

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

**FACULDADE DE MEDICINA**

**DAVI SIMÕES SALES**

**Análise de células T e B em vias aéreas de  
indivíduos fumantes obstrutivos e não  
obstrutivos**

**São Paulo**

**2016**

**DAVI SIMÕES SALES**

**Análise de células T e B em vias aéreas de indivíduos  
fumantes obstrutivos e não obstrutivos**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Programa de Fisiopatologia Experimental

Orientadora: Dra. Fernanda Degobbi Tenório Quirino dos Santos  
Lopes

**São Paulo**

**2016**

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

Preparada pela Biblioteca da  
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Sales, Davi Simões

Análise de células T e B em vias aéreas de indivíduos fumantes obstrutivos e não obstrutivos / Davi Simões Sales. -- São Paulo, 2016.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.  
Programa de Fisiopatologia Experimental.

Orientadora: Fernanda Degobbi Tenório Quirino dos Santos Lopes.

Descritores: 1.Doença pulmonar obstrutiva crônica 2.Enfisema pulmonar  
3.Tabagismo 4. Imunidade adaptativa 5. Células T regulatórias 6.Células B  
7.Células T

USP/FM/DBD-095/16

Este trabalho recebeu apoio financeiro:

FAPESP: Auxílio Regular FAPESP Processo nº 2014/12979-4

CNPq: Auxílio Universal CNPq nº Processo: 442679/2014-9

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

À minha esposa Cyntia, com todo meu amor e minha admiração por me impulsionar sempre a ser um ser humano melhor e pela presença e carinho incansáveis durante todo o processo de elaboração deste trabalho.

À minha filha Isabella, que me fez descobrir uma nova forma de amor e para quem me esforçarei ao máximo para fazer do mundo uma fábrica de sonhos.

À Deus por ter me dado o dom da vida e a graça de ser feliz.

## AGRADECIMENTOS

Ao fim da elaboração deste trabalho, sinto-me extremamente feliz em poder agradecer a todos os que, direta ou indiretamente, contribuíram para os caminhos que foram traçados durante o percurso desta pesquisa científica.

A Deus minha eterna gratidão e devoção pelo amparo e guia durante os momentos de incertezas, e por despertar em mim a fé, que me edifica e me mantém feliz todos os dias.

À minha esposa Cyntia, meu agradecimento pela compreensão durante todos os dias e noites em que estive ausente estudando e trabalhando, pelo otimismo nos momentos mais difíceis, pelo carinho constante e durante os momentos de inquietude, pelo incentivo na busca pela excelência no trabalho e pelo amor que cresce em mim a cada dia e me faz querer ser um ser humano melhor.

À minha linda filha Isabella, meu agradecimento pelo novo amor que descobri após a sua chegada. Desde que soube que viria ao mundo, já comecei a trabalhar incansavelmente para a sua felicidade e para fazer do mundo um lugar melhor e mais colorido para que seja possível a realização de todos os sonhos.

Agradeço à minha família, em especial meus pais, Nelson e Inez, por não medirem esforços para tornar possível a realização deste curso, mesmo com a distância geográfica que nos separou durante o período da pós-graduação, e pelo apoio amoroso incondicional em todas as fases de minha vida. À minha irmã Tainah e meu cunhado Vinícius, minha sincera gratidão por todas as palavras de incentivo e pela torcida incessável pelo meu sucesso.

Agradeço à minha família colateral, que em todos os momentos me motivam a continuar trabalhando e estudando, para me tornar um profissional melhor. A meus sogros, Barbosa e Élia, agradeço pelo carinho que me dedicam; a meus cunhados Laryssa e Mozart

pelo companheirismo e amizade de todos os dias; aos amigos Eduardo e Katiúscia pela inspiração acadêmica; e as meus lindos sobrinhos Beatriz, Sophia, Amanda e Arthur, por tornarem meus dias mais felizes.

Meu agradecimento constante à minha orientadora, professora Dra. Fernanda Lopes, que nunca desistiu de me ensinar e me motivar à conclusão deste trabalho, mesmo quando os compromissos de trabalho e acadêmico pareciam incompatíveis. Minha mais sincera gratidão pela compreensão em todos os momentos, pela paciência ao dedicar tempo para despertar em seus alunos o espírito acadêmico e pela inspiração à pesquisa científica.

Agradeço à minha orientadora de iniciação cinetífica, professora Dra. Daniela Gardano, que me despertou para a pesquisa científica e que me ensinou a dar meus primeiros passos rumo à conclusão deste curso.

Meu agradecimento ao professor Dr. Milton Arruda, que nos dá inspiração científica e nos motiva à maturidade acadêmica.

Agradeço ao Laboratório de Patologia em nome da Dra. Thais Mauad e Dra. Raquel Annoni, pela parceria acadêmica, por todo o material que nos foi disponibilizado para a execução da pesquisa, bem como por todo o conhecimento que comigo foi compartilhado. Essa coparticipação foi fundamental para a conclusão deste trabalho.

Agradeço à aluna de iniciação científica Ivy Zanchetta pela contribuição fundamental ao processo metodológico desta pesquisa.

Meu agradecimento ao Laboratório de Imunohistoquímica que me deu todo o embasamento para a realização das técnicas aplicadas durante a pesquisa. Agradeço, em especial a Esmeralda, que me acompanhou por longas tardes e que tornou possível a aplicação da metodologia proposta.



Agradeço ao Laboratório de Imagem e Som, pela oportunidade que nos foi dada para o digitalização das lâminas, levando o trabalho a um nível maior de qualidade, excelência e acurácia.

Agradeço ao Laboratório de Terapêutica Experimental - LIM20 pelos momentos incríveis e ao grande aprendizado que vivenciei ao longo desses anos. Obrigado às professoras Edna, Fernanda Arantes e Beatriz pela atenção que me foi disponibilizada; à Clarice pela amizade que em todos os momentos esteve presente na realização deste trabalho; à Juliana, meu agradecimento pela amizade diária e incentivo para a conclusão do curso; a Daniela e Tiyaki, que sempre me ofereceram ajuda na fase final da confecção deste trabalho; à Rosana pela solicitude em todos os momentos; a Fabíola, Rúbia, Alyne, Júlia e Camila pelos bons momentos compartilhados.

Agradeço à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, por me proporcionar o melhor do ensino e da pesquisa para me tornar um profissional de excelência.

Agradeço ao Hospital Nove de Julho que me dispensou nos momentos em que precisei me dedicar à pesquisa.

E, por fim, meu sincero agradecimento ao Fundo de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro para a conclusão deste trabalho científico.

## **SUMÁRIO**

## Sumário

<b>Resumo</b>	
<b>Abstract</b>	
<b>Lista de Abreviaturas e Siglas</b>	
<b>Lista de Símbolos</b>	
<b>Lista de Figuras</b>	
<b>Lista de Tabelas</b>	
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1.1 Definição de DPOC	2
1.2 Fatores de Risco para o Desenvolvimento da DPOC	3
1.3 Classificação dos Estágios da DPOC	4
1.4 Mecanismos para o Desenvolvimento da DPOC: o Papel da Imunidade Inata e Imunidade Adaptativa	5
1.5 Resposta Imune Inata na DPOC	6
Receptores de Membrana Toll (Toll Like Receptors)	6
Células Dendríticas	7
1.6 Resposta Imune Adaptativa na DPOC	7
Linfócitos T CD8+ e CD4+	7
Células T Regulatórias	8
Células B e T na Formação dos Tecidos Linfóides Associados aos Brônquios	9
<b>2. JUSTIFICATIVA</b>	<b>11</b>
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>13</b>
3.1 Objetivo Geral	14
3.2 Objetivos específicos	14
<b>4. MÉTODOS</b>	<b>15</b>
4.1 Casuística	16
4.2 Histologia	18
Coleta e Processamento de Tecido Pulmonar	18
Imunohistoquímica	19
4.3 Análise Morfométrica	21
4.4 Análise estatística	22
<b>5. RESULTADOS</b>	<b>23</b>

<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	<b>35</b>
<b>7. CONCLUSÕES</b> .....	<b>42</b>
<b>8. ANEXO</b> .....	<b>44</b>
<b>9. REFERÊNCIAS</b> .....	<b>46</b>

## RESUMO

Sales, DS. *Análise de células T e B em vias aéreas e tecidos linfoides associados aos brônquios em indivíduos fumantes obstrutivos em comparação com não obstrutivos*. [Dissertação]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2016.

