insights from the Framingham study. *Am Heart J* 1987; 113: 1006-1010
- [405]-Gan W Q, Man S F, Sin DD. The interactions between cigarette smoking and reduced lung function on systemic inflammation. *Chest* 2005; 127: 558-564
- [406]-Engstrom G, Lind P, Hedblad B, *et al.* Lung function and cardiovascular risk: relationship with inflammation-sensitive plasma proteins. *Circulation* 2002; 106: 2555-2560
- [407]-Lind P, Engstrom G, Stavenow L, *et al.* Risk of myocardial infarction and stroke in smokers is related to plasma levels of inflammation-sensitive proteins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24: 577-582
- [408]-Bermudez EA, Rafai N, Buring JE, *et al.* Relation between markers of systemic

- vascular inflammation and smoking in women. *Am J Cardiol* 2002; 89: 1117- 1119
- [409]-Ridker PM, Rifai N, Stampfer MJ, *et al.* Plasma concentration of interleukin-6 and the risk of future myocardial infarction among apparently healthy men. *Circulation* 2000; 101: 1767-1772
- [410]-Cesari M, Penninx BW, Newman AB, *et al.* Inflammatory markers and onset of cardiovascular events: results from the Health ABC Study. *Circulation* 2003; 108: 2317-2322
- [411]- Yusuf S, Hawken S, Ounpuu S, Dans T, Avezum A, Lanas F, *et al.* Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet* 2004; 364: 937-952
- [412]-Szmitko P E, Wang C H, Weisel R D, *et al.* New markers of inflammation and endothelial cell activation: part I. *Circulation* 2003; 108: 1917-1923
- [413]-Node K, Kitakazi M, Yoshikawa H, *et al.* Reversible reduction in plasma concentration of nitric oxide induced by cigarette smoking in young adults. *Am J Cardiol* 1997; 79: 1538-1541
- [414]-Yarnell JWG, Sweetnam PM, Rumley A, Lowe GDO. Lifestyle and hemostatic risk factors for ischaemic heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 271-279
- [415]-Simpson AJ, Gray RS, Moore NR, Booth NA. The effects of smoking on the fibrinolytic potential of plasma and platelets. *Br J Haematol* 1997; 97: 208-213
- [416]-Newby DE, Wright RA, Labinjoh C, Ludlam CA, Fox KA, *et al.* Endothelial dysfunction, impaired endogenous fibrinolysis, and cigarette smoking: a mechanism for arterial thrombosis and myocardial infarction. *Circulation* 1999; 99: 1411-1415
- [417]-Johansson L, Jansson JH, Boman K, Nilsson TK, Stegmayr B, *et al.* t-PA-PAI-1 complex as a risk factor for the development of a first stroke. *Stroke* 2000; 31: 26-32
- [418]-Killewich LA, Gardner AW, Macko RF, Hanna DJ, Goldberg AP, *et al.* Progressive intermittent claudication is associated with impaired fibrinolysis. *J Vasc Surg* 1998; 27: 645-650

- [419]-Yamaguchi Y, Haginaka J, Morimoto S, *et al.* Facilitated nitration and oxidation of LDL in cigarette smokers. *Eur J Clin Invest* 2005; 35: 186-193
- [420]-Weber C, Erl W, Weber K, Weber PC. Increased adhesiveness of isolated monocytes to endothelium is prevented by vitamin C intake in smokers. *Circulation* 1996; 93: 1488-1492
- [421]-Harding S A, Sarma J, Josephs D H, *et al.* Upregulation of the CD40/CD40 ligand dyad and platelet-monocyte aggregation in cigarette smokers. *Circulation* 2004; 109:1926-1929
- [422]-Woodward M, Rumley A, Tunstall-Pedoe H, *et al.* Associations of blood rheology and interleukin-6 with cardiovascular risk factors and prevalent cardiovascular disease. *Br J Haematol* 1999; 104:246-257
- [423]-Regina R, Annette P, Natalie K, Mariarita A, Wolfgang K, *et al.* Determinants of the acute-phase protein C reactive protein in myocardial infarction survivors: the role of comorbidities and environmental factors. *Clinical Chemistry* 2009; 55: 322-335
- [424]-Lowe GD, Yarnell JWG, Rumley A, Bainton D, *et al.* C reactive protein, fibrin D-dimer, and incident ischemic heart disease in the Speedwell Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21: 603-610.
- [425]-Smith MR, Kinmonth AL, Luben RN, Bingham S, *et al.* Smoking status and differential white cell counts in men and women in the EPIC-Norfolk population. *Atherosclerosis* 2003; 169: 331-337
- [426]-Yarnell JWG. Smoking and cardiovascular disease. *Q J Med* 1996; 89: 493-498
- [427]-Wannamethee SG, Shaper AG, Whincup PH, Walker M. Smoking cessation and the risk of stroke in middle-aged men. *JAMA* 1995; 274: 155-160
- [428]-Dobson AJ, Alexander HM, Heller RF, Loyd DM. How soon after quitting smoking does the risk of heart attack decline? *J Clin Epidemiol* 1991; 44: 1247-1253
- [429]-Negri E, La Vecchia C, D'Avanzo B, Nobilli A, La Malfa RG. Acute myocardial infarction: association with time since stopping smoking in Italy. *J Clin Epidemiol* 1991; 44: 1247-1253
- [430]-Reichert V, Xiangying X, Bartscherer D, Jacobsen D, Fardellone C, *et al.* A pilot study to examine the effects of smoking cessation on serum markers of inflammation in women at risk for cardiovascular disease. *Chest* 2009; 136: 212-

- [431]-Kenfield SA, Stampfer MJ, Rosner BA, *et al.* Smoking and smoking cessation in relation to mortality in women. *JAMA* 2008; 299: 2037-2047
- [432]-Willemsse BWM, ten Hacken NHT, Rutgers B, Lesman-Leegte IG, Timens W, Postma DS. Smoking cessation improves both direct and indirect airway hyperresponsiveness in COPD. *Eur Respir J* 2004; 24 (3): 391-396
- [433]-Wright JL, Hobson JE, Wiggs B, Pare PD, Hogg JC. Airway inflammation and peribronchiolar attachments in the lungs of nonsmokers, current and ex-smokers. *Lung* 1988; 165 (5): 277-286
- [434]-Gamble E, Grootendorst DC, Hattotuwa K, *et al.* Airway mucosal inflammation in COPD is similar in smokers and ex-smokers: a pooled analysis. *Eur Respir J* 2007; 30 (3): 467-471
- [435]-Bhowmic A, Seemungal TAR, Sapsford RJ, Wedzicha JA. Relation of sputum inflammatory markers to symptoms and lung function changes in COPD exacerbations. *Thorax* 2000; 55 (2): 114-120
- [436]-Willemsse BWM, ten Hacken NHT, 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
- [437]-Miller M, Youn Cho J, Pham A, Friedman PJ, Ramsdell J, *et al.* Persistent airway inflammation and emphysema progression on CT scan in ex-smokers observed for 4 years. *Chest* 2011; 139 (6): 1380-1387
- [438]-Emiel F M Wouters. Local and systemic inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. *Proc. Am Thorac Soc* 2005; 2: 26-33
- [439]-Emiel FM Wouters, Karin H Groenewegen, Mieke A Dentener, Juanita HJ Vernooy. Systemic inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. The role of exacerbations. *Proc Am Thorac Soc* 2007; 4: 626-634
- [440]-Joaquim Gea, Esther Barreiro, Mauricio Orozco-Levi. Systemic Inflammation in COPD. *Clin Pulm Med* 2009; 16: 233-242
- [441]-MacNee W. Oxidative stress and chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir Mon* 2006; 38: 100-129
- [442]-van der Vliet A, O' Neill CA, Cross CE, *et al.* Determination of low molecular-mass antioxidant concentrations in human tract lining fluids. *Am J Physiol* 1999;

276: L289-296

- [443]-Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 2002; 82: 47-95
- [444]-Stadtman ER, Levine RL. Protein oxidation. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 899: 191-208
- [445]-Rubbo H, Radi R, Trujillo M, Telleri R, *et al.* Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives. *J Biol Chem* 1994; 269: 26066-26075
- [446]-Kaur H, Halliwell B. Evidence for nitric oxide-mediated oxidative damage in chronic inflammation: nitrotyrosine in serum and synovial fluid from rheumatoid patients. *FEBS Lett* 1994; 350:9-12
- [447]-Richter C, Park JW, Ames BN. Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 6465-6467
- [448]-Ledoux SP, Driggers WJ, Hollensworth BS, Wilson GL. Repair of alkylation and oxidative damage in mitochondrial DNA. *Mutat Res* 1999; 434:149-159
- [449]-Repine JE, Bast A, Lankhorst I, and the Oxidative Stress Study Group. Oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156: 341-357
- [450]-Babior BM, Lambeth JD, Nauseef W. The neutrophil NADPH oxidase. *Arch Biochem Biophys* 2002; 397: 342-344
- [451]-Goeptar AR, Scheerens H, Vermeulen NP. Oxygen and xenobiotic reductase activities of cytochrome P<sub>450</sub>. *Crit Rev Toxicol* 1995; 25: 25-65
- [452]-Coon MJ, Ding X, Pernecky SJ, Vaz. ADN. Cytochrome P<sub>450</sub>: Progress and predictions. *FASEB J* 1992; 6: 669-673
- [453]-Quinlan GJ, Lamb NJ, Tilley R, Evans TW, Gutteridge JM. Plasma hypoxanthine levels in ARDS: implications for oxidative stress, morbidity and mortality. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155:479-484
- [454]-Julio F Turrens. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* 2003; 552 (2): 335-344
- [455]-Imlay JA, Fridovich I. Assay of metabolic superoxide production in *Escherichia coli*. *J. Biol Chem* 1991; 266: 6957-6965
- [456]-Aust SD, Roerig DL, Pederson TC. Evidence for superoxide generation by

- NADPH-cytochrome c reductase of rat liver microsomes. *Biochem Biophys Res Commun* 1972; 47:1133-1137
- [457]-Boveris A. Mitochondrial generation of superoxide and hydrogen peroxide. *Adv Exp Med Biol* 1977; 78: 67-82
- [458]-Winterbourn CC, Vissers MC, Kettle AJ. Myeloperoxidase. *Curr Opin Hematol* 2000; 7: 53-58
- [459]-Albrich JM, McCarthy CA, Hurst JK. Biological reactivity of hypochlorous acid: implications for microbicidal mechanisms of leukocyte myeloperoxidase. *Proc. Natl Acad Sci USA* 1981; 78: 210-214
- [460]-Winterbourn CC. Hydroxyl radical production in body fluids. Roles of metal ions, ascorbate and superoxide. *Biochem J* 1981; 198:125-131
- [461]-Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. A pathway for the regulation of cell function and communication. *Biochem Pharmacol* 1989; 38: 1709-1715
- [462]-Tayeh MA, Marletta MA. Oxidation of L-arginine to nitric oxide, nitrite and nitrate: tetrahydrobiopterin is required as a cofactor. *J Biol Chem* 1989; 264: 19654-19658
- [463]-Stuehr DJ, Kwon NS, Nathan CF. FAD and GSH participate in macrophage synthesis of nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 168:558-565
- [464]-Garvey EP, Furfine ES, Sherman PA. Purification and inhibitor screening of human nitric oxide synthase isozymes. *Methods Enzymol* 1996; 268: 339-349
- [465]-Bredt DS, Hwang PM, Glatt CE, Lowenstein C, Reed RR, Snyder SH. Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P<sub>450</sub> reductase. *Nature* 1991; 351:714-718
- [466]-Adcock I M, Brown C R, Kwon O, Barnes PJ. Oxidative stress induces NF kappa B DNA binding and inducible NOS mRNA in human epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 199:1518-1524
- [467]-Aymerich MS, Bengoechea-Alonso MT, Lopez-Zabalza MJ, Santiago E, Lopez-Moratalla N. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in human monocytes triggered by beta -endorphin through an increase cAMP. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 245:717-721
- [468]-Melillo G, Taylor LS, Brooks A, Musso T, Cox GW, Varesio L. Functional requirement of the hypoxia-responsive element in the activation of the inducible

- nitric oxide synthase promoter by the iron chelate desferrioxamine. *J Biol Chem* 1997; 272: 12236-12243
- [469]-Gao JJ, Filla MB, Fultz MJ, Vogel SN, Russel SW, Murphy WJ. Autocrine/paracrine INF- $\alpha/\beta$  mediates lipopolysaccharide-induced activation of transcription factor Stat-1 $\alpha$  in mouse macrophages: pivotal role of Stat-1 $\alpha$  in induction of inducible nitric oxide synthase gene. *J Immunol* 1998; 161: 4803-4810
- [470]-Braun J S, Novak R, Gao G, Murray PJ, Shenep JL. Pneumolysin, a protein toxin of *Streptococcus pneumoniae*, induces nitric oxide production from macrophages. *Infect Immun* 1999; 67: 3750-3756
- [471]-Bogdan C, Rollinghoff M, Diefenbach A. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Curr Opin Immunol* 2000; 12:64-76
- [472]-Doyle M P, Hoekstra JW. Oxidation of nitrogen oxides by bound dioxygen in hemoproteins. *J Inorg Biochem* 1981; 14:351-358
- [473]-Wink DA, Kasprzak KS, Maragos CM, Elespuru RK, Misra M, Dunams TM, *et al.* DNA deamination ability and genotoxicity of nitric oxide and its progenitors. *Science* 1991; 254: 1001-1003
- [474]-Curran RD, Ferrari FK, Kispert PH, Stadler J, Stuehr DJ, Simmons RL, *et al.* Nitric oxide and nitric oxide-generating compounds inhibit hepatocyte protein synthesis. *FASEB J* 1991; 5: 2085-2092
- [475]-Kwon NS, Stuehr DJ, Nathan CF. Inhibition of tumor cell ribonucleotide reductase by macrophage-derived nitric oxide. *J Exp Med* 1991; 174: 761-767
- [476]-Pilz RB, Suhasini M, Idriss S, Meinkoth JL, Boss GR. Nitric oxide and cGMP analogs activate transcription from AP-1 responsive promoters in mammalian cells. *FASEB J* 1995; 9: 552-558
- [477]-Rubbo H, Radi R, Trujillo M, Telleri R, Kalyanaraman B, Barnes S, *et al.* Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives. *J Biol Chem* 1994; 269: 26066-26075
- [478]-Liu X, Miller MS, Joshi MS, Thomas DD, Lancaster JRJ. Accelerated reaction of nitric oxide with O<sub>2</sub> within the hydrophobic interior of biological membranes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 2175-2179