Embora a fumaça do cigarro configure-se como o principal fator de risco para o desenvolvimento da DPOC, nem todos os fumantes desenvolvem a DPOC clinicamente significativa, sugerindo outros fatores intrínsecos ao indivíduo, como diferenças nas respostas imunológicas envolvidas na patogênese e progressão desta doença. **Objetivos:** Compreender melhor o papel da resposta imune adaptativa na progressão da DPOC. **Métodos:** Foram estudadas amostras de tecidos pulmonares de 21 indivíduos não fumantes (grupo controle); 22 fumantes não obstrutivos (FNO) e 17 fumantes com DPOC. A densidade de células CD4+ e CD8+, células T regulatórias (Treg) FOXP3+, células B e células positivas para interleucinas IL-10 e IL-17, e citocinas como CCL19, BAFF e TGF- $\beta$  foram avaliadas em pequenas e grandes vias aéreas, e em tecidos linfoides associados ou não aos brônquios (BALT e iBALT, respectivamente). **Resultados:** Observamos um aumento das células T CD4+ e CD8+ em pequenas e grandes vias aéreas, BALT e iBALT em fumantes; no entanto, os valores mais elevados foram detectados em pequenas vias aéreas dos indivíduos DPOC. Além disso, observou-se uma diminuição na expressão de TGF- $\beta$  em pacientes com DPOC em comparação aos grupos de FNO e controle em pequenas e grandes vias aéreas ao passo que uma diminuição na densidade de Treg foi observado apenas em pequenas vias aéreas, com consequente diminuição da densidade de células positivas para IL-10 em pequenas e

grandes vias aéreas. Em BALT observou-se uma resposta diferente, com um aumento na densidade de Treg no grupo DPOC, sem diferenças para as análises de IL-10. Houve um aumento da densidade de células positivas para IL-17 em pequenas e grandes vias aéreas e iBALT na DPOC. Conclusões: Observamos que a redução da atividade regulatória do processo inflamatório em pequenas vias aéreas e a progressão da obstrução em fumantes esteve associado à diminuição da densidade de células Treg e da expressão de IL-10 e aumento da expressão de IL-17. Além disso, verificou-se diferenças entre o perfil inflamatório nos compartimentos pulmonares estudados.

## ABSTRACT

**Sales, DS.** *Airways and Bronchus Associated Lymphoid Tissue T and B cells analysis on obstructive smokers compared to nonobstructive smokers.* São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2016.

Although cigarette smoke is configured as the primary risk factor for the development of COPD, not all smokers develop COPD clinically significant, suggesting that there are other factors intrinsic to the individual, such as differences in immune responses involved in the pathogenesis and progression of this disease. **Objectives:** To better understand the role of the adaptive immune response in the progression of COPD. **Methods:** Lung tissue samples from 21 nonsmokers were studied (control group); 22 non-obstructive smokers (NOS) and 17 COPD smokers. The density of CD4 + cells and CD8 + regulatory T cells (Treg) FOXP3 + cells, B cells and positive cells for interleukins IL-10 and IL-17, and cytokines as CCL19, BAFF and TGF- $\beta$  were evaluated in large and small airways, and lymphoid tissue associated with bronchi or not (BALT and iBALT, respectively). **Results:** We observed an increase in CD4 + T cells and CD8 + in small and large airways, BALT and iBALT in smokers; however, the highest amounts were detected in the small airways of COPD patients. Furthermore, there was a decrease in TGF- $\beta$  expression in COPD patients compared to FNO and control groups in large and small airways while a decrease in Treg density was observed only in small airway and consequent decrease in the density of cells positive for IL-10 in large and small airways. In BALT we observed a different response, with an increase in Treg density in COPD patients without differences in IL-10 analysis. There was an increase in cell density for IL-17 in large and small airways, and iBALT in COPD. **Conclusions:** We observed that reduction of inflammation regulatory activity in small

airways obstruction and progression of smoking was associated with decreased Treg cell density and IL-10 expression and increased IL-17 expression. Furthermore, there are differences between the inflammatory profile in the lung compartments studied.

**Descriptors:** 1. Pulmonary disease, chronic obstructive 2. Pulmonary Emphysema 3. Smoking 4. Adaptive immunity 5. Regulatory T cells 6. T cells 7. B cells.



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>%pred</b>	Porcentagem do valor predito
<b><math>\alpha</math>1-AT</b>	Alfa-1 antitripsina
<b>BAFF</b>	Fator de ativação de células B
<b>BALT</b>	Tecido linfoide associado ao brônquio
<b>BD</b>	Broncodilatador
<b>CA</b>	Califórnia
<b>CAPPesq</b>	Comitê de aprovação de projetos de pesquisa
<b>CD</b>	Grupamento de diferenciação de linfócitos
<b>CCL</b>	Ligante de quimiocinas quimiotáticas para linfócitos
<b>CVF</b>	Capacidade Vital Forçada
<b>CXCL</b>	Ligante de quimiocinas quimiotáticas para neutrófilos
<b>DIN</b>	Dinamarca
<b>DP</b>	Desvio padrão
<b>DPOC</b>	Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
<b>EUA</b>	Estados Unidos da América
<b>FOXP3</b>	Fator de Transcrição para células T regulatórias
<b>FNO</b>	Fumantes não-obstrutivos
<b>GOLD</b>	<i>Global Initiative for Obstructive Lung Disease</i>
<b>HCFMUSP</b>	Hospital Das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de Hidrogênio
<b>iBALT</b>	Tecidos linfoides não associados aos brônquios
<b>IL</b>	Interleucina
<b>ING</b>	Inglaterra
<b>iTreg</b>	Células T regulatórias induzidas
<b>LBA</b>	Lavado Broncoalveolar
<b>LIM-20</b>	Laboratório de Terapêutica Experimental
<b>mEPHX1</b>	Epóxido hidrolase microssomal
<b>MHC-2</b>	Complexo de histocompatibilidade classe 2
<b>MMP</b>	Metaloproteinase de matriz

<b>nTreg</b>	Células T regulatórias naturais
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>Th</b>	Células T auxiliares
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Fator de crescimento tumoral beta
<b>TLR</b>	<i>Toll-like receptors</i>
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Fator de necrose tumoral alfa
<b>Treg</b>	Células T regulatórias
<b>VEF<sub>1</sub></b>	Volume expirado forçado no primeiro segundo
<b>VEF<sub>1</sub>/CVF</b>	Razão Volume expirado forçado no primeiro segundo / Capacidade vital forçada

## LISTA DE SÍMBOLOS

<	Menor
<b>Mm</b>	Micrometro
<b>mm</b>	Milímetro
<b>N</b>	Número de sujetos no grupo
<b>%</b>	Percentual

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1:** Imagens representativas da análise imunohistoquímica das células e citocinas inflamatórias nas vias aéreas de pacientes com DPOC. **..Error! Bookmark not defined.**

**Figura 2:** Imagens representativas da análise imunohistoquímica de células T regulatórias FOXP3 em tecido linfóide associado ao brônquio **Error! Bookmark not defined.**

**Figura 3:** Densidade de células TCD4+ em vias aéreas e tecidos linfóides. .... **Error! Bookmark not defined.**5

**Figura 4:** Densidade de células TCD8+ em vias aéreas e tecidos linfóides ... **Error! Bookmark not defined.**6

**Figura 5:** Densidade de células B em vias aéreas e tecidos linfóides ..... 27

**Figura 6:** Densidade de células T regulatórias em vias aéreas e tecidos linfóides. .... 28

**Figura 7:** Densidade de células positivas para IL-10 em vias aéreas e tecidos linfóides ..... **Error! Bookmark not defined.**

**Figura 8:** Densidade de células positivas para TGF $\beta$  em vias aéreas e tecidos linfóides ..... **Error! Bookmark not defined.**

**Figura 9:** Densidade de células positivas para IL-17 em vias aéreas e tecidos linfóides ..... **Error! Bookmark not defined.**

**Figura 10:** Densidade de células positivas para CCL19 em vias aéreas e tecidos linfóides ..... **Error! Bookmark not defined.**2

**Figura 11:** Densidade de células positivas para BAFF em vias aéreas e tecidos linfóides ..... 33

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Diagnóstico inicial dos sujeitos da pesquisa .....	17
<b>Tabela 2.</b> Imunohistoquímica – Anticorpos primários e secundários .....	19
<b>Tabela 3.</b> Sujeitos do estudo .....	24
<b>Tabela 4.</b> Correlação entre a carga tabágica e a densidade de marcadores inflamatórios em pequenas e grandes vias aéreas .....	34

## **INTRODUÇÃO**

## INTRODUÇÃO

### 1.1. Definição e Fatores Epidemiológicos da Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC)

A doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) é uma doença caracterizada pela limitação lenta e progressiva ao fluxo aéreo, relacionada à resposta inflamatória anormal à inalação de gases e partículas nocivas, que apresenta caráter não totalmente reversível tanto espontaneamente quanto por via medicamentosa <sup>(1)</sup>. É considerada uma entidade clínica cuja prevenção é factível e seu tratamento é particularizado de acordo com a sintomatologia de cada indivíduo <sup>(2)</sup>.