- [479]-MacMicking JD, North RJ, LaCourse R, Mudgett JS, Shah SK, et al. Identification of nitric oxide synthase as a protective locus against tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 5243-5248
- [480]-Uchida K, Shiraishi M, Naito Y, Torii N, Nakamura Y, Osawa T. Activation of stress signaling pathways by the end product of lipid peroxidation. *J Biol Chem* 1999; 274: 2234-2242
- [481]-Hageman JJ, Bast A, Vermeulen NPE. Monitoring of oxidative free radicals damage *in vivo*: analytical aspects. *Chem Biol Interact* 1992; 82: 243-293
- [482]-Montuschi P, Barnes PJ, Roberts LJ. Isoprostanes: markers and mediators of oxidative stress. *FASEB J* 2004; 18 (15): 1791-800
- [483]-Ko FWS, Lau CYK, Leung TF, Wong GWK, Lam CWK, Hui DSC. Exhaled breath condensate levels of 8-isoprostane, growth related oncogene alpha and monocyte chemoattractant protein-1 in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Med* 2006; 100: 630-638
- [484]-Biernacki WA, Kharitonov SA, Barnes PJ. Increased leukotriene B4 and 8-isoprostane in exhaled breath condensate of patients with exacerbations of COPD. *Thorax* 2003; 58: 294-298
- [485]-Janssen LJ, Catalli A, Helli P. The pulmonary biology of isoprostanes. *Antioxid Redox Signal* 2005; 7: 244-255
- [486]-Petersen DR, Doorn JA. Reactions of 4-hydroxynonenal with proteins and cellular targets. *Free Radic Biol Med* 2004; 37: 937-945
- [487]-Liu W, Akhand AA, Kato M, et al. 4-Hydroxynonenal triggers an epidermal growth factor receptor-linked signal pathway for growth inhibition. *J Cell Sci* 1999; 112: 2409-2417
- [488]-Rahman I, MacNee W. Role of transcription factors in inflammatory lung diseases. *Thorax* 1998; 53: 601-612
- [489]-Rahman I, van Schadewijk AAM, Crowther AJL, Hiemstra PS, Stolk J, MacNee W, de Boer WI. 4-hydroxynonenal, a specific lipid peroxidation product, is elevated in lungs of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166: 490-495

- [490]-Aoshiba K, Koinuma M, Yokohori N, Nagai A. Immunohistochemical evaluation of oxidative stress in murine lungs after cigarette smoke exposure. *Inhal Toxicol* 2003; 15: 1029-1038
- [491]-Arumugan N, Sivakumar V, Thanislass J, Pillai KS, *et al.* Acute pulmonary toxicity of acrolein in rats-underlying mechanism. *Toxicol Letts* 1999; 104: 189-194
- [492]-Cho HY, Reddy SP, Kleeberger SR. Nrf2 defends the lung from oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* 2006; 8: 76-78
- [493]-Kehrer JP, Biswal S S. The molecular effects of acrolein. *Toxicol Sci* 2000; 57: 6-11
- [494]-Rangasamy T, Cho CY, Thimmulappa RK, *et al.* Genetic ablation of Nrf2 enhances susceptibility to cigarette smoke-induced emphysema in mice. *J Clin Invest* 2004; 114: 1248-1259
- [495]-Taylor JC, Madison R, Kosinska D. Is antioxidant deficiency related to chronic obstructive pulmonary disease? *Am Rev Respir Dis* 1986; 134: 285-289
- [496]-Rahman I, MacNee W. Regulation of redox glutathione levels and gene transcription in lung inflammation: therapeutic approaches. *Free Radic Biol Med* 2000; 28: 1405-1420
- [497]-Arner ES, Holmgren A. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Eur J Biochem* 2000; 267: 6102-6109
- [498]-Crapo JD, Tierney DF. Superoxide dismutase and pulmonary oxygen toxicity. *Am J Physiol* 1974; 226:1401- 1407
- [499]-Marklund SL. Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; 79: 7634-7638
- [500]-Weisiger RA, Fridovich I. Mitochondrial superoxide dismutase: site of synthesis and intramitochondrial localization. *J Biol Chem* 1973; 248: 4793-4796
- [501]-Kinnula VL, Crapo JD, Raivio KO. Generation and disposal of reactive oxygen metabolites in the lung. *Lab Invest* 1995; 73:3-19
- [502]-Lakari E, Paakko P, Kinnula VL. Manganese superoxide dismutase, but not CuZn superoxide dismutase, is highly expressed in the granulomas of pulmonary sarcoidosis and extrinsic allergic alveolitis. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158:

589-596

- [503]-Lakari E, Paakko P, Kinnula VL. Manganese superoxide dismutase, but not CuZn superoxide dismutase, is highly expressed in the granulomas of pulmonary sarcoidosis and extrinsic allergic alveolitis. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158: 589-596
- [504]-Lakari E, Paakko P, Pietarinen-Runtti P, Kinnula VL. Manganese superoxide dismutase and catalase are coordinately expressed in the alveolar region in chronic interstitial pneumonias and granulomatous diseases of the lung. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161:615-621
- [505]-Kinnula VL, Crapo JD. Superoxide dismutases in the lung and human lung diseases. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167: 1600-1619
- [506]-Crapo JD, Stamler JS. Signaling by nonreceptor surface-mediated redox-active biomolecules. *J Clin Invest* 1994; 93: 2304
- [507]-Deneke SM, Fanburg BL. Regulation of cellular glutathione. *Am J Physiol* 1989; 257: L163-L173
- [508]-Brown LAS. Glutathione protects signal transduction in type II cells under oxidant stress. *Am J Physiol* 1994; 266: L172-L177
- [509]-Evans MD, Church DF, Pryor WA. Aqueous cigarette tar extracts damage human  $\alpha$ -1-proteinase inhibitor. *Chem Biol Interact* 1991; 79: 151-164
- [510]-Li XY, Donaldson K, Rahman I, MacNee W. An investigation of the role of glutathione in the increased permeability induced by cigarette smoke *in vivo* and *in vitro*. *Am Rev Respir Crit Care Med* 1994; 149: 1518-1525
- [511]-van Klaveren RJ, Demedts M, Nemery B. Cellular glutathione turnover *in vitro*, with emphasis on type II pneumocytes. *Eur Respir J* 1997; 10:1392-1400
- [512]-Morrison D, Rahman I, Lannan S, MacNee W. Epithelial permeability, inflammation and oxidant status in the airspaces of chronic smokers. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159: 1-8
- [513]-Meister A, Anderson ME. Glutathione. *Ann Rev Biochem* 1983; 52: 711-760
- [514]-Huang CS, Chang LS, Anderson ME, Meister A. Catalytic and regulatory properties of the heavy subunit of rat kidney  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase. *J Biol*

*Chem* 1993; 268:19675-19680

- [515]-Moellering D, McAndrew J, Patel RP, *et al.* Nitric oxide-dependent induction of glutathione synthesis through increased expression of  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase. *Arch Biochem Biophys* 1998; 358: 74-82
- [516]-Li H, Marshall ZM, Whorton AR. Stimulation of cysteine uptake by nitric oxide: regulation of endothelial cell glutathione levels. *Am J Physiol* 1999; 276: C801-C811
- [517]-Gomes EC, Stone V, Florida-James G. Impact of heat and pollution on oxidative stress and CC16 secretion after 8 Km run. *Eur J Appl Physiol* 2011; 111 (9): 2089-2097
- [518]-Carter AB, Tephyl LA, Venkataraman S, *et al.* High levels of catalase and glutathione peroxidase activity dampen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> signaling in human alveolar macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004; 31: 43-53
- [519]-Inomata T, Betsuyaku T, Odajima N, Yoshida T, Moriyama C, *et al.* The role of catalase in cigarette smoke-induced pulmonary inflammation and emphysema in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 2010; 181: A2685
- [520]-Gromer S, Urig S, Becker K. The thioredoxine system-from science to clinic. *Med Res Rev* 2004; 24: 40-89
- [521]-Kinnula VL, Lehtonen S, Kaarteenaho-Wiik R, *et al.* Cell specific expression of peroxiredoxins in human lung and pulmonary sarcoidosis. *Thorax* 2002; 57: 157-164
- [522]-van Acker SA, Koymans LM, Bast A. Molecular pharmacology of vitamin E: structural aspects of antioxidant activity. *Free Radic Biol Med* 1993; 15: 311-328
- [523]-Yoshida T, Tuder MR. Pathobiology of cigarette smoke-induced chronic obstructive pulmonary disease. *Physiol Rev* 2007; 87: 1047-1082
- [524]-Caramori G, Romagnoli M, Casolari P, Bellettato C, Casoni G, *et al.* Mucin expression in peripheral airways of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Histopathology* 2004; 45: 477-484
- [525]-Morten D, Russell PB, Klaus J, James DC, Levy S, *et al.* Superoxide dismutase 3 polymorphism associated with reduced lung function in two large populations. *Am*

*J Respir Crit Care Med* 2008; 178: 906-912

- [526]-Malhotra D, Thimmulappa R, Navas-Acien A, Sandford A, *et al.* Decline in NRF2-regulated antioxidants in chronic obstructive pulmonary disease lungs due to loss of its positive regulator, DJ-1. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 178: 592-604
- [527]-MacNee W. Oxidative stress and lung inflammation in airway disease. *Eur J Pharmacol* 2001; 429: 195-207
- [528]-Park HS, Kim SR, Lee YC. Impact of oxidative stress on lung diseases. *Respirology* 2009; 14 (1): 27-38
- [529]-Thompson AB, Bohling T, Heires A, Linder J, Rennard SI. Lower respiratory tract iron burden is increased in association with cigarette smokers. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 150: 690-695
- [530]-Greening AP, Lowrie DB. Extracellular release of hydrogen peroxide by human alveolar macrophages: the relationship to cigarette smoking and lower respiratory tract infections. *Clin Sci* 1983; 65: 661-664
- [531]-MacNee W, Wiggs B, Belzberg AS, Hogg JC. The effect of cigarette-smoking on neutrophil kinetics in human lungs. *N Engl J Med* 1989; 321: 435-439
- [532]-Brown D, Brown G, Williams JH, MacNee W. Priming of neutrophils sequestered in pulmonary vasculature in acute alveolitis. *Am Rev Respir Dis* 1993; 144: 668
- [533]-Rahman I, Morrison D, Donaldson K, MacNee W. Systemic oxidative stress in asthma, COPD, and smokers. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154: 1055-1060
- [534]-Gompertz S, Bayley DL, Hill SL, Stockley RA. Relationship between airway inflammation and the frequency of exacerbations in patients with smoking related COPD. *Thorax* 2001; 56: 36-41
- [535]-Schunemann HJ, Muti P, Freudenheim JL, Armstrong D, Browne R, *et al.* Oxidative stress and lung function. *Am J Epidemiol* 1997; 146: 939-948
- [536]-Mateos F, Brock JF, Perez-Arellano JL. Iron metabolism in the lower respiratory tract. *Thorax* 1998; 53: 594-600
- [537]-Wallaert B, Gressier B, Marquette CH, *et al.* Inactivation of alpha1- proteinase inhibitor by alveolar inflammatory cells from smoking patients with or without emphysema. *Am Rev Respir Dis* 1993; 147: 1537-1543

- [538]-Riise GT, Ahlstedt S, Larsson S, Enander I, Jones I, Larsson P, Andersson B. Bronchial inflammation in chronic bronchitis assessed by measure of cell products in bronchial lavage fluid. *Thorax* 1995; 50: 360-365
- [539]-Lebowitz MD, Postma DS. Adverse effects of eosinophilic and smoking on the natural history of newly diagnosed chronic bronchitis. *Chest* 1995; 108: 55-61
- [540]-Balzano G, Stefanelli F, Iorio C, *et al.* Eosinophilic inflammation in stable chronic obstructive pulmonary disease. Relationship with neutrophils and airway function. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160: 1486-1492
- [541]-Lams BE, Sousa AR, Rees PJ, *et al.* Subepithelial immunopathology of the large airways in smokers with and without chronic obstructive pulmonary disease. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 92: 537-548
- [542]-Balzano G, Stefanelli F, Iorio C, *et al.* Eosinophilic inflammation in stable chronic obstructive pulmonary disease. Relationship with neutrophils and airway function. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160: 1486-1492
- [543]-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
- [544]-Barnes NC. Inhaled steroids in COPD. *Lancet* 1998; 351: 766-767
- [545]-Saha S, Brightling CE. Eosinophilic airway inflammation in COPD. *Int J COPD* 2006; (1): 39-47
- [546]-Gibson PG, Dolovich J, Denburg J, *et al.* Chronic cough: eosinophilic bronchitis without asthma. *Lancet* 1989; 1: 1346-1348
- [547]-Brightling CE, Woltmann G, Wardlaw AJ, *et al.* Development of irreversible airflow obstruction in a patient with eosinophilic bronchitis without asthma. *Eur Respir J* 1999; 14: 1228-1230
- [548]-Birring SS, Brightling CE, Bradding P, *et al.* Clinical, radiological and induced sputum features of chronic obstructive pulmonary disease in nonsmokers: a descriptive study. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166: 1078-1083
- [549]-Berry MA, Hargadon B, McKenna S, *et al.* Observational study of the natural history of eosinophilic bronchitis. *Clin Exp Allergy* 2005; 35: 598-601
- [550]-Alvar Agustí. Systemic effects of chronic obstructive pulmonary disease. What we know and what we don't know (but should). *Proc Am Thorac Soc* 2007; 4: 522-525

- [551]-Wouters EF, Reynaert NL, Dentener MA, Vernooy JH. Systemic inflammation in asthma and chronic obstructive pulmonary disease: is there a connection? *Proc Am Thorac Soc* 2009; 6: 638-647
- [552]-MacNee W. Pulmonary and systemic oxidant/antioxidant imbalance in chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* 2005; 2:50-60
- [553]-MacNee W. Pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* 2005; 2 (4): 258-266
- [554]-Barnes PJ, Shapiro SD, Pauwels RA. Chronic obstructive pulmonary disease: molecular and cellular mechanisms. *Eur Respir J* 2003; 22 (4): 672-688
- [555]-Rahman I, Adcock IM. Oxidative stress and redox regulation of lung inflammation. *Eur Respir J* 2006; 28: 219-242
- [556]-Rajendrasozhan S, Yang SR, Edirisinghe I, Yao H, Adenuga D, Rahman I. Deacetylases and NF-kappa B in redox regulation of cigarette smoke-induced lung inflammation: epigenetics in pathogenesis of COPD. *Antioxid Redox Signal* 2008; 10 (4): 799-811
- [557]-Di Stefano A, Caramon G, Oates T, Capelli A, Lusuardi M, *et al.* Increased expression of nuclear factor-kB in bronchial biopsies from smokers and patients with COPD. *Eur Respir J* 2002; 20:556-563
- [558]-Torres SH, Ling H, Garcia E, Musi N, Montes de Oca M. Elevated NF-kB signaling in skeletal muscle from subjects with COPD. *Am J Respir Crit Care Med* 2010; 181: A-1011
- [559]-Kang-Yun Lee, Shu-Chuan Ho, Yao-Fei Chan, Chun-Hua Wang, *et al.* Reduced nuclear factor-k $\beta$  repressing factor: a link toward systemic inflammation in COPD. *Eur Respir J* 2012; 40: 863-873
- [560]-Barnes PJ, Adcock IM, Ito K. Histone acetylation and deacetylation: importance in inflammatory lung diseases. *Eur Respir J* 2005; 25: 552-563
- [561]-Ruijter AJM, Gennip AH, Caron HN, Kemp S, Kuilenburg ABP. Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem J* 2003; 370:737-749
- [562]-Sambucetti LC, Fischer DD, Zabludoff S, *et al.* Histone deacetylase inhibition

selectively alters the activity and expression of cell cycle proteins leading to specific chromatin acetylation and antiproliferative effects. *J Biol Chem* 1999; 274:34940-34947

[563]-Ito K, Lim G, Caramon G, Chung KF, Barnes PJ, Adcock IM. Cigarette smoking reduces histone deacetylase 2 expression, enhances cytokine expression, and inhibits glucocorticoid actions in alveolar macrophages. *FASEB J* 2001; 15:1110-1112