A bronquite crônica e o enfisema pulmonar são as principais manifestações clínicas da DPOC. A bronquite crônica é caracterizada por obstrução das pequenas vias aéreas e presença de tosse com duração superior a três meses por mais de dois anos consecutivos. No enfisema pulmonar, se observa o alargamento dos espaços aéreos distais com destruição do parênquima pulmonar, perda da elasticidade pulmonar e fechamento de pequenas vias aéreas sem evidência de fibrose <sup>(3,4)</sup>.

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), a DPOC foi considerada a quinta maior causa de morte no mundo em 2002, responsável por aproximadamente 2,7 milhões de óbitos neste ano <sup>(5)</sup>. Atualmente, a DPOC é considerada a quarta maior causa de mortes no mundo e estima-se que até 2030 torne-se a terceira em todo o mundo <sup>(6)</sup>.

Enquanto a taxa de mortalidade de doenças como infarto agudo do miocárdio e outras doenças cardíacas tem diminuído nos últimos 40 anos, em relação à DPOC esse número dobrou entre os anos de 1970-2002 <sup>(7)</sup>. É observado um aumento gradual da porcentagem desta doença em populações com faixa etária mais avançada <sup>(5)</sup>.

A OMS, em seu documento denominado *Global Initiative for Obstructive Lung Disease* (GOLD) <sup>(1)</sup>, caracteriza importantes diferenças na prevalência da DPOC entre países. Dados recentes relacionam uma diminuição na quantidade de fumo e redução da poluição atmosférica em países desenvolvidos como fator decisivo para uma estabilização e diminuição da incidência e prevalência da doença <sup>(8,9)</sup>. Em países em desenvolvimento, entretanto, sua

prevalência tem aumentado progressivamente, devido a um aumento no hábito tabágico e redução de outras causas de mortes <sup>(2)</sup>.

## 1.2. Fatores de risco para o desenvolvimento da DPOC

A DPOC é uma doença poligênica, sendo um exemplo de interação entre susceptibilidade genética e estímulo ambiental <sup>(2)</sup>. Um dos fatores de risco genético é a deficiência hereditária de alfa-1 antitripsina ( $\alpha_1$ -AT), de caráter recessivo e presente em 1 a 2% dos pacientes acometidos com a doença <sup>(1,10)</sup>.

Já foram identificadas regiões do genoma que contém genes provavelmente relacionados à susceptibilidade para DPOC. Foi encontrada associação genética com o fator transformador de crescimento beta 1 (TGF- $\beta$ 1), a epóxido hidrolase microsomal (mEPHX1) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) <sup>(1)</sup>, além de uma relação de proteção de um polimorfismo na proteína MMP12 <sup>(11)</sup>.

Em não fumantes, já foram encontradas correlações positivas entre a depleção da função pulmonar e fumo gestacional, desenvolvimento de asma ou infecções respiratórias na infância <sup>(1,12)</sup>, bem como há uma relação entre o desenvolvimento de sintomas respiratórios crônicos em pacientes com histórico de tuberculose, exposição à poluição atmosférica, inalação ocupacional de gases tóxicos ou poluentes e fumo passivo <sup>(13)</sup>.

Ao serem estudados fatores sociodemográficos e seu impacto no desenvolvimento da obstrução ao fluxo aéreo, a idade permanece como um fator de risco conhecido, porém questiona-se se o envelhecimento populacional em si leva ao desenvolvimento ou se a idade superior reflete uma exposição continuada a diversos fatores de agressão pulmonar <sup>(1)</sup>.

A comparação de gênero, por sua vez, traz dados conflitantes: estudos prévios demonstram maior mortalidade no gênero masculino <sup>(1)</sup>, dados observados em países desenvolvidos trazem uma prevalência semelhante entre homens e mulheres <sup>(14,15)</sup>, e alguns estudos apontam o sexo feminino como o mais susceptível aos efeitos da fumaça do cigarro <sup>(9,16)</sup>.

A pobreza também se apresenta como um fator de risco que contribui para a sua progressão, uma vez que dados sugerem que um padrão socioeconômico ruim pode contribuir



para uma maior prevalência da doença. Porém, uma análise qualitativa dos dados é necessária para descrever quais componentes da pobreza contribuem para esse fato <sup>(1)</sup>.

Segundo a OMS, o tabagismo ainda é o principal fator de risco para o desenvolvimento da DPOC <sup>(1,17)</sup>. Em vários países, a DPOC também está relacionada à inalação de poluentes decorrentes da queima de combustíveis fósseis e a exposições inalatórias ocupacionais a poeiras e gases tóxicos. Entretanto, nem todos os tabagistas desenvolvem DPOC clinicamente significativa, o que sugere que há outros fatores intrínsecos ao indivíduo envolvidos na sua patogênese <sup>(1)</sup>.

### 1.3. Classificação dos estágios da DPOC

Segundo o GOLD, atualizado em 2014, a DPOC pode ser classificada em quatro estágios baseados nos parâmetros de função pulmonar, determinados por espirometria de incentivo, para a avaliação da severidade na limitação ao fluxo aéreo. Entre estes parâmetros, destacam-se: VEF<sub>1</sub>: volume expirado forçado no primeiro segundo, bem como a razão entre esta variável e a CVF, capacidade vital forçada: VEF<sub>1</sub>/CVF. Valores desta razão, em espirometria pós-broncodilatador, menores que 0,70 caracterizam a presença de limitação ao fluxo aéreo <sup>(1)</sup>.

No *Estágio I*, a DPOC é considerada *leve* e é determinada em pacientes cujo padrão espirométrico apresenta uma pequena alteração ( $VEF_1/CVF < 0,70$ ;  $VEF_1 \geq 80\%$  do valor predito), podendo haver ou não sintomas presentes. Muitos destes pacientes desconhecem que sua função pulmonar é anormal.

No *Estágio II*, a DPOC é classificada como *moderada* e é caracterizada por uma piora da limitação ao fluxo aéreo ( $VEF_1/CVF < 0,70$ ;  $50\% \leq VEF_1 < 80\%$  do valor predito) associada a aparição de sintomas e a busca por atendimento médico.

No *Estágio III*, a DPOC é considerada *grave* e tem como característica uma limitação importante do fluxo aéreo ( $VEF_1/CVF < 0,70$ ;  $30\% \leq VEF_1 < 50\%$  do valor predito), associada ao encurtamento do padrão respiratório, diminuição da tolerância ao exercício, fadiga generalizada e exacerbações constantes do quadro, atingindo de forma direta a qualidade de vida dos pacientes.

Já no *Estágio IV*, a *DPOC* é considerada  *muito grave* e está relacionada a uma limitação grave ao fluxo aéreo ( $VEF_1/CVF < 0,70$ ;  $VEF_1 < 30\%$  do valor predito), além disso, há presença de insuficiência respiratória associada a sinais clínicos de insuficiência cardíaca direita, com conseqüente redução da qualidade de vida. Nestes pacientes, qualquer exacerbação do quadro pode representar um risco para a vida <sup>(1)</sup>.

Além das alterações pulmonares, os pacientes enfisematosos apresentam manifestações sistêmicas que repercutem diretamente para a qualidade e estimativa de vida, incluindo a depleção alimentar e disfunção dos músculos esqueléticos <sup>(17)</sup>.

Para um melhor manejo clínico, é necessário que seja realizada uma avaliação detalhada, levando em consideração os padrões espirométricos, a referência sintomatológica e o risco de exacerbações que levem a internações hospitalares, que caracterizam um pior prognóstico aos pacientes.

#### **1.4. Mecanismos para o desenvolvimento da DPOC: papel da imunidade inata e adaptativa para a progressão da doença**

A principal característica da *DPOC* é o desenvolvimento de uma resposta inflamatória exacerbada e crônica à inalação de fumaça de cigarro.

Macrófagos, neutrófilos e linfócitos são os tipos celulares característicos deste processo inflamatório <sup>(18)</sup>. Alguns estudos demonstram um papel importante dos linfócitos T CD8+ (aumento de migração destas células tanto em regiões peribrônquicas quanto dispersos no parênquima) na manutenção desta resposta inflamatória crônica e na piora da obstrução das vias aéreas <sup>(19,20)</sup>

A susceptibilidade genética, assim como fatores ambientais e supressão da resposta imunológica estão diretamente relacionados à progressão da *DPOC* para os estágios mais graves da doença <sup>(21)</sup>.