[564]-Patryk Szulakowski, Ann J L Crowther, Luis A Jiménez, Kenneth Donaldson, *et al.* The effect of smoking on the transcriptional regulation of lung inflammation in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care* 2006; 174: 41-50

[565]-Rutgers SR, Postma DS, ten Hacken NH, Kauffman HF, *et al.* Ongoing airway inflammation in patients with COPD who do not currently smoke. *Thorax* 2000; 55: 12-18

[566]-Ito K, Ito M, Elliott WM, Cosio B, Caramori G, Kon OM, *et al.* Decreased histone deacetylase activity in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2005; 352: 1967-1976

[567]-Ito Ki, Lim S, Caramori G, Chung KF, Barnes PJ, Adcock IM. Cigarette smoking reduces histone deacetylase-2 expression, enhances cytokine expression and inhibits glucocorticoid actions in alveolar macrophages. *FASEB J* 2001; 15: 1110-1112

[568]-Barnes PJ, Ito K, Adcock IM. Corticosteroid resistance in chronic obstructive pulmonary disease: inactivation of histone deacetylase. *Lancet* 2004; 363 (9410): 731-733

[569]-Kyriakis JM, Avruch J. Mammalian mitogen-activated protein kinase transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev* 2001; 81: 807-809

[570]-Chung KF. P38 Mitogen - Activated protein kinase pathways in asthma and COPD. *Chest* 2011; 139 (6): 1470-1479

[571]-Carter AB, Knudtson KL, Monick MM, Hunninghake GW. The p38 mitogen-activated protein kinase required for NF- $\kappa$ B-dependent gene expression: The role of TATA-binding protein (TBP). *J Biol Chem* 1999; 274: 30858-30863

[572]-Boulton TG, Nye SH, Robbins DJ, *et al.* ERKs: a family of protein-

- serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell* 1991; 65:663-675
- [573]-Vicent S, Garayoa M, Lopez-Picazo JM, *et al.* Mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 is overexpressed in non-small cell lung cancer and is an independent predictor of outcome in patients. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 3639-3649
- [574]-Sebolt-Leopold JS, Dudley DT, Herrera R, *et al.* Blockade of the MAP kinase pathway suppresses growth of colon tumors in vivo. *Nat Med* 1999; 5: 810-816
- [575]-Han SW, Hwang PG, Chung DH, *et al.* Epidermal growth factor receptor (EGFR) downstream molecules as response predictive markers for gefitinib (Iressa, ZD 1839) in chemotherapy –resistant non-small lung cancer. *Int J Cancer* 2005; 113: 109-115
- [576]-Tournier C, Hess P, Yang DD, *et al.* Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c – mediated death pathway. *Science* 2000; 288:870-874
- [577]-Angel P, Karim M. The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell – proliferation and transformation. *Biochim Biophys Acta* 1991; 1072:129-157
- [578]-Dong C, Yang DD, Wysk M, *et al.* Defective T cell differentiation in the absence of Jnk1. *Science* 1998; 282: 2092-2095
- [579]-Dong C, Yang DD, Tournier C, *et al.* JNK is required for effector T-cell function but not for T-cell activation. *Nature* 2000; 405: 91-94
- [580]-Smith SJ, Fenwick PS, Nicholson AG, *et al.* Inhibitory effect of p38 mitogen-activated protein kinase inhibitors on cytokine release from human macrophages. *Br J Pharmacol* 2006; 149: 393-404
- [581]-Smith SJ, Fenwick PS, Nicholson AG, *et al.* Inhibitory effect of p38 mitogen-activated protein kinase inhibitors on cytokine release from human macrophages. *Br J Pharmacol* 2006; 149: 393-404
- [582]-Salvador JM, Mittelstadt PR, Guszczynski T, *et al.* Alternative p38 activation pathway mediated by T cell receptor-proximal tyrosine kinases. *Nat Immunol* 2005; 6 (4): 390-395
- [583]-Adcock IM, Chung KF, Caramori G, Ito K. Kinase inhibitors and airway inflammation. *Eur J Pharmacol* 2006; 533: 118-132
- [584]-Mercer BA, Kolesnikova N, Sonett J, *et al.* Extracellular regulated kinase/mitogen activated protein kinase is up-regulated in pulmonary emphysema and mediates

- matrix metalloproteinase-1 induction by cigarette smoke. *J Biol Chem* 2004; 279: 17690-17696
- [585]-Tuyt LM, Dokter WH, Birkenkamp K, *et al.* Extracellular regulated kinase 1/2, Jun N-terminal kinase, and c-Jun are involved in NF- $\kappa$ B-dependent IL-6 expression in human monocytes. *J Immunol* 1999; 162:4893-4902
- [586]-Chen BC, Yu CC, Lei HC, *et al.* Bradykinin B2 receptor mediates NF- $\kappa$ B activation and cyclooxygenase-2 expression via the Ras/Raf-1/ERK pathway in human airway epithelial cells. *J Immunol* 2004; 173: 5219-5228
- [587]-Lemjabbar H, Li D, Gallup M, *et al.* Tobacco smoke-induced lung cell proliferation mediated by tumor necrosis factor alpha-converting enzyme and amphiregulin. *J Biol Chem* 2003; 278:26202-26207
- [588]-Gensch E, Gallup M, Sucher A, *et al.* Tobacco smoke control mucin production in lung cells requires oxygen radicals AP-1 and JNK. *J Biol Chem* 2004; 279: 39085-39093
- [589]-Renda T, Baraldo S, Pelaia G, Bazzan E, Turato A, *et al.* Increased activation of p38 MAPK in COPD. *Eur Respir J* 2008; 31: 62-69
- [590]-Neeper M, Schmidt AM, Brett J, *et al.* Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins. *J Biol Chem* 1992; 267: 14998-15004
- [591]-Bierhaus A, Humpert PM, Morcos M, *et al.* Understanding RAGE, the receptor for advanced glycation end products. *J Mol Med* 2005; 83: 876-886
- [592]-Schmidt AM, Yan SD, Yan SF, *et al.* The multiligand receptor RAGE as a progression factor amplifying immune and inflammatory responses. *J Clin Invest* 2001; 108: 949-955
- [593]-Buckley ST, Ehrhardt C. The receptor for advanced glycation end products (RAGE) and the lung. *J Biomed Biotechnol* 2010; 2010: 917108
- [594]-Kono H, Rock KL. How dying cells alert the immune system to danger. *Nat Rev Immunol* 2008; 8: 279-289
- [595]-Di Candia L, Saunders R, Brightling CE. The RAGE against the storm. *Eur Respir J* 2012; 39: 515-517
- [596]-Park L, Raman KG, Lee KJ, *et al.* Suppression of accelerated diabetic atherosclerosis by the soluble receptor for advanced glycation end products. *Nat Med* 1998; 4: 1025-1031
- [597]-Hofmann MA, Drury S, Hudson BI, *et al.* RAGE and arthritis: the G82S

- polymorphism amplifies the inflammatory response. *Genes Immunol* 2002; 3:123-135
- [598]-Demling N, Ehrhardt C, Kasper M, *et al.* Promotion of cell adherence and spreading: a novel function of RAGE, the highly selective differentiation marker of human alveolar epithelial type I cells. *Cell Tissue Res* 2006; 323: 475-488
- [599]-Englert JM, Hanford LE, Kaminski N, *et al.* A role for the receptor for advanced glycation end products in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Pathol* 2008; 172: 583-591
- [600]-Queisser MA, Kouri FM, Konigshoff M, *et al.* Loss of RAGE in pulmonary fibrosis: molecular relations to functional changes in pulmonary cell types. *Am J Respir Cell Mol Bio* 2008; 39: 337-345
- [601]-Falcone C, Emanuele E, D' Angelo A, Buzzi MP, Belvito C, *et al.* Plasma levels of soluble receptor for advanced glycation end products and coronary artery disease in non diabetic men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25 (5): 1032-1037
- [602]-Pullerits R, Bocarewa M, Dahlberg L, Tarkowski A. Decreased levels of soluble receptor for advanced glycation end products in patients with rheumatoid arthritis indicating deficient inflammatory control. *Arthritis Res Ther* 2005; 7 (4): R 817-824
- [603]-Ferhani N, Letuve S, Kozhich A, *et al.* Expression of high mobility group box 1 and of receptor for advanced glycation end products in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2010; 181: 917-927
- [604]-Rowe SM, Jackson PL, Liu G, *et al.* Potential role of high mobility group box 1 in cystic fibrosis airway disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 178: 822-831
- [605]-Smith DJ, Yerkovich ST, Towers MA, *et al.* Reduced soluble receptor for advanced glycation end products in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2011; 37: 516-522
- [606]-Cazzola M, Page CP, Calzetta L, Matera GM. Emerging anti-inflammatory strategies for COPD. *Eur Respir J* 2012; 40: 724-741
- [607]-Biswas S, Rahman I. Modulation of steroid activity in chronic inflammation: a novel anti-inflammatory role for curcumin. *Mol Nutr Food Res* 2008; 52: 987-994
- [608]-Barnes PJ. Mechanisms and resistance in glucocorticoid control of inflammation. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2010; 120:76-85

- [609]-Hoi AY, Iskander MN, Morand EF. Macrophage migration inhibitory factor: a therapeutic target across inflammatory diseases. *Inflamm Allergy Drug Targets* 2007; 6: 183-190
- [610]-Stoller JK, Aboussouan LS. Alpha-1 antitrypsin deficiency. *Lancet* 2005; 365: 2225-2236
- [611]-MacNee W. Oxidants /antioxidants and COPD. *Chest* 2000; 117: 303s-317s
- [612]-Atkinson JJ, Senior RM. Matrix metalloproteinase-9 in lung remodeling. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003; 28: 12- 24
- [613]-Tuder RM, Yoshida T, Arap W, Pasqualini R, Petrache I. State of the art. Cellular and molecular mechanisms of alveolar destruction in emphysema: an evolutionary perspective. *Proc Am Thorac Soc* 2006; 3: 503-510
- [614]-Lagente V, Manoury B, Nenon S, Le Quement C, Martin-Chouly C, Boichot E. Role of matrix metalloproteinases in the development of airway inflammation and remodeling. *Braz J Med Biol Res* 2005; 38: 1521-1530
- [615]-Demedts IK, Morel-Montero A, Lebecque S, Pacheco Y, Cataldo D, *et al.* Elevated MMP-12 protein levels in induced sputum from patients with COPD. *Thorax* 2006; 61: 196-201
- [616]-Molet S, Belleguic C, Lena H, Germain N, Bertrand CP, Shapiro SD, *et al.* Increase in macrophage elastase (MMP-12) in lungs from patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Inflamm Res* 2005; 54: 31-36
- [617]-Bracke K, Cataldo D, Maes T, Gueders M, Noel A, *et al.* Matrix metalloproteinase -12 and cathepsin D expression in pulmonary macrophages and dendritic cells of cigarette smoke-exposed mice. *Int Arch Allergy Immunol* 2005; 138: 169-179
- [618]-Segura-Valdez L, Pardo A, Gaxiola M, Uhal BD, *et al.* Upregulation of gelatinases A and B, collagenases 1 and 2, increased parenchymal cell death in COPD. *Chest* 2000; 117: 684-694
- [619]-Imai K, Dalal SS, Chen ES, Downey R, Schulman LL, *et al.* Human collagenase (matrix metalloproteinase-1) expression in the lungs of patients with emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163: 786-791
- [620]-Foronjy RF, Okada Y, Cole R, D'Armiento J. Progressive adult-onset emphysema in transgenic mice expressing human MMP-1 in the lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003; 284: L727-L737
- [621]-Sneider GL, Kleinerman JL, Thurlbeck WM, Bengali ZH. The definition of

- emphysema: Report of National-Heart-Lung-And Blood Institute, Division of Lung Diseases Workshop. *Am Rev Respir Dis* 1985; 132:182-185
- [622]-Finlay GA, O'Donnell MD, O'Connor CM, Hayes JP, *et al.* Elastin and collagen remodeling in emphysema: a scanning electron microscopy study. *Am J Pathol* 1996; 149: 1405- 1415
- [623]-Weathington NM, van Houwelingen AH, Noerager BD, *et al.* A novel peptide CXCR ligand derived from extracellular matrix degradation during airway inflammation. *Nat Med* 2006; 12: 317-323
- [624]-Hodge S, Hodge G, Nairn J, Holmes M, Reynolds PN. Increased airway granzyme B and perforin in current and ex-smoking COPD subjects. *COPD* 2006; 3: 179-187
- [625]-Rennard SI, Togo S, Holtz O. Cigarette smoke inhibits alveolar repair: a mechanism for the development of emphysema. *Proc Am Thorac Soc* 2006; 3: 703-708
- [626]-Holz O, Zuhlke I, Jaksztat E, *et al.* Lung fibroblasts from patients with emphysema show reduced proliferation rate in culture. *Eur Respir J* 2004; 24: 575-579
- [627]-Palange P, Testa U, Huertas A, *et al.* Circulating haemopoietic and endothelial progenitor cells are decreased in COPD. *Eur Respir J* 2006; 27: 529-541
- [628]-Tsuji T, Aoshiba K, Nagai A. Cigarette smoke induces senescence in alveolar epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004; 31: 643- 649
- [629]-Lee KY, Ho SC, Lin HC, *et al.* Neutrophil-derived elastase induces TGF- $\beta_1$  secretion in human airway smooth muscle via NF-kB pathway. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006; 35: 407- 414
- [630]-Plataki M, Tzortzaki E, Ryttila P, Demosthenes M, *et al.* Apoptotic mechanisms in the pathogenesis of COPD. *Int J COPD* 2006; 1:161-171
- [631]-Degterev A, Boyce M, Yuan J. A decade of caspases. *Oncogene* 2003; 22: 8543-8567
- [632]-Segura-Valdez L, Pardo A, Gaxiola M, Uhal BD, *et al.* Upregulation of gelatinases A and B, collagenases 1 and 2, and increased parenchymal cell death in COPD. *Chest* 2000; 117: 684-694
- [633]-Imai K, Mercer BA, Schulman LL, Sonett JR, D'Armiento JM. Correlation of lung surface area to apoptosis and proliferation in human emphysema. *Eur Respir J* 2005; 25: 250-258

- [634]-Kanazawa H, Yoshikawa J. Elevated oxidative stress and reciprocal reduction of vascular endothelial growth factor levels with severity of COPD. *Chest* 2005; 128: 3191-3197
- [635]-Hodge SJ, Hodge GL, Reynolds PN, Scicchitano R, Holmes M. Increased production of TGF- $\beta$  and apoptosis of T lymphocytes isolated from peripheral blood in COPD. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003; 285: L492-L499
- [636]-Majo J, Ghezzi H, Cosio MG. Lymphocyte population and apoptosis in the lungs of smokers and their relation to emphysema. *Eur Resp J* 2001; 17: 946-953
- [637]-Cryosfakis G, Tzanakis N, Kyriakov D, *et al.* Perforin expression and cytotoxic activity of sputum CD8+ lymphocytes in patients with COPD. *Chest* 2004; 125:71-76
- [638]-Aoshiha K, Yokohori N, Nagai A. Alveolar wall apoptosis causes lung destruction and emphysematous changes. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003; 28: 555-562
- [639]-Tuder RM, Zhen L, Cho CY, *et al.* Oxidative stress and apoptosis interact and cause emphysema due to vascular endothelial growth factor receptor blockade. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003; 29: 88-97
- [640]-Hodge S, Hodge G, Holmes M, Reynolds PN. Apoptosis in COPD. *Current Respiratory Medicine Reviews* 2005; 1: 33-41
- [641]-Takabatake N, Nakamura H, Inoue S, Terashita K, *et al.* Circulating levels of soluble Fas ligand and soluble Fas in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Med* 2000; 94: 1215-1220
- [642]-Noguera A, Sala E, Pons AR, *et al.* Expression of adhesion molecules during apoptosis of circulating neutrophils in COPD. *Chest* 2004; 125: 1837-1842
- [643]-Brown V, Elbom JS, Bradley J, Ennis M. Dysregulated apoptosis and NF- $\kappa$ B expression in COPD subjects. *Resp Res* 2009; 18: 24
- [644]-Agusti AGN, Salueda J, Miralles C, *et al.* Skeletal muscle apoptosis and weight loss in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166:485-489
- [645]-Rabinovitch RA, Basto R, Ardite E, *et al.* Mitochondrial dysfunction in COPD patients with low body mass index. *Eur Respir J* 2007; 29: 643-650
- [646]-Salueda J, Garcia-Palmer FJ, Wiesner R, *et al.* Cytochrome oxidase activity and mitochondrial gene expression in skeletal muscle of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157:1413-1417
- [647]-ATS-ERS American Thoracic Society and European Respiratory Society.

- Skeletal muscle dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159: S1-40
- [648]-Oudijk EJD, Lammers JWJ, Koenderman L. Systemic inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2003; 22:S5-13
- [649]-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
- [650]-American Thoracic Society. Statement on definitions and classification of chronic bronchitis, asthma and pulmonary emphysema. *Am Rev Respir Dis* 1962; 85: 762
- [651]-Piquette CA, Renard SI, Snider GL. Chronic bronchitis and emphysema. In: Murray JF, Nadel JA. Editors. *Textbook of Respiratory Medicine*, 3<sup>rd</sup> ed. Philadelphia, PA: Saunders; 2000: 1188-1245
- [652]-Saetta M, Ghezzi H, Kim WD, *et al.* Loss of alveolar attachments in smokers: an early morphometric correlate of lung function impairment. *Am Rev Respir Dis* 1985; 132: 894-900
- [653]-Saetta M, Turato G, Timens W, Jeffery PK. Pathology of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir Mon* 2006; 38: 159-176
- [654]-Fry DL, Hyatt RE. Pulmonary mechanics: a unified analysis of the relationship between pressure, volume and gas flow in the lungs of normal and diseased human subjects. *Am J Med* 1960; 29: 672-689
- [655]-Berend N, Woolcock AJ, Marlin GE. Correlation between the function and structure of the lung in smokers. *Am Rev Respir Dis* 1979; 119: 695-705
- [656]-Puchelle E, Zahm JM, Tournier JM, Coraux C. Airway epithelial repair, regeneration and remodeling after injury in chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* 2006; 3: 726-733
- [657]-Papi A, Casoni G, Caramori G, *et al.* COPD increases the risk of squamous histological subtype in smokers who develop non-small cell lung carcinoma. *Thorax* 2004; 59: 679-681
- [658]-Peters EJ, Morice R, Benner SE, *et al.* Squamous metaplasia of the bronchial mucosa and its relationship to smoking. *Chest* 1993; 103: 1429-1432

- [659]-Laperre TS, Sont JK, van Schadewijk A, *et al.* Smoking cessation and bronchial epithelial remodeling in COPD: a cross-sectional study. *Respir Res* 2007; 8:85
- [660]-Araya J, Cambier S, Markovics JA, *et al.* Squamous metaplasia amplifies pathologic epithelial-mesenchymal interactions in COPD patients. *J Clin Invest* 2007; 117: 3551-3562
- [661]-Bosken CH, Wiggs BR, Pare PD, Hogg JC. Small airway dimensions in smokers with obstruction to airflow. *Am Rev Respir Dis* 1990; 142:563-570
- [662]-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
- [663]-Jarai G, Sukkar M, Garrett S, *et al.* Effects of interleukin-1 $\beta$ , interleukin-13 and transforming growth factor- $\beta$  on gene expression in human airway smooth muscle using gene microarrays. *Eur J Pharmacol* 2004; 497:255-265
- [664]-Howarth PH, Knox AJ, Amrani Y, Tliba O, *et al.* Synthetic responses in airway smooth muscle. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114:S32-S50
- [665]-Chung KF. The role of airway smooth muscle in the pathogenesis of airway wall remodeling in chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* 2005; 2: 347-354
- [666]-Jeffery PK. Comparison of the structural and inflammatory features of COPD and asthma. *Chest* 2000; 251-260
- [667]-O'Shaughnessy TC, Ansari TW, Barnes NC, Jeffery PK. Reticular basement membrane thickness in moderately severe asthma and smokers chronic bronchitis with and without airflow obstruction. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153:A8795
- [668]-Chanez P, Vignola AM, O'Shaughnessy T, *et al.* Corticosteroid reversibility in COPD is related to features of asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155: 1529-1534
- [669]-De Marco R, Accordini S, Cerveri I, *et al.* Incidence of chronic obstructive pulmonary disease in a cohort of young adults according to the presence of chronic cough and phlegm. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 175:32-39
- [670]-Reid LM. Pathology of chronic bronchitis. *Lancet* 1954; 266:274-278
- [671]-Innes AL, Woodruff PG, Ferrando RE, *et al.* Epithelial mucin stores are increased

- in the large airway of smokers with airflow obstruction. *Chest* 2006; 130:1102-1108
- [672]-Caramori G, Di Gregorio C, Carlstedt I, *et al.* Mucin expression in peripheral airways of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Histopathology* 2004; 45: 477-484
- [673]-Sommerhoff CP, Nadel JA, Basbaum CB, Caughey GH. Neutrophil elastase and cathepsin G stimulate secretion from culture bovine airway gland serous cells. *J Clin Invest* 1990; 85: 682-689
- [674]-Rose MC, Voynow JA. Respiratory tract mucin genes and mucin glycoproteins in health and disease. *Physiol Rev* 2006; 86:245-278
- [675]-Burgel P-R, de Blic J, Chanez P, *et al.* Update on the roles of distal airways in asthma. *Eur Respir J* 2009; 18: 80-95
- [676]-Black PN, Ching PS, Beaumont B, *et al.* Changes in elastic fibers in the small airways and alveoli in COPD. *Eur Respir J* 2008; 31: 998-1004
- [677]-Hogg JC, McDonough JE, Sanchez PG, *et al.* Micro-computed tomography measurements of peripheral lung pathology in chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* 2009; 6: 546-549
- [678]-Bosken CH, Hards J, Gatter K, *et al.* Characterization of the inflammatory reaction in the peripheral airways of cigarette smokers using immunocytochemistry. *Am Rev Respir Dis* 1992; 145: 911-917
- [679]-Van Pottelberge GR, BrackevKR, Van den Broeck S, Reinartz SM, Van Druenen CM, *et al.* Plasmacytoid dendritic cells in pulmonary lymphoid follicles of patients with COPD. *Eur Respir* 2010;36: 781-791
- [680]-Brusselle GG, Demoor T, Bracke KR, Brandsma C-A, Timens W. Lymphoid follicles in very severe COPD: beneficial or harmful?. *Eur Respir J* 2009; 34: 219-230
- [681]-Van der Strate BW, Postma DS, Brandsma CA, *et al.* Cigarette smoke –induced emphysema: a role for the B cell? *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 173:751-758
- [682]-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
- [683]-Hogg JC. Pathophysiology of airflow limitation in chronic obstructive pulmonary

- disease. *Lancet* 2004; 364: 709-721
- [684]-Zubler RH. Naive and memory B cells in T-cell dependent and T-cell independent responses. *Springer Semin. Immunopathol* 2001; 23: 405-419
- [685]-Kroese FGM, Timens W, Nieuwenhuis P. Germinal center reaction and B lymphocytes: morphology and function. *Curr.Top Pathol* 1990; 84: 103-148
- [686]-Aloisi F, Pujol-Borrell R. Lymphoid neogenesis in chronic inflammatory diseases. *Nat Rev Immunol* 2006; 6: 205-217
- [687]-Carragher DM, Rangel-Moreno J, Randall TD. Ectopic lymphoid tissues and local immunity. *Semin Immunol* 2008; 20: 26-42
- [688]-Hjelmstrom P. Lymphoid neogenesis: de novo formation of lymphoid tissue in chronic inflammation through expression of homing chemokines. *J Leukoc Biol* 2001; 69:331-339
- [689]-Sethi S, Murphy TF. Infection in the pathogenesis and course of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 175: 998-1005
- [690]-Patel IS, Seemungal TA, Wilks M, *et al.* Relationship between bacterial colonisation the frequency, character and severity of COPD exacerbations. *Thorax* 2002; 57: 759-764
- [691]-Lee SH, Goswami S, Grudo A, *et al.* Antielastin autoimmunity in tobacco smoking-induced emphysema. *Nat Med* 2007; 13:567-569
- [692]-Feghali-Bostwick CA, Gadgil AS, Otterbein LC, *et al.* Autoantibodies in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 177:156-163
- [693]-Snider GL, Kleinerman JL, Thurlbeck WM, Bengali ZH. The definition of emphysema: Report of a National Heart–Lung and Blood Institute. Division of Lung-Diseases workshop. *Am Rev Respir Dis* 1985; 132: 182-185
- [694]-MacNee W, Rahman I. Is oxidative stress central to the pathogenesis of chronic pulmonary obstructive disease? *Trends Mol Med* 2001; 7: 55-62
- [695]-Shapiro SD. Proteolysis in the lung. *Eur Respir J Suppl.*2003; 44: 30s-32s
- [696]-Yokohori N, Aoshiba K, Nagai A. Increased levels of cell death and proliferation in alveolar wall cells in patients with pulmonary emphysema. *Chest* 2004; 125:

626-632

- [697]-Alder JK, Guo N, Kembou F, Parry EM, Anderson CJ, *et al.* Telomere length is a determinant of emphysema susceptibility. *Am J Respir Crit Care Med* 2011; 184: 904-912
- [698]-Churg A, Zhou S, Wright JL. Matrix metalloproteinases in COPD. *Eur Respir J* 2012; 39:197-209
- [699]-Mott JD, Werb Z. Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases. *Curr Opin Cell Biol.* 2004; 16: 558-564
- [700]-Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z. Matrix metalloproteinases and regulation of tissue remodeling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8: 221-233
- [701]-Loffek S, Schilling O, Franzke CW. Biological role of matrix metalloproteinases a critical balance. *Eur Respir J* 2011; 38:191-208
- [702]-Lopez-Otin C, Matrisian LM. Emerging roles of proteases in tumor suppression. *Nat Rev Cancer* 2007; 7:800-808
- [703]-Churg A, Zhou S, Wright JL. Matrix metalloproteinases in COPD. *Eur Respir J* 2012; 39: 197-209
- [704]-Hautamaki RD, Kobayashi DK, Senior RM, *et al.* Macrophage elastase is required for cigarette smoke-induced emphysema in mice. *Science* 1997; 277:2002-2004
- [705]-Nénan S, Planquois JM, Berna P, *et al.* Analysis of the inflammatory response induced by MMP-12 catalytic domain instilled in mouse airways. *Int Immunopharmacol* 2005; 5:511-524
- [706]-D'Armiento J, Dalal SS, Okada Y, *et al.* Collagenase expression in the lungs of transgenic mice causes pulmonary emphysema. *Cell* 1992; 71: 955-961
- [707]-Gosselink JV, Hayashi S, Elliott WM, *et al.* Differential expression of tissue repair genes in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2010; 181:1329-1335
- [708]-Vornooy JHJ, Lindeman JHN, Jacobs JA, *et al.* Increased activity of matrix metalloproteinase-8 and matrix metalloproteinase -9 in induced sputum from patients with COPD. *Chest* 2004; 126: 1802-1810

- [709]-Muroski ME, Roycik MD, Newcomer RG, *et al.* Matrix metalloproteinase-9/gelatinase B is a putative therapeutic target of chronic obstructive pulmonary disease and multiple sclerosis. *Curr Pharm Biotechnol* 2008; 9: 34-36
- [710]-Gueders MM, Foidart J-M, Noel A, *et al.* Matrix metalloproteinases of MMP in the respiratory tract: potential implications in asthma and other lung diseases. *Eur J Pharmacol* 2006; 533:133-144
- [711]-Omachi TA, Eisner MD, Rames A, *et al.* Matrix metalloproteinase-9 predicts pulmonary status declines in  $\alpha$ 1-antitrypsin deficiency. *Respir Res* 2011; 12:35
- [712]-Louhelainen N, Stark H, Mazur W, *et al.* Elevation of sputum matrix metalloproteinase-9 persists up to 6 months after smoking cessation: a research study. *BMC Pulm Med* 2010; 10:13
- [713]-Atkinson JJ, Lutey BA, Suzuki Y, *et al.* The role of matrix metalloproteinase-9 in cigarette smoke-induced emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 2011; 183: 876-884
- [714]-Segura-Valdez L, Pardo A, Gaxiola M, *et al.* Upregulation of gelatinases A and B, collagenases 1 and 2, and increased parenchymal cell death in COPD. *Chest* 2000; 117: 684-694
- [715]-Bezerra FS, Valença SS, Pires KM, *et al.* Long-term exposure to cigarette smoke impairs lung function and increases HMGB-1 expression in mice. *Respir Physiol Neurobiol* 2011; 177:120-126
- [716]-Xiong Z, Leme AS, Ray P, *et al.* CX3CR1+ lung mononuclear phagocytes spatially confined to the interstitium produce TNF- $\alpha$  and IL-6 and promote cigarette smoke-induced emphysema. *J Immunol* 2011; 186:3206-3214
- [717]-Le Quément C, Guénon I, Gillon JY, *et al.* MMP-12 induces IL-8/CXCL8 secretion through EGFR and ERK1/2 activation in epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2008; 294: L1076-L1084
- [718]-Churg A, Wang RD, Tai H, *et al.* Macrophage metalloelastase mediate acute cigarette smoke-induced inflammation via tumor necrosis factor- $\alpha$  release. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167:1083-1089
- [719]-Le Quément C, Guénon I, Gillon JY, *et al.* The selective MMP-12 inhibitor AS111793 reduces airway inflammation in mice exposed to cigarette smoke. *Br J*