Embora a maior parte dos fumantes apresente evidências de algum processo inflamatório pulmonar, somente parte destes apresentará uma resposta inflamatória amplificada, sendo que os mecanismos envolvidos neste processo ainda estão pouco descritos <sup>(22)</sup>. Acredita-se que a progressão da *DPOC* esteja relacionada à mudança da imunidade inata (inespecífica) para a imunidade adaptativa (adquirida) <sup>(23,24)</sup>.

Com o passar do tempo, todo fumante sofrerá algum grau de lesão tecidual, promovendo a liberação de restos teciduais, os quais poderão ser reconhecidos como autoantígenos. No entanto, nem todos os fumantes irão apresentar reações a estes antígenos e entre os que apresentarem reações estas apresentarão intensidades diferentes, o que explica os diferentes graus da DPOC <sup>(21)</sup>.

Pesquisas recentes mostram que a precoce interrupção do hábito tabágico alivia a progressão da doença, bem como suas manifestações sintomáticas. Porém, os sintomas não desaparecem totalmente, o que também indica a presença de fatores endógenos aos indivíduos, como o estresse oxidativo e a autoimunidade, associados a sua patogênese <sup>(21)</sup>.

Descreveremos a seguir a sequência de eventos decorrentes da resposta inflamatória em presença da fumaça de cigarro, detalhando a importância da imunidade inata e adaptativa no curso de progressão da DPOC.

### **1.5. Resposta imune inata na DPOC**

A primeira linha de defesa pulmonar contra agentes externos corresponde à resposta imune inata e é constituída pelo sistema de defesa mucociliar e pela barreira epitelial, além das células inflamatórias, como macrófagos, células dendríticas, monócitos, neutrófilos e mastócitos <sup>(25,26)</sup>.

#### ***Receptores de membrana Toll (Toll Like Receptors)***

A exposição à fumaça de cigarro promove lesão de células epiteliais e consequente liberação de produtos derivados desta destruição, os quais irão se ligar aos receptores de membrana Toll - TLR (Toll Like Receptors) no epitélio, induzindo as células epiteliais remanescentes a produzirem mediadores inflamatórios <sup>(27)</sup>.

O reconhecimento de agentes patogênicos através dos sinais dos TLR promove a ativação da cascata de reações e a produção de citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral (TNF $\alpha$ ) e o ligante de quimiocina CXCL8 por células epiteliais e macrófagos alveolares. Desta forma, ocorrerá a expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais e consequente recrutamento de neutrófilos e monócitos para os pulmões <sup>(25,28)</sup>.

### ***Células Dendríticas***

Esta sequência de eventos acarreta a maturação das células dendríticas (apresentadoras de antígenos) e a migração destas células para os órgãos linfoides, onde, se as condições forem favoráveis, ocorrerá a ativação de células T e consequente progressão da doença <sup>(21)</sup>.

No entanto, na maioria dos fumantes o processo inflamatório, decorrente do hábito de fumar, não progride além da resposta mediada pela imunidade inata. Sendo que estes mesmos indivíduos apresentam função respiratória normal ou correspondente ao estágio I da DPOC, seguindo os critérios do GOLD <sup>(21)</sup>.

## **1.6. Resposta imune adaptativa na DPOC**

Estudos recentes apontam a importância do processo de imunidade adaptativa na progressão da inflamação e da obstrução na DPOC, evidenciando que o processo inflamatório ultrapassa a barreira da árvore brônquica, atingindo a circulação sistêmica e os linfonodos regionais <sup>(29,30)</sup>.

### ***Linfócitos T CD8+ e CD4+***

Se este processo inflamatório não for controlado, as células dendríticas irão expressar altos níveis de proteínas como as do complexo histocompatibilidade classe 2 (MHC-2) e moléculas como CD80 e CD86 e já na região dos folículos linfoides irão fazer a apresentação dos antígenos às células T <sup>(31)</sup>, promovendo a ativação e migração de células T CD4+ e CD8+ para o trato respiratório, com consequente formação de tecidos linfoides associados ou não aos brônquios (BALT e iBALT, respectivamente).

Em indivíduos fumantes que apresentam DPOC é observado um aumento de células dendríticas maduras ao redor das vias aéreas periféricas, bem como, da expressão de células CD4+, CD8+ <sup>(32,33,34)</sup>.

As células T CD4+ *naive* podem ser diferenciadas em diversas linhagens de células T efetoras, incluindo T helper 1 (Th1), T helper 9 (Th9) e T helper 17 (Th17), e linhagens de células T regulatórias (Treg), como FOXP3+CD4+CD25+, FOXP3 natural (nTreg), FOXP3

induzidas (iTreg) e T helper 3 (Th3), contando com funções específicas e relacionadas com os processos pró e anti-inflamatórios <sup>(35)</sup>.

### *Células T regulatórias*

FOXP3 é a denominação dada à proteína que age como fator de transcrição no desenvolvimento e função de células T regulatórias. Sua expressão intracelular é atualmente o principal marcador para Treg em humanos <sup>(36)</sup>. Em um processo autoimune, uma deficiência na atividade das Treg pode permitir que outras células autoimunes apresentem efeitos citotóxicos e danosos aos próprios tecidos do corpo <sup>(35)</sup>. Tal fator de transcrição será um de nossos objetos de estudo, no intuito de avaliarmos a falha ou ativação da regulação por este tipo celular no controle do processo inflamatório em pulmões dos sujeitos desta pesquisa.

A diferenciação de Th17 e iTreg a partir de células T naive depende da presença ou não do fator de crescimento TGF- $\beta$ . Baixos níveis de TGF- $\beta$  induzem a formação de Th17, já o processo reverso leva a produção de células T regulatórias a partir de FOXP3 induzidas ou iTreg. Um desequilíbrio neste sistema culmina no surgimento de patologias autoimunes e pode estar relacionado ao desenvolvimento da DPOC <sup>(35)</sup>.

O controle da proliferação e migração de células T para o trato respiratório é mediado por subtipos de linfócitos CD4+, denominados Treg, as quais apresentam funções imunorregulatórias, inibindo a autoimunidade e suprimindo a inflamação. Esse efeito imunossupressor ocorre devido à produção de citocinas anti-inflamatórias como a Interleucina 10 (IL-10) e TGF- $\beta$  <sup>(29,37)</sup>.

Em fumantes que apresentam DPOC e enfisema é observado aumento de células T regulatórias e maior expressão de IL-10 em plasma quando comparados aos controles <sup>(38)</sup>. Por outro lado, Lee e colaboradores, ao estudarem amostras de parênquima pulmonar, propuseram que existe um decréscimo na densidade de células T regulatórias em indivíduos com obstrução ao fluxo aéreo, sendo este fato associado com a progressão da DPOC, o que corrobora que a proposta de uma diminuição da resposta regulatória nessa população <sup>(24)</sup>.

Apesar de o papel exato dos subtipos de células T nos pacientes com DPOC ainda configurar-se sob constante estudo, artigos recentes demonstraram que a patologia apresenta caráter autoimune mediado por estas células, a partir da presença de autoanticorpos e células T CD4+ autorreativas em plasma de pacientes. Tal evidencia pode estar relacionada ao

importante caráter regulatório dos subtipos de células T CD4+ na patogênese da patologia (39,40).

A inflamação pulmonar em pacientes com DPOC grave é caracterizada não somente por aumento de linfócitos CD4+ e CD8+ (41,42), mas também por células B (40), os quais continuam aumentados mesmo após anos o abandono do hábito de fumar.

### ***Células B e T na formação dos tecidos linfoides associados aos brônquios (BALT)***

Os linfócitos quando migram para os pulmões geralmente formam estruturas organizadas, conhecidas como tecidos linfoides terciários, os quais são compostos por linfócitos B centrais e linfócitos T predominantemente periféricos (39,40). Estas estruturas se encontram ao redor de vias aéreas e são denominadas BALT, responsáveis por iniciar as respostas imunes locais e por manter a memória de resposta celular nos pulmões (25).

Também estão presentes nestas estruturas, células dendríticas apresentadoras de antígenos, perpetuando desta forma o processo inflamatório. Tsumakido e colaboradores (40) demonstraram um papel importante das células dendríticas na progressão da resposta inata para a adaptativa e piora da obstrução em pacientes DPOC.

Já foi evidenciada a presença de células T regulatórias, representadas pelo fator de transcrição FOXP3, no BALT de indivíduos com DPOC, quando comparados a fumantes saudáveis (38), o que pode influenciar na regulação da resposta imune adaptativa durante o desenvolvimento de uma inflamação pulmonar local ao passo que a doença progride (36).

Plumb e colaboradores (38) descreveram em pulmões de pacientes DPOC estruturas semelhantes aos BALT, no entanto sem uma compartimentalização entre as células B e T, denominadas “clusters” ou iBALT (BALT induzidos), estruturas de formação de tecido linfoide terciário, em estágios iniciais, não associadas às vias aéreas, mas dispersas no parênquima.

A expressão de células T regulatórias nos folículos linfoides pode ocorrer para a tentativa de supressão da interação entre células dendríticas e células T (38,40), bem como da resposta proliferativa de células Th17 (44), o que, por consequência, ativará uma inibição da diferenciação de células T CD8+ (38,40) e da proliferação de células B (38).

É importante ressaltar que não é observada a presença de BALT na maioria das amostras de pulmões de indivíduos que não apresentam doença pulmonar (45). Os tecidos linfoides são descritos somente em indivíduos que apresentam doença pulmonar com

manifestações clínicas e subclínicas e podem estar associados tanto às vias aéreas quanto ao parênquima, caracterizando neogênese destes tecidos nos pulmões <sup>(25)</sup>.

Inicialmente, a presença destes tecidos linfoides nos órgãos nos quais a inflamação está presente seria com a finalidade de erradicar o processo inflamatório. Quando ocorre uma compartimentalização dos diferentes tipos celulares (linfócitos T e B) no BALT, este tecido é reconhecido como um órgão linfoide terciário, diferente do primário (medula e timo) e secundário (linfonodos). A subdivisão das células B e T no BALT ocorre por ação de citocinas quimiotáticas como CCL19 e CCL21, CXCL12 e CXCL13 <sup>(26,40)</sup>.

O termo neogênese linfoide se refere ao desenvolvimento de estruturas linfoides que se assemelham a órgãos linfoides secundários em tecidos nos quais se observa um processo crônico inflamatório presentes em doenças infecciosas e autoimunes <sup>(46,47)</sup>

Desta forma, o papel destes tecidos linfoides para a fisiopatologia da DPOC ainda é controverso. Ao mesmo tempo em que estes tecidos apresentam importante atividade na ação contra agentes infecciosos e bacterianos, eles também são responsáveis por manter o processo inflamatório, podendo acarretar progressão da obstrução brônquica em indivíduos fumantes e em alguns casos uma resposta autoimune, na qual restos teciduais do pulmão serão reconhecidos como antígenos <sup>(48-51)</sup>.

**JUSTIFICATIVA**



## 2. JUSTIFICATIVA

Com o passar do tempo, todo fumante sofrerá algum grau de lesão tecidual, promovendo a liberação de restos teciduais, os quais serão reconhecidos como antígenos, entretanto nem todos os fumantes irão apresentar reações a estes antígenos e entre os que apresentarem reações, estas apresentarão intensidades diferentes, o que explica os diferentes graus da DPOC.

Considerando que o epitélio respiratório atua como primeiro e principal mecanismo de defesa contra agentes exógenos por meio da regulação da imunidade inata e adaptativa e que a deficiência desta resposta de defesa está fortemente associada à progressão da DPOC, um entendimento mais pormenorizado da resposta inflamatória nas vias aéreas, bem como da formação de tecidos linfoides associados aos brônquios poderá fornecer novas perspectivas sobre a patogênese desta doença e um melhor entendimento das diferenças entre indivíduos que fumam e se tornam obstrutivos e os que fumam e não apresentam depleção significativa da função pulmonar.

**OBJETIVOS**

### 3. OBJETIVOS

#### *Objetivos gerais*

Assim, torna-se importante um estudo no qual façamos uma caracterização detalhada de tecidos de pacientes fumantes obstrutivos e não obstrutivos, através das observações dos tipos celulares e das interleucinas envolvidas no processo de mudança da imunidade inata para a adaptativa, bem como a presença de BALT e iBALT e a caracterização destas estruturas nos pulmões. Estas observações serão importantes para um melhor entendimento das diferenças dos mecanismos fisiopatológicos que contribuem para a progressão ou não da obstrução brônquica nestes indivíduos.

#### *Objetivos específicos*

- Analisar a diferença de resposta inflamatória em vias aéreas pequenas e grandes de indivíduos fumantes que desenvolvem DPOC em comparação aos indivíduos fumantes que não desenvolvem obstrução ao fluxo aéreo.
- Avaliar o comportamento da resposta imune na regulação do processo inflamatório em fumantes
- Verificar se existem diferenças quanto ao número de BALT e i BALT entre indivíduos fumantes obstrutivos comparados aos fumantes não obstrutivos e aos não fumantes;
- Verificar as possíveis diferenças entre os tipos celulares nos fumantes não-obstrutivos e fumantes com DPOC como linfócitos T CD4+ e CD8+, células T regulatórias e células B;
- Avaliar a expressão de interleucinas como IL10, IL17, TGF- $\beta$ , CCL19 e BAFF vias aéreas, BALT e iBALT.

**MÉTODOS**

## 4. MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAPPesq – HCFMUSP), sob o protocolo número 195.416/2013 (anexo 1). Todos os indivíduos incluídos neste estudo assinaram um termo de consentimento livre esclarecido.

### 4.1. Casuística

Foram estudados 60 indivíduos submetidos à ressecção pulmonar por tumor metastático ou primário no período de 2001 a 2007. Dados demográficos, história médica, hábito tabágico, medicações e prova de função pulmonar pré e pós broncodilatador (BD) foram obtidos a partir da análise de prontuários.

Os sujeitos do estudo foram divididos em três grupos, de acordo com o hábito tabágico e prova de função pulmonar:

*Grupo Controle (n=21)*: indivíduos não tabagistas, sem doença pulmonar prévia e prova de função pulmonar normal ( $VEF_1/CVF > 70\%$  e  $VEF_1 > 80\%$ ).

*Grupo Fumantes Não Obstrutivos (FNO) (n=22)*: indivíduos tabagistas ou ex-tabagistas, estes com cessação de fumo  $> 1$  mês, sem doença pulmonar prévia e prova de função pulmonar normal ( $VEF_1/CVF > 70\%$  e  $VEF_1 > 80\%$ ).

*Grupo Fumantes Obstrutivos (DPOC) (n=17)*: indivíduos tabagistas ou ex-tabagistas, estes com histórico de cessação de fumo  $> 1$  mês, com prova de função pulmonar positiva para a obstrução de fluxo aéreo ( $VEF_1/CVF < 70\%$ ). Quatorze pacientes deste grupo (cinco em estágio GOLD I - DPOC leve <sup>(1)</sup>; oito em estágio GOLD II - DPOC moderado; e um em estágio GOLD III - DPOC severo) apresentaram prova de função pulmonar com valores pós BD. A reversibilidade dos valores pós BD foi menor a 12% em relação à prova pré BD em todos os indivíduos.

Em relação ao diagnóstico inicial, foi observado que 47,5% dos pacientes submetidos à cirurgia de ressecção pulmonar apresentavam tumor metastático de pulmão e 52,5% realizaram o procedimento por tumor primário de pulmão (tabela 1). Dentre os tumores metastáticos, foram encontrados diagnósticos primários de neoplasia de mama (n=4), adenocarcinoma de cólon (n=4), neoplasia de próstata (n=2), carcinoma espinocelular de língua (n=2), melanoma (n=2), osteosarcoma (n=2), neoplasia de útero (n=1), leucemia

linfoide crônica (n=1), fibrohistocistoma (n=1). 1 paciente do grupo controle apresentou dados inconclusivos em seu prontuário que não permitiram esta análise.

**Tabela 1. Diagnóstico Inicial**

	<b>Controle (n=20)</b>	<b>FNO (n=22)</b>	<b>DPOC (n=17)</b>
<b>Tumor Primário</b>	<b>13</b>	<b>12</b>	<b>15</b>
<b>Tumor Metastático</b>	<b>7</b>	<b>10</b>	<b>2</b>

Pacientes com diagnóstico clínico de asma, bronquiectasia, doença pulmonar infecciosa, deficiência de  $\alpha_1$ -antitripsina e doença pulmonar intersticial não foram incluídos na pesquisa.