*Pharmacol* 2008; 154: 1206-1215

- [720]-Black PN, Ching PS, Beaumont B, Ranasinghe S, *et al.* Changes in elastic fibers in the small airways and alveoli in COPD. *Eur Respir J* 2008; 31:998-1004
- [721]-Hogg JC, Tiemens W. The pathology of chronic obstructive pulmonary disease. *Annu Rev Pathol* 2009; 4:435-459
- [722]-Merrilees MJ, Ching PS, Beaumont B, Hinek A, *et al.* Changes in elastin, elastin binding protein and versican in alveoli in chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Res* 2008; 9:41
- [723]-Senior RM, Griffin GI, Mecham RP. Chemotactic activity of elastin-derived peptides. *J Clin Invest* 1980; 66:859-862
- [724]-Hunninghake GW, Davidson JM, Rennard S, Szapiel S, Gadek JE, Crystal RG. Elastin fragments attract macrophage precursors to diseased sites in pulmonary emphysema. *Science* 1981; 212: 925-927
- [725]-Rennard SI, Togo S, Holz O. Cigarette smoke inhibits alveolar repair: a mechanism for the development of emphysema. *Proc Am Thorac Soc* 2006; 3: 703-708
- [726]-Zhang J, Wu L, Feng M-X, Sexton P, *et al.* Pulmonary fibroblasts from COPD patients show an impaired response of elastin synthesis to TGF- $\beta_1$ . *Respiratory Physiology & Neurobiology* 2011; 177:236-240
- [727]-Chambers RC, Laurent GJ. The Lung in: Comper WD (Ed), Extracellular Matrix. Volume 1, Tissue Function. Harwood Academic Publishers GmbH. Netherlands, 1996: 378-409
- [728]-Fukuda Y, Masuda Y, Ishiizaki M. Morphogenesis of abnormal elastic fibers in panacinar and centriacinar emphysema. *Hum Pathol* 1989; 20:652-659
- [729]-Deslee G, Woods JC, Moore CM, Liu L, *et al.* Elastin expression in very severe human COPD. *Eur Respir J* 2009; 34: 324-331
- [730]-Yoshida T, Tudor RM. Pathobiology of cigarette smoke-induced chronic obstructive pulmonary disease. *Physiol Rev* 2007; 87:1047-1082
- [731]-Kasahara Y, Tudor R, Taraseviciene-Stewart L, *et al.* Inhibition of VEGF receptors cause as lung cell apoptosis and emphysema. *J Clin Invest* 2000;

106:1311-1319

- [732]-Kasahara T, Matsushima K. Endothelial cell death and decreased expression of vascular endothelial growth factor receptor 2 in emphysema. *Trends Immunol* 2001; 22:593-596
- [733]-Imai K, Mercer BA, Schulman LL, Sonett JR, D' Armiento JM. Correlation of lung surface area to apoptosis and proliferation in human emphysema. *Eur Respir J* 2005; 25:250-258
- [734]-Aoshiba K, Nagai A. Senescence hypothesis for the pathogenic mechanism of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* 2009; 6: 596-601
- [735]-Chen ZH, *et al.* Egr-1 regulates autophagy in cigarette smoke-induced chronic obstructive pulmonary disease. *PLoS ONE* 2008; 3 (10): e3316
- [736]-Csordas A, *et al.* Cigarette smoke extract induces prolonged endoplasmic reticulum stress and autophagic cell death in human umbilical vein endothelial cells. *Cardiovasc Res* 2011; 92 (1): 141-148
- [737]-Hwang JW, *et al.* Cigarette smoke-induced autophagy is regulated by SIRT1-PARP-1 dependent mechanism: implication in pathogenesis of COPD. *Arch Biochem Biophys* 2010; 500 (2): 203-209
- [738]-Monick MM, *et al.* Identification of an autophagy defect in smoker's alveolar macrophages. *J Immunol* 2010; 185 (9): 5425-5435
- [739]-Kim HP, *et al.* Autophagic proteins regulate cigarette smoke-induced apoptosis: protective role of heme-oxygenase-1. *Autophagy* 2008; 4 (7): 887-895
- [740]-Hodge S, Hodge G, Scicchitano R, Reynolds PN, Holmes M. Alveolar macrophages from subjects with chronic obstructive pulmonary disease are deficient in their ability to phagocytose apoptotic airway epithelial cells. *Immunol Cell Biol* 2003; 81: 289-296
- [741]-Hodge S, Hodge G, Holmes M, Reynolds PN. Increased airway epithelial and T-cell apoptosis in COPD remains despite smoking cessation. *Eur Respir J* 2005; 25: 447-454
- [742]-Vandivier RW, Fadok VA, Hoffmann PR, Bratton DL, *et al.* Elastase-mediated phosphatidylserine receptor cleavage impairs apoptotic cell clearance in cystic

fibrosis and bronchiectasis. *J Clin Invest* 2002; 109: 661-670

- [743]-Vandivier RW, Ogden CA, Fadok VA, Hoffmann PR, Brown KK, *et al.* Role of surfactant proteins A, D, and C1q in the clearance of apoptotic cells *in vivo* and *in vitro*: calreticulin and CD91 as a common collectin receptor complex. *J Immunol* 2002; 169: 3978-3986
- [744]-Betsuyaku T, Kuroki Y, Nagai K, Nasuhara Y, Nishimura M. Effects of ageing and smoking on SP-A and SP-D levels in bronchoalveolar lavage fluid. *Eur Respir J* 2004; 24; 964-970
- [745]- Di Francia M, Barbier D, Mege JL, Orehec J. Tumor necrosis factor- $\alpha$  levels and weight loss in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 150: 1453-1455
- [746]- Vernooij JH, Kucukaycan M, Jacobs JA, Chavannes NH, *et al.* Local and systemic inflammation in patients with chronic obstructive pulmonary disease: soluble tumor necrosis factor receptors are increased in sputum. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166: 1218-1224
- [747]-Henson PM, Vandivier RW, Douglas IS. Cell death, remodeling, and repair in chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* 2006; 3:713-717
- [748]-Nathan C. Points of control in inflammation. *Nature* 2002; 420: 846-852. Doi:101038/nature01320
- [749]-Serhan CN. Resolution phases of inflammation: novel endogenous anti-inflammatory and proresolving lipid mediators and pathways. *Annu Rev Immunol* 2007; 25:101-137 doi:10.1146/annurev.immunol.25.022106.141647
- [750]-Vandivier RW, Henson PM, Douglas IS. Burying the dead: the impact of failed apoptotic cell removal (efferocytosis) on chronic inflammatory lung disease. *Chest* 2006; 129:1673-1682 doi: 10.1378/chest.129.6.1673
- [751]-Moore KJ, Rosen ED, Fitzgerald ML, Randow F, *et al.* The role of PPAR- $\gamma$  in macrophage differentiation and cholesterol uptake. *Nat Med* 2001; 7:41-47 doi: 10.1038/83328
- [752]-Vachon E, Martin R, Plumb J, Kwok V, Vandivier RW, *et al.* CD44 is a phagocytic receptor. *Blood* 2006; 107: 4149-4158 doi: 10.1182/blood-2005-09-3808

- [753]-Noguera A, Gomez C, Faner R, Cosio B, González-Pérez A, Clària J, Carvajal A, Agusti A. An investigation of the resolution of inflammation (catabasis) in COPD. *Respir Res* 2012; 13 (1): 101 doi: 10.1186/1465-9921-13-101
- [754]-Pons AR, Sauleda J, Noguera A, Pons J, Barcelo B, Fuster A, Agusti AGN. Decreased macrophage release of TGF- $\beta$  and TIMP- $_1$  in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2005; 26: 60-66
- [755]-Petrache I, Natarajan V, Zhen L, Medler TR, Richter AT, Cho C, *et al.* Ceramide upregulation causes pulmonary cell apoptosis and emphysema-like disease in mice. *Nat Med* 2005; 11:491-498
- [756]-Tuder RM, Petrache I, Elias JA, Voelkel NF, Henson PM. Apoptosis and emphysema: the missing link. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003; 28:551-554
- [757]-Demedts IK, Demoor T, Bracke KR, Joos GF, Brusselle GG. Role of apoptosis in the pathogenesis of COPD and pulmonary emphysema. *Respir Res* 2006; 7:53
- [758]-Calabrese F, Giacometti C, Beghe B, Rea F, Loy M, *et al.* Marked alveolar apoptosis/proliferation imbalance in end-stage emphysema. *Respir Res* 2005; 6:14
- [759]-Hayflick L, Moorhead PS. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 1961; 25: 585-621
- [760]-Morlá M, Busquets X, Pons J, Salueda J, MacNee W, Agusti AG. Telomere shortening in smokers with and without COPD. *Eur Respir J* 2006; 27:525-528
- [761]-Savale L, Chaouat A, Bastuji-Garin S, Marcos E, Boyer L, *et al.* Shortened telomeres in circulating leucocytes of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2009; 179:566-571
- [762]-Kaszubowska L. Telomere shortening and ageing of the immune system. *J Physiol Pharmacol* 2008; 59:169-186
- [763]-Lambers C, Hacker S, Posh M, Hoetzenecker K, Pollreisz A, *et al.* T cell senescence and contraction of T cell repertoire diversity in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Exp Immunol* 2009; 155:466-474
- [764]-Liu H, Fergusson MM, Castillo RM, Liu J, Cao L, Chen J, *et al.* Augmented Wnt signaling in a mammalian model of accelerated aging. *Science* 2007; 317:803-806

- [765]-Freund A, Orjalo AV, Desprez PY, Campisi J. Inflammatory networks during cellular senescence: causes and consequences. *Trends Mol Med* 2010; 16:238-246
- [766]-Sinden NJ, Stockley RA. Systemic inflammation and comorbidity in COPD: a result of overspill of inflammatory mediators from the lungs? Review of the evidence. *Thorax* 2010; 65:930-936
- [767]-Wouters EF, Reynaert NL, Dentener MA, Vernooij JH. Systemic inflammation in asthma and chronic obstructive pulmonary disease: is there a connection? *Proc Am Thorac Soc* 2009; 6: 638-647
- [768]-Alvar Agustí. Systemic effects of chronic obstructive pulmonary disease. What we know and what we don't know (but should). *Proc Am Thorac Soc* 2007; 4: 522-525
- [769]-Agusti AG, Noguera A, Salueda J, Sala E, Pons J, Busquets X. Systemic effects of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2003; 21:347-360
- [770]-Wouters EF, Creutzberg EC, Schols AM. Systemic effects in COPD. *Chest* 2002; 121:127S-130S
- [771]-Pinto-Plata V, Toso J, Lee K, Bilello J, Mullerova H, de Souza M, *et al.* Use of proteomic patterns of serum biomarkers in patients with chronic obstructive pulmonary disease: correlation with clinical parameters. *Proc Am Thorac Soc* 2006; 3: 465-466
- [772]-Walter RE, Wilk JB, Larson MG, Vasan RS, Keaney JF Jr, *et al.* Systemic inflammation and COPD: the Framingham Heart Study. *Chest* 2008; 133: 19-25
- [773]-Eagan TML, Ueland T, Wagner PD, Hardie JA, Mollnes TE, *et al.* Systemic inflammatory markers in COPD: results from the Bergen COPD Cohort Study. *Eur Respir J* 2010; 35: 540-548
- [774]-Garcia-Rio F, Miravittles M, Soriano JB, Munoz L, Duran-Tauleria E, *et al.* Systemic inflammation in chronic obstructive pulmonary disease: a population-based study. *Respir Res* 2010; 11: 63
- [775]-Fabri LM, Rabe KF. From COPD to chronic systemic inflammatory syndrome? *Lancet* 2007; 370: 797-799

- [776]-American Association of Immunologists. The definition of the inflamome. An AAI recommendation for the NIH "Roadmap for Medical Research" FY 2011 *Am Assoc. Immunol. Newsletter* 2008; 7: 7-8
- [777]-Vestbo J, Anderson W, Coxson HO, Crim C, Dawber F, Edwards L, Hagan G, Knobil K, Lomas DA, MacNee W, *et al.* Evaluation of COPD longitudinally to identify surrogate end-points (ECLIPSE). *Eur Respir J* 2008; 31: 869-873
- [778]-Agusti A, Calverley P, Celli B, Coxson H, Edwards L, Lomas D, MacNee W, Miller B, Rennard S, Silverman E, *et al.* Characterisation of COPD heterogeneity in the ECLIPSE cohort. *Respir Res* 2010; 11: 122-136.
- [779]-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; 153:530-534
- [780]-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
- [781]-Shapiro SD. Transgenic and gene-targeted mice as models for chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2007; 29: 375-378
- [782]-Seimetz M, *et al.* Inducible NOS inhibition reverses tobacco-smoke-induced emphysema and pulmonary hypertension in mice. *Cell* 2011; 147 (2): 293-305
- [783]-Weathington NM, *et al.* A novel peptide CXCR ligand derived from extracellular matrix degradation during airway inflammation. *Nat Med* 2006; 12(3): 317-323
- [784]-Sarir H, Henricks PAJ, van Houwelingen AH, Nijkamp FP, *et al.* Cells, mediators and Toll-like receptors in COPD. *Eur J Pharmacol* 2008; 585 (2-3): 346-353
- [785]-Brusselle G, Joos GF, Bracke KR. New insights into the immunology of chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet* 2012; 379: 1341-1351
- [786]-Barnes PJ. COPD: Inflammatory mechanisms and systemic consequences. *in Eur Respir Monogr* 2013; 59:13-27
- [787]-Petrache I, Natarajan V, Zhen L, *et al.* Ceramide upregulation causes pulmonary cell apoptosis and emphysema-like disease in mice. *Nat Med* 2005; 11:491-498

- [788]-Shapiro SD. The macrophage in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160:S29-S32
- [789]-Barnes PJ. Current and future therapies for airway mucus hypersecretion. *Novartis Found Symp* 2002; 248:237-249
- [790]-Saetta M, Di Stefano A, Maestrelli P, *et al.* Activated T-lymphocytes and macrophages in bronchial mucosa of subjects with chronic bronchitis. *Am Rev Respir Dis* 1993; 147:301-306
- [791]-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
- [792]-Meshi B, Vitalis TZ, Ionescu D, *et al.* Emphysematous lung destruction by cigarette smoke. The effects of latent adenoviral infection on the lung inflammatory response. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002; 26: 52-57
- [793]-Fraig M, Shreesha U, Savici D, Katzenstein AL. Respiratory bronchiolitis: a clinicopathologic study in current smokers, ex-smokers, and never-smokers. *Am J Surg Pathol* 2002; 26:647-653
- [794]-Traves SL, Culpitt S, Russell REK, *et al.* Elevated levels of the chemokines GRO- $\alpha$  and MCP-1 in sputum samples from COPD patients. *Thorax* 2002; 57:590-595
- [795]-Traves SL, Smith SJ, Barnes PJ, Donnelly LE. Increased migration of monocytes from COPD patients towards GRO- $\alpha$  is not mediated by an increase in CXCR2 receptor expression. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; A824
- [796]-Punturieri A, Filipov S, Allen E, *et al.* Regulation of elastolytic cysteine proteinase activity in normal and cathepsin K-deficient macrophages. *J Exp Med* 2000; 192: 789-800
- [797]-Russell RE, Thorley A, Culpitt SV, *et al.* Alveolar macrophage-mediated elastolysis: roles of matrix metalloproteinases, cysteine and serine proteases. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002; 283: L867-L873
- [798]-Barnes PJ. Alveolar macrophages in chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Cell Mol Biol* 2004; 50 Online Pub: OL627-OL637