## **4.2. Histologia**

### ***Coleta e Processamento do Tecido Pulmonar***

Neste estudo foi utilizado material de tecido pulmonar em blocos de parafina fornecido pelo departamento de patologia da FMUSP, analisado a partir da extração de dois a quatro fragmentos de tecido pulmonar periférico, localizados longe do tumor ao qual o indivíduo foi submetido à ressecção cirúrgica. Os fragmentos foram fixados em formaldeído tamponado a 10% e divididos em blocos de parafina. Cortes de 4 $\mu$ m de tecido pulmonar foram cortados com hematoxilina e eosina (H&E) para análise histológica inicial.

### ***Imunohistoquímica***

Para a reação de imunohistoquímica, os cortes foram desparafinados, hidratados e submetidos a uma solução de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a 3% por 40 minutos para inibir a ação da peroxidase endógena. Logo depois realizou-se a incubação *overnight* com o anticorpo primário. Objetivou-se utilizar como anticorpo secundário o complexo estreptoavidina-biotina (LSAB; DAKO, Glostrup, Dinamarca). Os cortes foram corados

através da utilização do cromógeno diaminobenzidina por 10 minutos e contra corados com Hematoxilina de Mayer por aproximadamente 1 minuto.

Os controles negativos foram realizados com a substituição do anticorpo primário por um anticorpo controle do mesmo isotipo e com a substituição do anticorpo primário por uma solução salina tamponada com fosfato (Phosphatebuffered saline).

A relação dos anticorpos primários e secundários utilizados e sua subsequente diluição estão expressos na tabela 2.

**Tabela 2. Imunohistoquímica – anticorpos primários e secundários**

	<b>Primary Antibodies</b>	<b>Dilution</b>	<b>Secondary Antibodies</b>
<b>CD4</b>	IS628, Clone 123C3 Dako, Glostrup, DIN	<b>1:300</b>	Novolink Polymer DS Novocastra Newcastle, ING
<b>CD8</b>	Clone IF6 Novocastra, Newcastle, ING	<b>1:400</b>	Novolink Polymer DS Novocastra Newcastle, ING
<b>CD20</b>	M0639 Dako, Glostrup, DIN	<b>1:20000</b>	Novolink Polymer DS Novocastra Newcastle, ING
<b>FOXP3</b>	Ab10563 Abcam, Cambridge, ING	<b>1:200</b>	MACH 4 AP-Polymer Biocare Medical California, EUA
<b>IL10</b>	Clone 90220, MAB874 R&D Systems, Boston, EUA	<b>1:50</b>	Novolink Polymer DS Novocastra Newcastle, ING
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	455G AHP R&D Systems, Boston, EUA	<b>1:1500</b>	Novolink Polymer DS Novocastra Newcastle, ING
<b>IL17</b>	Clone 35409, MAB388 R&D Systems, Boston, EUA	<b>1:300</b>	Novolink Polymer DS Novocastra Newcastle, ING
<b>CCL19</b>	Clone 54909, MAB361 R&D Systems, Boston, EUA	<b>1:7500</b>	Novolink Polymer DS Novocastra Newcastle, ING
<b>BAFF</b>	AF 124 R&D Systems , Boston, EUA	<b>1:3000</b>	Novolink Polymer DS Novocastra Newcastle, ING

A imunohistoquímica para quantificação dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> ao redor das vias aéreas fez-se utilizando o anticorpo monoclonal CD56 (IS628, Clone 123C3, Dako, Glostrup, Dinamarca), para marcação em humanos, diluição 1:400. Para marcação de linfócitos T CD8<sup>+</sup>, utilizou-se o anticorpo monoclonal CD56 (IS628, Dako, Glostrup, Dinamarca), para marcação em humanos, diluição 1:400 (figura 1).

Para marcação de células T regulatórias utilizou-se o anticorpo policlonal, para marcação em humanos, FOXP3 (AF3240, R&D Systems, Boston, EUA), diluição padronizada em 1:200 (figuras 1 e 2).

As marcações para IL-10 e TGF- $\beta$  realizaram-se com a utilização dos anticorpos IL-10 R (Clone 90220, MAB 874, R&D Systems, Boston EUA), diluição 1:1000 e TGF- $\beta$  (Clone 35409, MAB 388, R&D systems, Boston, EUA), diluição 1:1500; ambos para marcação em humanos (figura 1).

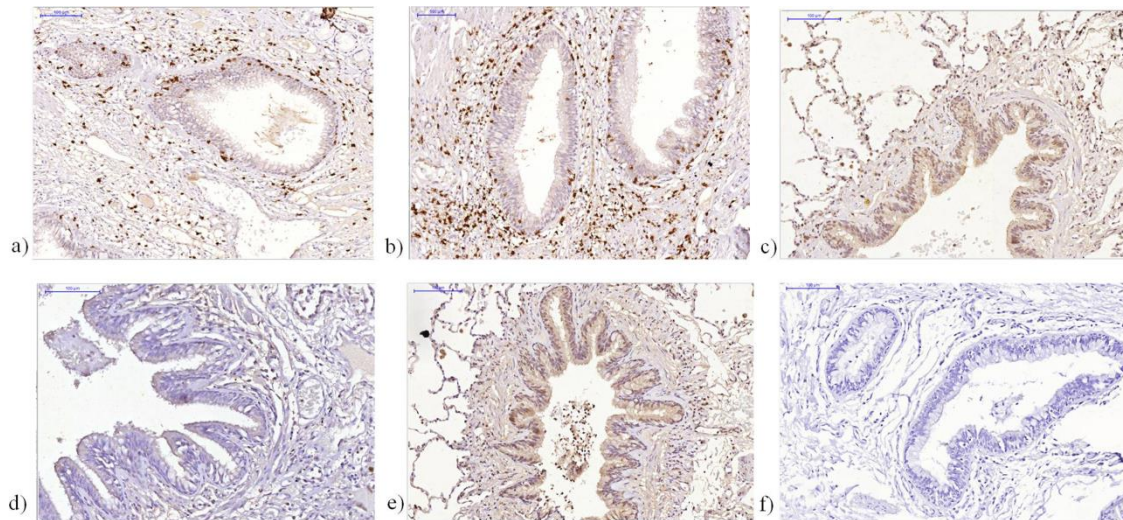
A marcação de células positivas para IL-17 fez-se através da utilização do anticorpo produzido em coelho, policlonal, para marcação em humanos IL-17 (AHP 455G), diluição titulada em 1:1000 (R&D Systems, Boston, EUA) (figura 1).

As células B foram marcadas com o anticorpo monoclonal CD20 (M0639, Dako, Glostrup, Dinamarca), diluição 1:20000 (figura 1).

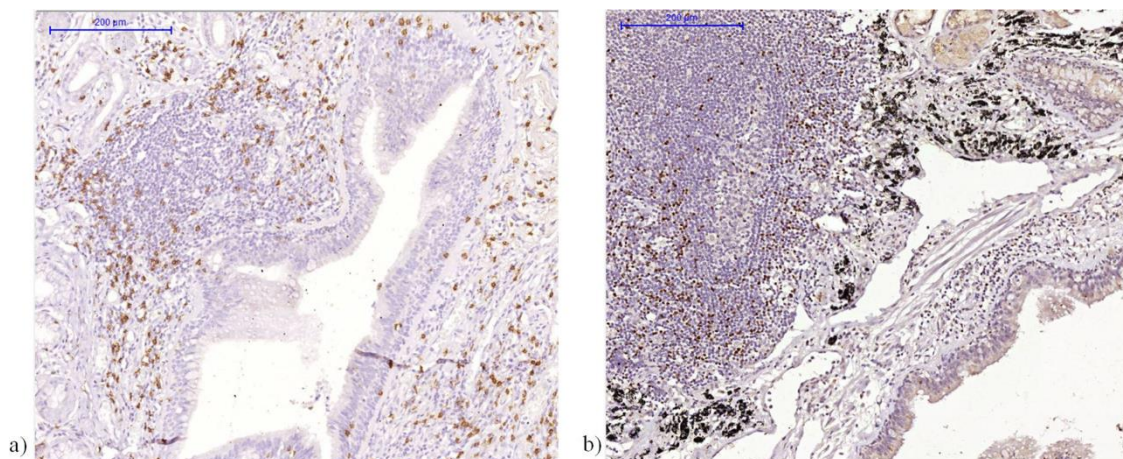
A marcação para CCL19 fez-se através da utilização do anticorpo CCL19/MIP3  $\beta$ MAB (Clone 54909, MAB361, R&D Systems, Boston, EUA), para marcação em humanos, diluição 1:7500 (figura 1).

A marcação para BAFF deu-se com o anticorpo policlonal BAFF/BLyS/TNF13B (AF 124, R&D Systems, Boston, EUA), diluição 1:3000 (figura 1).





**Figura 1.** Imagens representativas da análise imunohistoquímica das células e citocinas inflamatórias nas vias aéreas de pacientes com DPOC. a) Detecção (marcação marrom) de células TCD4+. b) Células TCD8+ c) Expressão de IL-17 d) Células T regulatórias FOXP3+ e) Expressão de IL-10 e f) Expressão de TGF- $\beta$ . Escala = 100 $\mu$ m.



**Figure 4:** Imagens representativas da análise imunohistoquímica de células T regulatórias FOXP3em tecido linfóide associado ao brônquio (BALT). Indivíduo fumante sem obstrução (a) comparado ao paciente com DPOC (b). Scale Bar = 200 $\mu$ m.

#### 4.3. Análise Morfométrica

Após corados em reação de imunohistoquímica as lâminas com os cortes de tecido pulmonar foram então scaneadas utilizando Scanner Digital para lâminas histológicas de alta resolução automatizado para amostras histológicas para campo claro (Pannoramic Scan, 3D Hitech, Budapeste, Hungria). Para a análise digital das mesmas, com posterior seleção da

área a ser estudada, foi utilizado o software Panoramic Viewer 1.5 (3D Histech, Budapeste, Hungria) com o aumento de 200X para análise de todo o tecido e 400X para o corte de vias aéreas e tecidos linfoides selecionados.

Foram selecionadas as vias aéreas em cada caso seguindo a classificação de acordo com o perímetro da membrana basal. As vias aéreas com perímetro menor que 6 milímetros (mm) foram classificadas como vias aéreas pequenas; as de perímetro maior que 6mm foram consideradas vias aéreas grandes <sup>(52)</sup>. Para cada caso escolheram-se duas vias aéreas grandes e três vias aéreas pequenas para análise de células positivas por área de via aérea.

Seguindo o mesmo protocolo, foram selecionados os BALT para cada caso e, em seguida, quantificadas as áreas totais. Tal processo procedeu-se em um aumento de 400X. A avaliação fez-se em toda a circunferência do BALT.

As análises morfométricas efetivaram-se com a utilização de um analisador de imagens e o software Image-Pro Plus versão 4.5 para Windows (Media Cybernetics-Silver Spring MD, EUA). Neste programa, foram contabilizadas as células em cada via aérea e BALT escolhidos e, a posteriori, realizado o cálculo da densidade de células por área de tecido, resultado este expresso na unidade células/ $\mu\text{m}^2$ .

#### **4.4. Análise Estatística**

As análises estatísticas realizaram-se através de dados não normais, com a utilização do teste One-Way ANOVA para dados não paramétricos, sendo considerado estatisticamente significativo um valor de  $p < 0,05$ . Quando encontradas diferenças estatísticas, foram utilizados os testes de Dunn ou Kruskal–Wallis de acordo com o software SigmaStat<sup>®</sup> 11.0 (Jandel Scientific, SanRafael, CA). Dados foram apresentados em mediana  $\pm$  desvio padrão (DP).

Para todos os dados, variáveis estudadas e características demográficas dos sujeitos do estudo, foram realizadas correlações, utilizando-se dos testes de Pearson, para dados considerados normais, e dos testes de Spearmann, para os considerados não normais. Um valor de  $p < 0,05$  foi considerado com estatisticamente significativo.

**RESULTADOS**

## 5. RESULTADOS

Os sujeitos do estudo foram divididos em três grupos, de acordo com o hábito tabágico e prova de função pulmonar, a saber:

*Grupo Controle (n=21)*: indivíduos não tabagistas, sem doença pulmonar prévia e prova de função pulmonar normal ( $VEF_1/CVF > 70\%$  e  $VEF_1 > 80\%$ ).

*Grupo Fumantes Não Obstrutivos (FNO) (n=22)*: indivíduos tabagistas ou ex-tabagistas, estes com cessação de fumo  $> 1$  mês, sem doença pulmonar prévia e prova de função pulmonar normal ( $VEF_1/CVF > 70\%$  e  $VEF_1 > 80\%$ ).

*Grupo Fumantes Obstrutivos (DPOC) (n=17)*: indivíduos tabagistas ou ex-tabagistas, estes com histórico de cessação de fumo  $> 1$  mês, com prova de função pulmonar positiva para a obstrução de fluxo aéreo ( $VEF_1/CVF < 70\%$ ). Quatorze pacientes deste grupo (cinco em estágio GOLD I - DPOC leve <sup>(1)</sup>; oito em estágio GOLD II - DPOC moderado; e um em estágio GOLD III - DPOC severo) apresentaram prova de função pulmonar com valores pós broncodilatador (BD). A reversibilidade dos valores pós BD foi menor a 12% em relação à prova pré BD em todos os indivíduos.

Não foi observada diferença estatística no que tange a idade e a carga tabágica entre os indivíduos dos grupos FNO e DPOC (tabela 3).

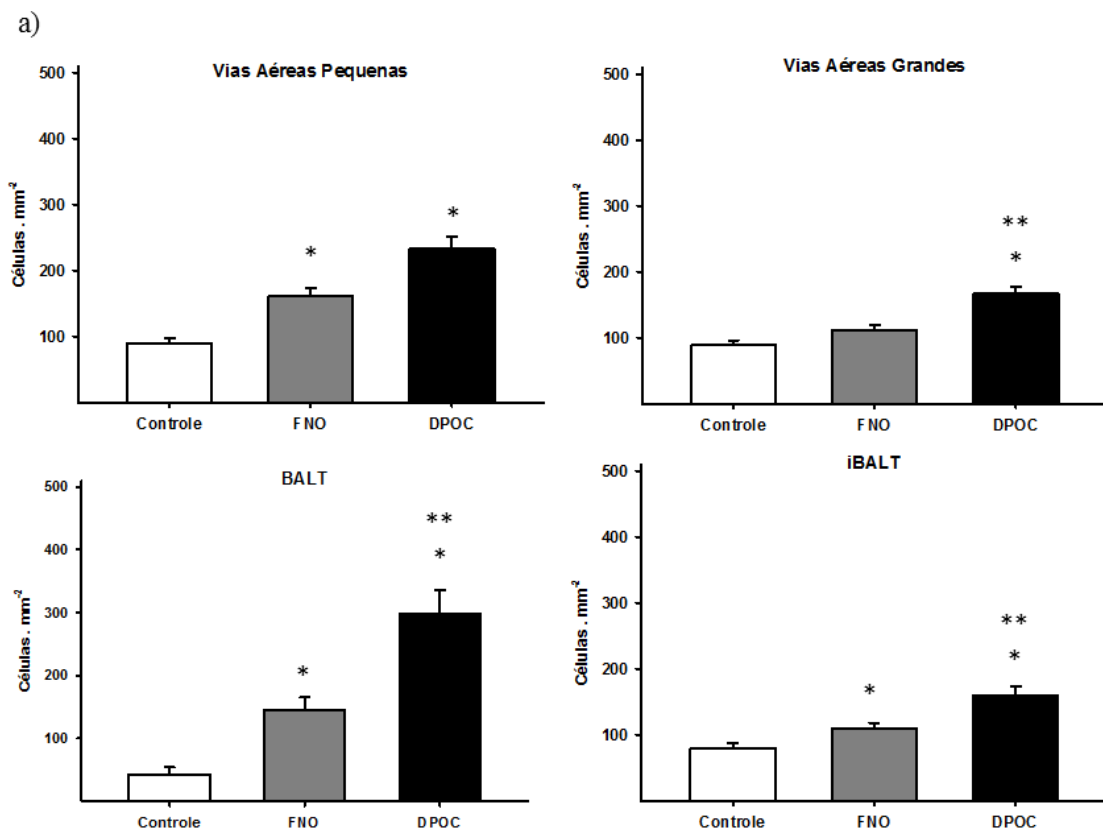
**Tabela 3. Sujeitos do Estudo**

	<b>Controle</b>	<b>FNO</b>	<b>DPOC</b>
<b>N</b>	21	22	17
<b>Idade (Anos)</b>	52 ± 14*	61 ± 7	67 ± 10
<b>Gênero Masculino/Feminino</b>	10/11	13/9	11/6
<b>Não Fumantes/Ex-Fumantes/Fumantes</b>	21/0/0	0/14/8	0/8/9
<b>Carga Tabágica (Maços/ano)</b>	0	60,4 ± 39	75,5 ± 34,1
<b>VEF<sub>1</sub> % pred</b>	108,2 ± 17	97,3 ± 12,3	65,1 ± 15,4**
<b>VEF<sub>1</sub> / CVF %</b>	83,3 ± 8	76,3 ± 8,7	59,5 ± 9,6**
<b>VEF<sub>1</sub> % pred (Pós-BD)</b>	108,6 ± 14,3	102,6 ± 14,9	71,7 ± 15,7**
<b>VEF<sub>1</sub> / CVF % (Pós-BD)</b>	83,2 ± 4,5	75,8 ± 5,8	58,8 ± 7,6 <sup>++</sup>

Dados apresentados em média ± DP. %pred: %predito; BD: broncodilatador; \*p<0,005, diferença estatística entre grupo controle e demais grupos; \*\*p<0,001, diferença estatística entre fumantes com obstrução comparados aos demais grupos; ++p<0,05, diferença estatística entre fumantes com obstrução comparados aos demais grupos.