- [799]-Grumelli S, Corry DB, Song LX, *et al.* An immune basis for lung parenchymal destruction in chronic obstructive pulmonary disease and emphysema. *PLoS Med* 2004; 1: 75-83
- [800]-Keatings VM, Jatakanon A, Worsdell YM, *et al.* Effects of inhaled and oral glucocorticoids on inflammatory indices in asthma and COPD. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155: 542-548
- [801]-Ito K, Yamamura S, Essilfie-Quaye S, *et al.* Histone deacetylase-2 mediated deacetylation of the glucocorticoid receptor enables NF-kB suppression. *J Exp Med* 2006; 203: 7-13
- [802]-Barnes PJ. Role of HDAC2 in the pathophysiology of COPD. *Ann Rev Physiol* 2009; 71: 451-464
- [803]-Ito K, Lim S, Caramori G, *et al.* A molecular mechanism of action of theophylline: Induction of histone deacetylase activity to decrease inflammatory gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 8921-8926
- [804]-Donnelly LE, Jones GE, Newton R, Barnes PJ. The anti-inflammatory action of resveratrol on human airway epithelial cells is not mediated via estrogen or glucocorticosteroid receptors. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 165: A614
- [805]-Ferrara F, D'Adda D, Falchi M, Dall'Asta L. The macrophagic activity of patients affected by pneumonia or chronic obstructive pulmonary disease. *Int J Tissue React* 1996; 18: 109-114
- [806]-Hodge S, Hodge G, Scicchitano R, Reynolds PN, *et al.* Alveolar macrophages from subjects with chronic obstructive pulmonary disease are deficient in their ability to phagocytose apoptotic airway epithelial cells. *Immunol Cell Biol* 2003; 81:289-296
- [807]-Taylor AE, Finney-Hayward TK, Quint JK, *et al.* Defective macrophage phagocytosis of bacteria in COPD. *Eur Respir J* 2010; 35: 1039-1047
- [808]-Mullerova H, Chigbo C, Hagan GW, *et al.* The natural history of community acquired pneumonia in COPD patients: a population database analysis. *Resp Med* 2012; 106: 1124-1133
- [809]-Shaykhaev R, Krause A, Salit J, *et al.* Smoking-dependent reprogramming of alveolar macrophage polarization: Implication for the pathogenesis of chronic

obstructive pulmonary disease. *J Immunol* 2009; 183: 2867-2883

- [810]-Woodruff PG, Koth LL, Yang YH, *et al.* A distinctive alveolar macrophage activation state induced by cigarette smoking. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172:1383-1392
- [811]-Heguy AT, O'Connor P, Luattich K, *et al.* Gene expression profiling of human alveolar macrophages of phenotypically normal smokers and non-smokers reveals a previous unrecognized subset of genes modulated by cigarette smoke. *J Mol Med* 2006; 84: 318-328
- [812]-Shapiro SD. The macrophages in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160:529-532
- [813]-Barnes PJ, D Shapiro SD, Pauwels RA. Chronic obstructive pulmonary disease: molecular and cellular mechanisms. *Eur Res J* 2003; 22:672-688
- [814]-Elias JA, Kang MJ, Lee CG, Chapoval S, *et al.* State of the art: Mechanistic heterogeneity in chronic obstructive pulmonary disease: insights from transgenic mice. *Proc Am Thorac Soc* 2006; 3: 494-498
- [815]-Velot E, Haas B, Leonard F, Emens I, *et al.* Activation of the adenosine A3 receptor stimulates matrix metalloproteinase-9 secretion by macrophages. *Cardiovasc Res* 2008; 80:246-254
- [816]-Morsche EJ, Molina G, Volmer JB, *et al.* A3 adenosine receptor signaling influences pulmonary inflammation and fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2008; 39: 697-705
- [817]-Drannik AG, Pouladi MA, Robbins S, Goncharova I, *et al.* Impact of cigarette smoke on clearance and inflammation after *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Am J. Respir Crit Care Med* 2004; 170: 1164-1171
- [818]-McManus TE, Marley AM, Baxter N, Christie SN, *et al.* Respiratory viral infection in exacerbations of COPD. *Respir Med* 2008; 102:1575-1580
- [819]-Barnes PJ. Neutrophils find smoke attractive. *Science* 2010; 330:40-41
- [820]-Keatings VM, Collins PD, Scott DM, *et al.* 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: 530-534

- [821]-Di Stefano A, Capelli A, Lusuardi M, *et al.* Severity of airflow limitation is associated with severity of airway inflammation in smokers. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158: 1277-1285
- [822]-Bathoorn E, Kerstjens H, Postma D, Timens W, MacNee W. Airways inflammation and treatment during acute exacerbations of COPD. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* 2008; 3: 217-229
- [823]-Di Stefano A, Maestrelli P, Roggeri A, *et al.* Upregulation of adhesion molecules in the bronchial mucosa of subjects with chronic obstructive bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 149:803-810
- [824]-Bazzoni F, Cassatella MA, Rossi F, Ceska M, *et al.* Phagocytosing neutrophils produce and release high amounts of the neutrophil-activating peptide 1/interleukin 8. *J Exp Med* 1991; 173: 771-774
- [825]-Snelgrove RJ, Jackson PL, Hardison MT, Noerager BD, *et al.* A critical role for LTA 4H in limiting chronic pulmonary neutrophilic inflammation. *Science* 2010; 330 (6000): 90-94
- [826]-Weathington NM, van Houwelingen AH, Noerager BD, Jackson PL, *et al.* A novel peptide CXCR ligand derived from extracellular matrix degradation during airway inflammation. *Nat Med* 2006; 12: 317-323
- [827]-Haddock JL, Pfister RR, Muccio DD, Villain M, Sommers CI, *et al.* Bioactivity of peptide analogs of the neutrophil chemoattractant, N-acetyl-proline-glycine-proline. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999; 40: 2427-2429
- [828]-Braber S, Koelink PJ, Henricks PAJ, Jackson PL, *et al.* Cigarette smoke-induced lung emphysema in mice is associated with prolyl endopeptidase, an enzyme involved in collagen breakdown. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2011; 300: L255-L265
- [829]-Chapman RW, Phillips JE, Hipkin RW, Curran AK, *et al.* CXCR2 antagonists for the treatment of pulmonary disease. *Pharmacology & Therapeutics* 2009; 121:55-68
- [830]-Kitagouchi Y, Fujimoto K, Kubo K, Honda T. Characteristics of COPD phenotypes classified according to the findings of HRCT. *Respir Med* 2006; 100 (10):1742-1752

- [831]-Brightling CE, Monteiro W, Ward R, Parker D, Morgan MD, *et al.* Sputum eosinophilia and short term response to prednisolone in chronic obstructive pulmonary disease: a randomised controlled trial. *Lancet* 2000; 356 (9240): 1480-1485
- [832]-Miravittles M, Soler Ctaluña JJ, Calle M, Molina J, Almagro P, Quintano JA, *et al.* A new approach to grading and trating COPD based on clinical phenotypes: summary of the Spanish COPD guidelines (GesEPOC). *Prim. Care Respir* 2013; 22: 117-121
- [833]-Zhu JIE, Qiu YS, Majumdar S, *et al.* Exacerbations of bronchitis, bronchial eosinophilia and gene expression for interleukin-4, interleukin-5, and eosinophil chemoattractants. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164: 109-116
- [834]-Saetta M, Di Stefano A, Maestrelli P, *et al.* Airway eosinophilia and expression of interleukin-5 protein in asthma and in exacerbations of chronic bronchitis. *Clin Exp Allergy* 1996; 26: 766-774
- [835]-Barnes P J. Chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2000; 343 (4):269-280
- [836]-Hewson CA, Jardine A, Edwards MR, Laza-Stanca V, *et al.* Toll-like receptor 3 is induced by and mediates antiviral activity against rhinovirus infection of human bronchial epithelial cells. *J Virol* 2005; 79 (19): 12273-12279
- [837]-Ritter M, Mennerich D, Weith A, Seither P. Characterization of Toll-like receptors in primary lung epithelial cells: strong impact of the TLR3 ligand poly (I:C) on regulation of the Toll-like receptors, adaptor proteins and inflammatory response. *J Inflamm* 2005; 2:16
- [838]-Jeffery PK. Pathology of asthma compared with chronic obstructive pulmonary disease. In: Adkinson F, Busse WW, Bochner BS, Holgate ST, Simons FER, Lemanske RF (eds), Middleton´s allergy: principles and pratice, 7th edition, Mosby 2009: 921-936
- [839]-Zagai U, Skold CM, Trulson A, Venge P, Lundahl J. The effect of eosinophils on collagen contraction and implications for tissue remodeling. *Clin Exp Immunol* 2004; 135 (3):427-433
- [840]-Snoeck-Stroband JB, Lapperre TS, Gosman MME, *et al.* Chronic bronchitis sub-

phenotype within COPD: inflammation in sputum and biopsies. *Eur Respir J* 2008; 31: 70-77

- [841]-Carroll NG, Mutavdzic S, James AL. Distribution and degranulation of airway mast cells in normal and asthmatic subjects. *Eur Respir J* 2002; 19:879-885
- [842]-Andersson CK, Mori M, Bjermer L, Lofdahl CG, Erjefalt JS. Novel site-specific mast cell subpopulations in the human lung. *Thorax* 2009; 64: 297-305
- [843]-Dawicki W, Marshall JS. New and emerging roles for mast cells in host defense. *Curr Opin Immunol* 2007; 19: 31-38
- [844]-Doggrell SA, Wanstall JC. Vascular Chymase: pathophysiological role and therapeutic potential of inhibition. *Cardiovasc Res* 2004; 61: 653-662
- [845]-Jawdat DM, Rowden G, Marshall JS. Mast cells have a pivotal role in TNF-independent lymph node hypertrophy and the mobilization of langerhans cells in response to bacterial peptidoglycan. *J Immunol* 2006; 177: 1755-1762
- [846]-Metz M, Siebenhaar F, Maurer M. Mast cell functions in innate skin immune system. *Immunobiology* 2008; 213: 251-260
- [847]-Irani AA, Schechter NM, Craig SS, DeBlois G, Schwartz LB. Two types of human mast cells that have distinct neutral protease compositions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 4464-4468
- [848]-Ekberg-Jansson A, Amin K, Bake B, Rosengreen A, Tuyen U, *et al.* Bronchial mucosal mast cells in asymptomatic smokers relation to structure, lung function and emphysema. *Respir Med* 2005; 99: 75-83
- [849]-Liesker JJ, Ten Hacken NH, Rutgers SR, Zeinstra-Smith M, Postma DS, *et al.* Mast cell numbers in airway smooth muscle and PC20amp in asthma and COPD. *Respir Med* 2007; 101:882-887
- [850]-Laperre TS, Postma DS, Gosman MM, Snoeck-Stroband JB, *et al.* Relation between duration of smoking cessation and bronchial inflammation in COPD. *Thorax* 2006; 61: 115-121
- [851]-Gosman MM, Postma DS, Vonk JM, Rutgers B, Lodewijk M, *et al.* Association of mast cells with lung function in chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Res* 2008; 9: 64

- [852]-Andersson CK, Mori M, Bjermer L, Lofdahl C-G, *et al.* Alterations in lung mast cell populations in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2010; 181: 206-217
- [853]-Siddiqui S, Hollins F, Saha B, Brightling CE. Inflammatory cell microlocalisation and airways dysfunction: cause and effect? *Eur Respir J* 2007; 30: 1043-1056
- [854]-Sommerhoff CP, Caughey GH, Finkbeiner WE, Lazarus SC, *et al.* Mast cell chymase. A potent secretagogue for airway gland serous cells. *J Immunol* 1989; 142: 2450-2456
- [855]-Frank BT, Rossall JC, Caughey GH, Fang KC. Mast cell inhibitor of metalloproteinase-1 is cleaved and inactivated extracellularly by alpha-chymase. *J Immunol* 2001; 166: 2783-2792
- [856]-Okayama Y, Ra C, Saito H. Role of mast cell in airway remodeling. *Curr Opin Immunol* 2007; 19: 687-693
- [857]-Banchereau J, Briere F, Caux C, *et al.* Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2000; 105: 421-429
- [858]-Vermaelen K, Pauwels R. Pulmonary dendritic cells. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172: 530-551
- [859]-Randolph GJ, Angeli V, Swartz MA. Dendritic-cell trafficking to lymph nodes through lymphatic vessels. *Nat Rev Immunol* 2005; 5:617-628
- [860]-Gad M, Claesson MH, Pedersen AE. Dendritic cells in peripheral tolerance and immunity. *APMIS* 2003; 111:766-775.
- [861]-Jego G, Pascual V, Palucka AK, Banchereau J. Dendritic cells control B cell growth and differentiation. *Curr Dir Autoimmun* 2005; 8:124-139
- [862]-Tsoumakidou M, Demedts IK, Brusselle GG, Jeffery PK. Dendritic cells in chronic obstructive pulmonary disease: new players in an old game. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 177 (11): 1180-1186
- [863]-Ito T, Wang YH, Duramad O, Hori T, Delespesse GJ, Watanabe N, *et al.* TSLP-activated dendritic cells induce an inflammatory T helper type 2 cell response through OX40 ligand. *J Exp Med* 2005; 202:1213-1223
- [864]-Miossec P, Korn T, Kuchroo VK. Interleukin-17 and type 17 helper T cells. *N Engl*

*J Med* 2009; 361: 888-898

- [865]-Louten J, Boniface K, de Waal Malefyt R. Development and function of Th17 cells in health and disease. *J Allergy Clin Immunol* 2009; 123: 1004-1011
- [866]-Van Pottelberge GR, BrackevKR, Van den Broeck S, Reinartz SM, Van Druenen CM, *et al.* Plasmacytoid dendritic cells in pulmonary lymphoid follicles of patients with COPD. *Eur Respir* 2010;36: 781-791
- [867]-Plumb J, Smyth LJ, Adams HR, *et al.* Increased T-regulatory cells within lymphocyte follicles in moderate COPD. *Eur Respir J* 2009; 34: 89-34
- [868]-Bratke K, Klug M, Bier A, *et al.* Function-associated surface molecules on airway dendritic cells in cigarette smokers. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2008; 38:655-660
- [869]-Demedts IK, Bracke KR, Van Pottelberge G, *et al.* Accumulation of dendritic cells and increased CCL20 levels in the airways of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J respir Crit Care Med* 2007; 175: 998-1005
- [870]-Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T, Ugolini S. Functions of natural Killer cells. *Nat Immunol* 2008; 9:503-510
- [871]-Lodoen MB, Lanier LL. Natural killer cells as an initial defense against pathogens. *Curr Opin Immunol* 2006; 18:391-398
- [872]- 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
- [873]-Herberman RB, Nunn ME, Holden HT, Lavrin DH. Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogeneic tumors: characterization of effector cells. *Int J Cancer* 1975; 16: 230-239
- [874]-Lanier LL, Phillips JH, Hackett J Jr, Tutt M, Kumar V. Natural killer cells: definition of a cell type rather than a function. *J Immunol* 1986; 137: 2735-2739
- [875]-Galy A, Travis M, Cen D, Chen B. Human T, B, natural killer, and dendritic cells arise from a common bone marrow progenitor cell subset. *Immunity* 1995; 3: 459-473
- [876]-Miller JS, Alley KA, McGlave P. Differentiation of natural killer (NK) cells from human primitive marrow progenitors in a stroma-based long term culture system. Identification of a CD34+7+ NK progenitor. *Blood* 1994; 83:2594-2601

- [877]-Fehniger TA, Cooper MA, Nuovo GJ, *et al.* CD56 bright natural killer cells are present in human lymph nodes and are activated by T-cell derived IL-2: a potential new link between adaptive and innate immunity *Blood* 2003; 101:3052-3057
- [878]-Cooper MA, Fehniger TA, Turner SC, *et al.* Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56 (bright) subset. *Blood* 2001; 97: 3146-3151
- [879]-Smyth MJ, Cretney E, Kelly JM, *et al.* Activation of NK cell cytotoxicity. *Mol Immunol* 2005; 42:501-510
- [880]-Lanier LL. Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition. *Nat Immunol* 2008; 9:495-502
- [881]-Gasser S, Orsulic S, Brown EJ, Raulet DH. The DNA damage pathway regulates innate immune system ligands of the NKG2D receptor. *Nature* 2005; 436:1186-1190
- [882]-Bauer S, Groh V, Wu J, Phillips JH, Lanier LL, *et al.* Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science* 1999; 285:727-729
- [883]-Biron CA. Interferons (alpha) and (beta) as immune regulators – a new look. *Immunity* 2001; 14: 661-664
- [884]-Biron CA, Nguyen KB, Pien GC, Cousens LP, *et al.* Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annu Rev Immunol* 1999; 17:189-220
- [885]-Maroof A, Beattie L, Zubairi S, Svensson M, Stager S, *et al.* Posttranscriptional regulation of IL-10 gene expression allows natural killer cells to express immunoregulatory function. *Immunity* 2008; 29: 295-305
- [886]-Moretta A. Natural killer cells and dendritic cells: rendez-vous in abused tissues. *Nat Rev Immunol* 2002; 2: 957-964
- [887]-Andoniou CE, Coudert JD, Degli-Esposti MA. Killers and beyond: NK mediated control of immune responses. *Eur J Immunol* 2008; 38: 2938-2942
- [888]-Martin-Fontecha A, Thomsen LL, Brett S, Gerard C, Lipp M, *et al.* Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN-gamma for T(H)1 priming. *Nat Immunol* 2004; 5:1260-1265

- [889]-Di Santo JP. Natural killer cells: diversity in search of a niche. *Nat Immunol* 2008; 9: 473-475
- [890]-Colonna M. Interleukin-22 producing natural killer cells and lymphoid tissue inducer-like cells in mucosal immunity. *Immunity* 2009; 31:15-23
- [891]-Sun JC, Beilke JN, Lanier LL Adaptive immune features of natural killer cells. *Nature* 2009; 457: 557-561
- [892]-Cooper MA, Elliot JM, Keyel PA, Yang L, Carrero JA, *et al.* Cytokine-induced memory-like natural killer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106: 1915-1919
- [893]-Mian MF, Lauzon NM, Stampfli MR, Mossman KI, Ashkar AA. Impairment of human NK cell cytotoxic activity and cytokine release by cigarette smoke. *J Leukoc Biol* 2008; 83: 774-784
- [894]-Prieto A, Reyes E, Bernstein ED, Martinez B, Monserrat J, Izquierdo JL, *et al.* Defective natural killer and phagocytic activities in chronic obstructive pulmonary disease are restored by glycoposphopeptical (immunoferon). *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163: 1578-1583
- [895]-Fairclough L, Urbanowicz RA, Corne J. Killer cells in chronic obstructive pulmonary disease. *Clinical Science* 2008; 114: 533-543
- [896]-Wang J, Urbanowicz RA, Tighe PJ, Todd I, Corne JM, Fairclough LC. Differential activation of killer cells in the circulation and the lung: A study of current smoking status and chronic obstructive pulmonary disease. *PLoS ONE* 2013; 8 (3): e58556.doi:10.1371/journal.pone.00585556
- [897]-Ying Tang, Xiaodan Li, Man Wang, Qi Zou, Shasha Zhao, *et al.* Increased numbers of NK cells, NKT-like cells, and NK inhibitory receptors in peripheral blood of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Dev Immunol* 2013; doi: 10.1155/2013/721782
- [898]-Kronenberg M, Gapin L. The unconventional lifestyle of NKT cells. *Nat Rev Immunol* 2002; 2: 557-568
- [899]-Emoto M, Kaufmann SH. Liver NKT cells: an account of heterogeneity. *Trends Immunol* 2003; 24: 364-369
- [900]-CA Biron and L. Brossay. NK and NKT cells in innate defense against viral

infections. *Current Opinion in Immunology* 2001; 13: 458-464

- [901]-Vijayanand P, Seumois G, Pickard C, *et al.* Invariant natural killer T cells in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *N. Engl J Med* 2007; 356: 1410-1422
- [902]-Godfrey DI, Stankovic S, Baxter AG. Raising the NKT cell family. *Nat Immunol* 2010; 11: 197-206
- [903]-Godfrey DI, MacDonald HR, Kronenberg M, *et al.* NKT cells: What's in a name?. *Nat Rev Immunol* 2004; 4:231-237
- [904]-Urbanowicz RA, Lamb JR, Todd I, Corne JM, Fairclough LC. Enhanced effector function of cytotoxic cells in the induced sputum of COPD patients. *Respir Res* 2010; 11: 76
- [905]-Urbanowicz RA, Lamb JR, Todd I, Corne JM, *et al.* Altered effector function of peripheral cytotoxic cells in COPD. *Respiratory Research* 2009; vol 10. article 53
- [906]-Kabelitz D, Wesch D, Hinz T. Gamma delta T cells, their T cell receptor usage and role in human diseases. *Springer Semin Immunopathol* 1999; 21: 55-75
- [907]-Christmas SE, Brew R, Deniz G, Taylor JJ. T cell receptor heterogeneity of gamma delta T-cells clones from human female reproductive tissues. *J. Immunol* 1993;78:436-443
- [908]-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: 926-930
- [909]-Jameson J, Whitherden D, Havran WL. T-cell effector mechanisms: gamma-delta and CD1d-restricted subsets. *Curr Opin Immunol* 2003; 15:349-353
- [910]-Jameson J, Ugarte K, Chen N, *et al.* A role for skin gammadelta T cells in wound repair. *Science* 2002; 296:747-749
- [911]-Brandes M, Willmann K, Moser B. Professional antigen-presentation function by Human  $\gamma\delta$  T Cells. *Science* 2005; 309:264-268
- [912]-King DP, Hyde DM, Jackson KA, Novosad DM, *et al.* Cutting edge: protective response to pulmonary injury requires gamma delta T lymphocytes. *J. Immunol* 1999; 162:5033-5036

- [913]-Havran WL, Jameson JM, Witherden DA. Epithelial cells and their neighbors. Interactions between intraepithelial lymphocytes and neighboring epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005; 289:G627-630
- [914]-Born W, Lahn M, Takeda K, Kanehiro A, O'Brien R, *et al.* Role of gamma delta T cells in protecting normal airway function. *Respir Res* 2000; 1: 151-158
- [915]-Lahn M. The role of gamma delta T cells in the airways. *J Mol Med* 2000; 78:409-425
- [916]-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
- [917]-Tzanakis N, Chrysofakis G, Tsoumakidou M, *et al.* Induced sputum CD8+ T-lymphocyte subpopulations in chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Med* 2004; 98:57-65
- [918]-Hogg JC, Chu F, Utokaparch S, *et al.* The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *New Engl J Med* 2004; 350: 2645-2653
- [919]-Grumelli S, DB Corry; LZ Song, L Green, J Huh , J Hacken, *et al.* An immune basis for lung parenchymal destruction in chronic obstructive pulmonary disease and emphysema. *PLoS Med* 2004; 1: 75-83
- [920]-Di Stefano A, Caromori A, Capelli I, Gnemmi F, Ricciardolo T, Oates CF, *et al.* STAT4 activation in smokers and patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2004; 24: 78-85
- [921] Barcelo B, J Pons, A Fuster, J Salueda, A Noguera, JM Ferrer and AG Agusti. Intracellular cytokine profile of T lymphocytes in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Exp Immunol* 2006; 145: 474-479
- [922]-Cosio MG, Saetta M, Agusti A. Immunologic aspects of chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2009; 360: 2445-2454
- [923]-Guy G Brusselle, Guy F Joos, Ken R Bracke. New insights into the immunology of chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet* 2011; 378: 1015-1026
- [924]-Monaco C, E. Andreacos, S Kiriakidis, M Feldman and C Paleolog. T-cell mediated signaling in immune, inflammatory and angiogenic processes: the

cascade of events leading to inflammatory diseases. *Curr Drug Targets Inflamm. Allergy* 2004; 3: 35-42

[925]-Curtis J L. Cell mediated adaptative immune defense of the lungs. *Proc Am Thorac Soc* 2005; 2: 412-416

[926]-Plotkin J, Prockop SE, Lepique A, Petrie HT. Critical role for CXCR4 signaling in progenitor localization and T cell differentiation in the postnatal thymus. *J Immunol* 2003; 171: 4521-4527

[927]-Rossi FM, Corbel SY, Merzaban JS, Carlow DA, Gossens K, *et al.* Recruitment of adult thymic progenitors is regulated by P-selectin and its ligand PSGL-1. *Nat Immunol* 2005; 6: 626-634.

[928]-Kyewski B, Derbinski J. Self-representation in the thymus: an extended view. *Nat Immunol* 2004; 4: 688-698.

[929]-Mackall CL, Fleisher TA, Brown MR, Andrich MP, Chen CC, *et al.* Age, thymopoiesis, and CD4+ T lymphocyte regeneration after intensive chemotherapy. *N Engl J Med* 1995; 332:143-149

[930]-Shanker A. Is thymus redundant after adulthood? *Immunol Lett* 2004;91:79-86

[931]-Surh CD, Sprent J. Regulation of mature T cell homeostasis. *Semin Immunol* 2005; 17:183-191

[932]-Cosio MG, Saetta M, Agusti A. Immunologic aspects of chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2009; 360:2445-2454

[933]-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

[934]-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

[935]-Calabrese F, Giacometti C, Beghe B, *et al.* Marked alveolar apoptosis/proliferation imbalance in end-stage emphysema. *Respir Med* 2005; 6 :14-14

[936]-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

- [937]-Retamales I, Elliott WM, 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
- [938]-William MacNee. Chronic obstructive pulmonary disease. *Clinical Respiratory Medicine*. Elsevier 2012: 531-552
- [939]-Freeman CM, JL Curtis, SW Chensue. CC chemokine receptor 5 and CXC chemokine receptor 6 expression by lung CD8+ cells correlates with chronic obstructive pulmonary disease severity. *Am J Pathol* 2007; 171:767-776
- [940]-Saetta M, Mariani M, Panina-Bordignon P, *et al.* Increased expression of the chemokine receptor CXCR3 and its ligand CXCL10 in peripheral airways of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165: 1404-1409
- [941]-Wang Z, T Zheng, Z Zhu, RJ Homer; RJ Riese, *et al.* Interferon gamma induction of pulmonary emphysema in the adult murine lung. *J Exp Med* 2000; 192: 1587-1600
- [942]-D Papandrinopoulou, V. Tzouda, G Tsoukalas. Lung compliance and chronic obstructive pulmonary disease. *Pulmonary Medicine* 2012: 1-6
- [943]-Hashimoto S, Kobayashi A, Kooguchi K, Kitamura Y, *et al.* Upregulation of two death pathways of perforin/granzyme and FasL/Fas in septic acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161:237-243
- [944]-Chrysofakis G, Tzanakis N, Kyriakov D, *et al.* Perforin expression and cytotoxic activity of sputum CD8+ lymphocytes in patients with COPD. *Chest* 2004; 125:71-76
- [945]-Nakanishi K, T Yoshimoto, H Tsutsui, and H Okamura. Interleukin-18 is a unique cytokine that stimulates both Th1 and Th2 responses depending on its cytokine milieu. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2001; 12: 53-72
- [946]-Okamura H, H Tsutsui, T Komatsu, M Yutsudo, A Hakura, *et al.* Cloning a new cytokine that induces IFN-gamma production by T cells. *Nature* 1995;378:88-91
- [947]-Kang MJ, RJ Homer, A Gallo, CG Lee, KA Crothers, *et al.* IL-18 is induced and IL-18 receptor alpha plays a critical role in the pathogenesis of cigarette smoke-induced pulmonary emphysema and inflammation. *J Immunol* 2007; 178: 1948-

- [948]-Petersen AM, M Penkowa, M Iversen, L Frydelund-Larsen, *et al.* Elevated levels of IL-18 in plasma and skeletal muscle in chronic obstructive pulmonary disease. *Lung* 2007; 185: 161-171
- [949]-Liu K, M Catalfamo, Y Li, PA Henkart, and NP Weng. IL-15 mimics T cell receptor crosslinking in the induction of cellular proliferation, gene expression, and cytotoxicity in CD8+ memory T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99; 6192-6197
- [950]-Alves NL, B. Hooibrink, FA Arosa, and RA van Lier IL-15 induces antigen-independent expansion and differentiation of human naive CD8+ T cells in vitro. *Blood* 2003; 102; 2541-2546
- [951]-Aina Noguera, Cristina Gomez, Rosa Faner, Borja Cosio, *et al.* An investigation of the resolution of inflammation (catabasis) in COPD. *Respiratory Research* 2012; 13:1:101
- [952]-Won-Dong Kin, Hyun-Sook Chi, Kang-Hyeon Choe, *et al.* A possible role for CD8+ and non CD8+ cell granzyme B in early small airway wall remodelling in centrilobular emphysema. *Respirology* 2013; 18 (n<sup>o</sup>4): 688-696
- [953]-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
- [954]-Leckie MJ, Jenkins GR, Khan J, Smith SJ, Walker C, Barnes PJ, Hansel TT. Sputum T lymphocytes in asthma, COPD and healthy subjects have the phenotype of activated intraepithelial T cells (CD69+ CD103+). *Thorax* 2003; 58 (1): 23-29
- [955]-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
- [956]-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
- [957]-Retamales I, Elliott WM, 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

- [958]-Di Stefano A, Caramori G, Capelli A, *et al.* STAT4 activation in smokers and in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2004; 24: 78-85
- [959]-Andrew K Sullivan, Philip L Simonian, Michael T Falta, John D Mitchell, *et al.* Oligoclonal CD4+ T cells in the lungs of patients with severe emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172: 590-596
- [960]-Curtis JL, Freeman CM, Hogg J C. The immunopathogenesis of chronic obstructive disease: insights from recent research. *Proc Am Thorac Soc* 2007; 4 (7): 512-521
- [961]-Turato G, Zuin R, Miniati M, *et al.* Airway inflammation in severe chronic obstructive pulmonary disease: relationship with lung function and radiologic emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166:105-110
- [962]-Imaoka H, Hoshino T, Takei S, *et al.* Interleukin-18 production and pulmonary function in COPD. *Eur Respir J* 2008; 31:287-297
- [963]-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 : e 8-e8
- [964]-Bettelli E, Korn T, Oukka M, Kuchroo V. Induction and effector functions of Th17 cells. *Nature* 2008; 453:1051-1057
- [965]-Ivanov S, Bozinovski S, Bossios A, Valadi H, *et al.* Functional relevance of the IL-23-IL-17 axis in lungs in vivo. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2007; 36:442-451
- [966]-Miossec P, Korn T, Kuchroo V K. Interleukin-17 and type 17 helper T cells. *N Engl J Med* 2009; 361: 888-898
- [967]- Louten J, Boniface K, de Waal Malefyt R. Development and function of Th17 cells in health and disease. *J Allergy Clin Immunol* 2009; 123: 1004-1011
- [968]-Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol* 2009; 27: 485-517
- [969]-Jones CE, Chan K. Interleukin-17 stimulates the expression of interleukin-8, growth-related oncogene-alpha, and granulocyte colony-stimulating factor by human airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002; 26: 748-753
- [970]-Di Stefano A, Caramori G, Gnemmi I, Contoli M, Bristot L, *et al.* Association of

increased CCL5 and CXCL7 chemokine expression with neutrophil activation in severe stable COPD. *Thorax* 2009; 64: 968-975

[971]-Kao CY, Huang F, Chen Y, Thai P, *et al.* Up-regulation of CC chemokine ligand 20 expression in human airway epithelium by IL-17 through a JAK-independent but MEK/NF-Kappa B-dependent signaling pathway. *J Immunol* 2005; 175:6676-6685

[972]-Perera WR, Hurst JR, Wilkinson TM, Sapsford RJ, *et al.* Inflammatory changes, recovery and recurrence at COPD exacerbation. *Eur Respir J* 2007; 29:527-534

[973]-Chen Y, Thai P, Zhao YH, Ho YS, *et al.* Stimulation of airway mucin gene expression by interleukin (IL-17) through IL-6 paracrine/autocrine loop. *J Biol Chem* 2003; 278: 17036-17043

[974]-Harrison OJ, Foley J, Bolognese BJ, Long E, *et al.* Airway infiltration of CD4+CCR6+ Th17 type cells associated with chronic smoke induced airspace enlargement. *Immunol Lett* 2008; 121: 13-21

[975]-Ikeuchi H, Kuroiwa T, Hiramatsu N, Kaneko Y, *et al.* Expression of interleukin-22 in rheumatoid arthritis: potential role as a proinflammatory cytokine. *Arthritis Rheum* 2005; 52: 1037-1046

[976]-Wolk K, Witte E, Warszawska K, Schulze-Tanzil G, *et al.* The Th17 cytokine IL-22 induces IL-20 production in keratinocytes: a novel immunological cascade with potential relevance in psoriasis. *Eur J Immunol* 2009; 39:3570-3581

[977]-Aujla SJ, Chan YR, Zheng M, Fei M, Askew DJ, *et al.* IL-22 mediates mucosal host defense against Gram-negative bacterial pneumonia. *Nat Med* 2008; 14: 275-281

[978]-Di Stefano A, Caramori G, Gnemmi I, Contoli M, Vicari C, *et al.* T helper type 17-related cytokine expression is increased in the bronchial mucosa of stable chronic obstructive pulmonary disease patients. *Clin Exp Immunol* 2009; 157: 316-324

[979]-Sonnenberg GF, Nair MG, Kirn TJ, Zaph C, Fouser LA, *et al.* Pathological versus protective functions of IL-22 in airway inflammation are regulated by IL-17 A. *J Exp Med* 2010; 207: 1293-1305

[980]-Mangan PR, Harrington LE and O'Quinn DB. Transforming growth factor- $\beta$  induces development of the Th17 lineage. *Nature* 2006; 441:231-234

- [981]-Kikly K, Liu L, Na S, and Sedgwick J D. The IL-23 /Th17 axis: therapeutic targets for autoimmune inflammation. *Curr Opin Immunol* 2006; 18:670-675
- [982]-Maria Inés Vargas-Rojas, Alejandra Ramirez-Venegas, Leonardo Limon-Camacho, *et al.* Increase of Th17 cells in peripheral blood of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Respiratory Medicine* 2011; 105:1648-1654
- [983]-Gershon RK, Kondo K. Cell interactions in the induction of tolerance: The role of thymic lymphocytes. *Immunology* 1970; 18: 723-73
- [984]-Sakaguchi S, Fukuma K, Kuribayashi K, *et al.* Organ-specific autoimmune diseases induced in mice by elimination of T cell subset. I. Evidence for active participation of T cells in natural self-tolerance; deficit of a T cell subsets a possible cause of autoimmune disease. *J Exp Med* 1985; 181: 72-87
- [985]-Viguier M, Lemaitre F, Verola O, *et al.* FoxP3 expressing CD4+CD25<sup>high</sup> regulatory T cells are overrepresented in human metastatic melanoma lymph nodes and inhibit the junction of infiltrating T cells. *J Immunol* 2004; 173:1444-1453
- [986]-Hsieh CS, Lee HM, Lio CW. Selection of regulatory T cells in the thymus. *Nat Rev Immunol* 2012; 12:157-167
- [987]-Litjens NH, Boer K, Betjes MG. Identification of circulating human antigen – reactive CD4+FoxP3+ natural regulatory T cells. *J Immunol* 2012; 188: 1083-1090
- [988]-Chen Y, Adams E, Regateiro FS, *et al.* Activation rather than Foxp3 expression determines that TGF- $\beta$  induced regulatory T cells out-compete naive T cells in dendritic cell clustering. *Eur J Immunol* 2012; 42: 1436-1448
- [989]-Bilate AM, Lafaille JJ. Induced CD4+ Foxp3+ regulatory T cells in immune tolerance. *Annu Rev Immunol* 2012; 30: 733-758
- [990]-Tang Q, Bluestone JA. The Foxp3+ regulatory T cell: a jack of all trades, master of regulation. *Nat Immunol* 2008; 9:239-244
- [991]-Lee SH, Goswami S, Grudo A, *et al.* Antielastin autoimmunity in tobacco smoking-induced emphysema. *Nat Med* 2007; 13:567-569
- [992]-Barcelo B, Pons J, Ferrer JM, Salueda J, Fuster A, Agusti AG. Phenotypic characterization of T-lymphocytes in COPD: abnormal CD4+CD25+ regulatory T-

- lymphocyte response to tobacco smoking. *Eur Respir J* 2009; 34: 89-94
- [993]-S Isajevs, I Taivans, G Strazda, U Kopeika, *et al.* Decreased FOXP3 expression in small airways of smokers with COPD. *Eur Respir J* 2009; 33: 61-67
- [994]-Plumb J, Smyth JC. Role of regulatory T-cells in chronic obstructive pulmonary disease. *Annals of Respiratory Medicine* 2009; 33: 61-67
- [995]-Xiong XZ, Jin Y, Zhou Q, *et al.* Correlation between Foxp3 regulatory T cells and chronic obstructive pulmonary disease. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2008; 88: 471-474
- [996]-Roos-Engstrand E, Pourazar J, Behndig AF, *et al.* Expansion of CD4+CD25+ helper T cells without regulatory function in smoking and COPD. *Respir Res* 2011; 12 :74
- [997]-Gosman MME, Willemse BWM, Jansen DF, Laperre TS, Shadewijk van A, *et al.* Increased number of B-cells in bronchial biopsies in COPD. *Eur Respir J* 2006; 27: 60-64
- [998]-Bosken CH, Hards J, Gatter K, Hogg JC. Characterization of the inflammatory reaction in the inflammatory reaction in the peripheral airways of cigarette smokers using immunocytochemistry. *Am Rev Respir Dis* 1992; 145: 911-917
- [999]-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
- [1000]-Demoor T, Bracke KR, Maes T, *et al.* Role of lymphotoxin-alpha in cigarette smoke-induced inflammation and lymphoid neogenesis. *Eur Respir J* 2009; 34: 405-416
- [1001]-van der Strate BW, Postma DS, Brandsma CA, *et al.* Cigarette smoke-induced emphysema. A role for the B cell ?. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 173:751-758
- [1002]-Brusselle GG, Demoor T, Bracke KR, Timens W, *et al.* Lymphoid follicles in (very) severe COPD: Beneficial or harmful? *Eur Respir J* 2009; 34:219-230
- [1003]-Randall TD. Bronchus-associated lymphoid tissue (BALT) structure and function. *Adv Immunol* 2010; 107:187-241
- [1004]-Mueller SN, Hosiawa-Meagher KA, Konieczny BT, *et al.* Regulation of homeostatic chemokine expression and cell trafficking during immune responses.

*Science* 2007; 317:670-674

- [1005]-Cosio MG, Saetta M, Agusti A. Immunologic aspects of chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2009; 360: 2445-2454
- [1006]-Fabri LM, Rable KF. From COPD to chronic systemic inflammatory syndrome? *Lancet* 2007; 370: 797-799
- [1007]-Fabri LM, Beghe B, Agusti A. COPD and the solar system introducing the Chronic Obstructive Pulmonary Disease Comorbidity. *Am J Respir Crit Care Med* 2012; 186: 117-119
- [1008]-Agusti A, Edwards LD, Rennard SI, MacNee W, Tal-Singer R, *et al.* Persistent systemic inflammation is associated with poor clinical outcomes in COPD: a novel phenotype. *PLoS ONE* 2012; 7 (5)
- [1009]-Celli BR, Locantore N, Yates J, Talsinger R, Miller BE, Bakke P, Calverley P, *et al.* Inflammatory biomarkers improve clinical prediction of mortality in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2012; 185: 1065-1072
- [1010]-Agusti AG, Noguera A, Saucedo J, Sala E, Pons J, *et al.* Systemic effects of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2003; 21: 347-360
- [1011]-Kirkham PA, Barnes PJ. Oxidative stress in COPD. *Chest* 2013; 144: 266-273
- [1012]-Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease – Update 2013. [www.goldcopd.org](http://www.goldcopd.org) accessed in February 2013
- [1013]-Divo M, Cote C, Torres J, Casanova C, Marin JM, Pinto-Plata V, Zulueta J, Cabrera C, Zagacela J, Hunninghake G, Celli B. Comorbidities and risk of mortality in patients with chronic obstructive pulmonary diseases. *Am J Respir Crit Care Med* 2012; 186:155-161
- [1014]-Miravittles M, Soler-Cataluña JJ, Calle M, Molina J, Almagro P, Quintano JA, *et al.* A new approach to grading and treating COPD based on clinical phenotypes: summary of the Spanish COPD guidelines (GesEPOC). *Prim Care Respir J* 2013; 22:117-121
- [1015]-Standford AJ, Chagani T, Weir TD, Connett JE, Anthonisen NR, Pare PD. Susceptibility genes for rapid decline of lung function in the Lung Health Study. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 1: 469-473

- [1016]-Tashkin DP. COPD progression and individual rates of change in FEV1 and the BODE Index. *Am J Respir Crit Care Med* 2011; 184: 988-990
- [1017]-Enright PL, Connett JE, Kanner RE, Johnson LR, Lee WW. For the lung Health Study Group. Spirometry in the lung Health Study. Determinants of short-term intraindividual variability. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 151: 406-411
- [1018]-Han MLK, Agusti A, Calverley PM, Celli BR, Criner G, *et al.* Chronic obstructive pulmonary disease phenotypes: future of COPD. *Am J Respir Crit Care Med* 2010; 182: 598-604
- [1019]-Agusti A, Calverley PM, Celli BR, Coxson H, Edwards L, *et al.* Characterisation of COPD heterogeneity in the ECLIPSE cohort. *Resp. Res* 2010; 11: 122-136
- [1020]-Hardin M, Silverman EK, Barr RG, *et al.* The clinical features of the overlap between COPD and Asthma. *Resp. Res.* 2011; 12: 127
- [1021]-Silva GE, Cherrill DL, Guerra S, Barbee RA. Asthma as a risk factor for COPD in a longitudinal study. *Chest* 2004; 126: 59-65
- [1022]-Soriano JB, Alfageme I, Almagro P, Casanova C, Cristobal Esteban, De Torres JP, Cambior PM, Miravittles M, Selbi BR, Marin JM. Distribution and prognostic validity of the new global initiative for chronic obstructive lung diseases grading classification. *Chest* 2013; 43: 694-702
- [1023]-Areias V, Carreira S, Anciães M, Pinto P, Bárbara C. Comorbilidades em doentes com doença pulmonar obstructiva crónica estágio IV. *Rev. Port. Pneumol* 2014; 20: 5-11

# ÍNDICE



PREFÁCIO .....	XIII
SUMÁRIO .....	XVII
I PARTE - NOVAS PERSPECTIVAS SOBRE A FISIOPATOLOGIA E A PATOGENIA NO ENQUADRAMENTO SISTÉMICO DA DPOC .....	1
CAPÍTULO I .....	3
INTRODUÇÃO .....	3
CAPÍTULO II .....	7
ACTUALIZAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA .....	7
CAPÍTULO III .....	15
FACTORES DE RISCO DA DPOC .....	15
1-Poluição Doméstica .....	15
2-Exposição Ocupacional .....	16
3-Poluição Ambiental .....	17
4-Genética .....	18
5- Infecções Respiratórias .....	29
6-Factores Socio-económicos .....	31
7- Outros Factores de Risco .....	32
CAPÍTULO IV .....	35
CONTRIBUIÇÃO DO ENVELHECIMENTO PARA AS MANIFESTAÇÕES SISTÉMICAS DA DPOC .....	35
1-Envelhecimento da População. Alguns Dados Estatísticos .....	36
2-Envelhecimento e Stress Oxidativo .....	38
3-Factores do Envelhecimento .....	40
4-Moléculas Anti-envelhecimento .....	41
5-Envelhecimento e Alterações Funcionais Respiratórias .....	43
6-Envelhecimento e Inflamação .....	44
7-Envelhecimento e Alterações Imunológicas .....	45
CAPÍTULO V .....	61
O TABACO NO CONTEXTO DA DPOC .....	61
1-Exposição Crónica ao Tabaco .....	64
2-Tabaco e Inflamação Sistémica .....	68
3-Mediadores Inflamatórios Sistémicos na Exposição Crónica ao Tabaco ..	72
CAPÍTULO VI .....	77
A DPOC E O STRESS OXIDATIVO .....	77
1-Abordagem Bioquímica do Stress Oxidativo .....	78
2-Antioxidantes .....	84
3-Células e Oxidantes .....	89
4-Oxidantes e Inflamação na DPOC .....	91
5-Oxidantes/ Sensibilidade do Receptor dos Glucocorticoides .....	99

6-Stress Oxidativo e Balanço Proteases/Antiproteases .....	100
7-Apoptose .....	103
CAPÍTULO VII .....	107
ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS E INFLAMATÓRIAS DAS VIAS AÉREAS E DO PARÊNQUIMA PULMONAR .....	107
1-Alterações Estruturais e Inflamatórias das Vias Aéreas e do Parênquima Pulmonar .....	108
2-Inflamação Local e Sistémica .....	119
II PARTE - TRABALHO PESSOAL .....	145
CAPÍTULO I .....	147
OBJECTIVOS .....	147
CAPÍTULO II .....	149
ABORDAGEM GERAL DA CASUÍSTICA .....	149
1-Critérios de Selecção dos Doentes e Plano Geral do Estudo .....	149
2-Materiais .....	150
3-Métodos .....	154
CAPÍTULO III .....	159
RESULTADOS.....	159
1-Do Estudo Funcional Espirométrico Prévio .....	159
2-Do Estudo Clínico-Laboratorial .....	162
3-Do Estudo Radiológico .....	169
4-Do Estudo Funcional Respiratório .....	170
A-Da Vertente Ventilatória .....	170
B-Da Vertente Gasimétrica Arterial .....	175
5-Do Estudo das Populações e Subpopulações Celulares no Sangue Periférico .....	179
III PARTE – INTERPRETAÇÃO GLOBAL E DISCUSSÃO GERAL DOS RESULTADOS .....	185
IV PARTE – CONCLUSÕES FINAIS e RESUMO .....	217
CONCLUSÕES FINAIS .....	219
RESUMO .....	221
PRIMEIRA PARTE .....	221
SEGUNDA PARTE .....	222
ABSTRACT .....	226
FIRST PART .....	226
SECOND PART .....	227
BIBLIOGRAFIA .....	231
ÍNDICE .....	321