### 5.1. Células TCD4+

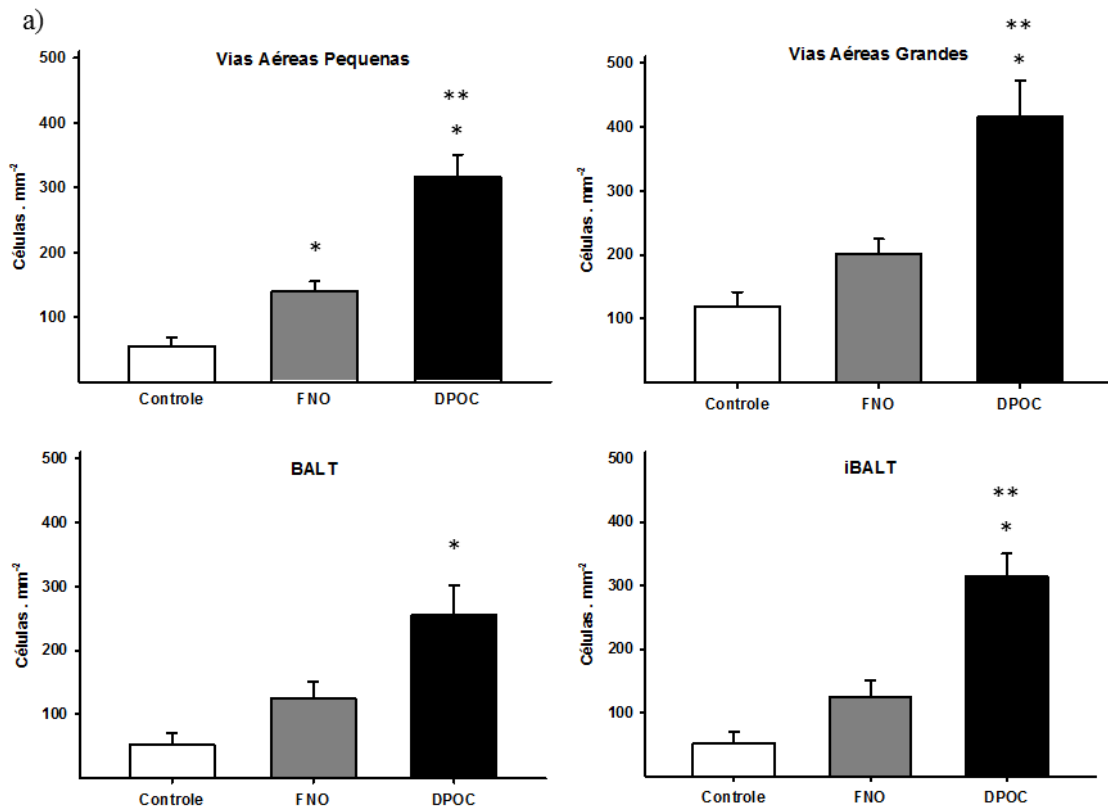
Observamos um aumento da densidade de células TCD4+ nos indivíduos fumantes tanto em vias aéreas pequenas quanto em vias aéreas grandes. Entretanto, enquanto em vias aéreas pequenas todos os tabagistas apresentaram aumento ( $p < 0,05$ ), em vias aéreas grandes somente os indivíduos DPOC apresentaram esta resposta ( $p < 0,001$ ). As análises referentes aos BALTs e iBALTs também demonstraram aumento destas células nos indivíduos fumantes não obstruídos ( $p = 0,041$ ) e nos obstruídos ( $p < 0,001$ ), sendo que houve um aumento ainda maior no grupo DPOC comparado ao FNO ( $p < 0,001$ ) (figura 3).



**Figura 3.** a) Densidade de células TCD4+ em vias aéreas e tecidos linfoides associados aos brônquios (BALT). Foi observada diferença estatística entre os grupos estudados: \*quando comparados ao grupo controle, \*\*quando comparados ao grupo FNO.

## 5.2. Células TCD8+

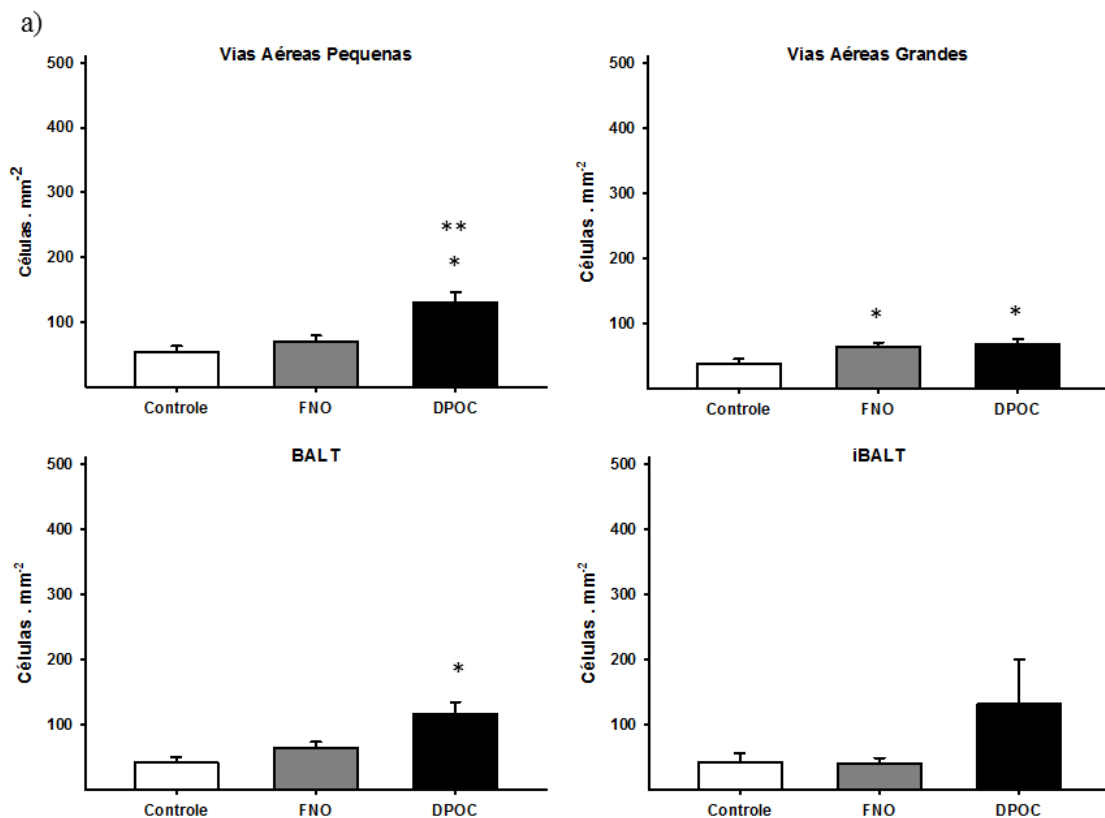
Já as análises da densidade de células TCD8+ demonstraram aumento estatisticamente significativo nos grupos FNO e DPOC em vias aéreas pequenas, sendo que nestes compartimentos os indivíduos DPOC tiveram valores mais altos comparados aos FNO ( $p < 0,05$ ). Em relação às vias aéreas grandes, BALTS e iBALTS somente os grupos DPOC apresentaram aumento estatisticamente significativo comparado aos outros grupos ( $p < 0,05$ ) (figura 4).



**Figura 4.** a) Densidade de células TCD8+ em vias aéreas e tecidos linfoides associados aos brônquios (BALT). Foi observada diferença estatística entre os grupos estudados: \*quando comparados ao grupo controle, \*\*quando comparados ao grupo FNO.

### 5.3. Células BCD20

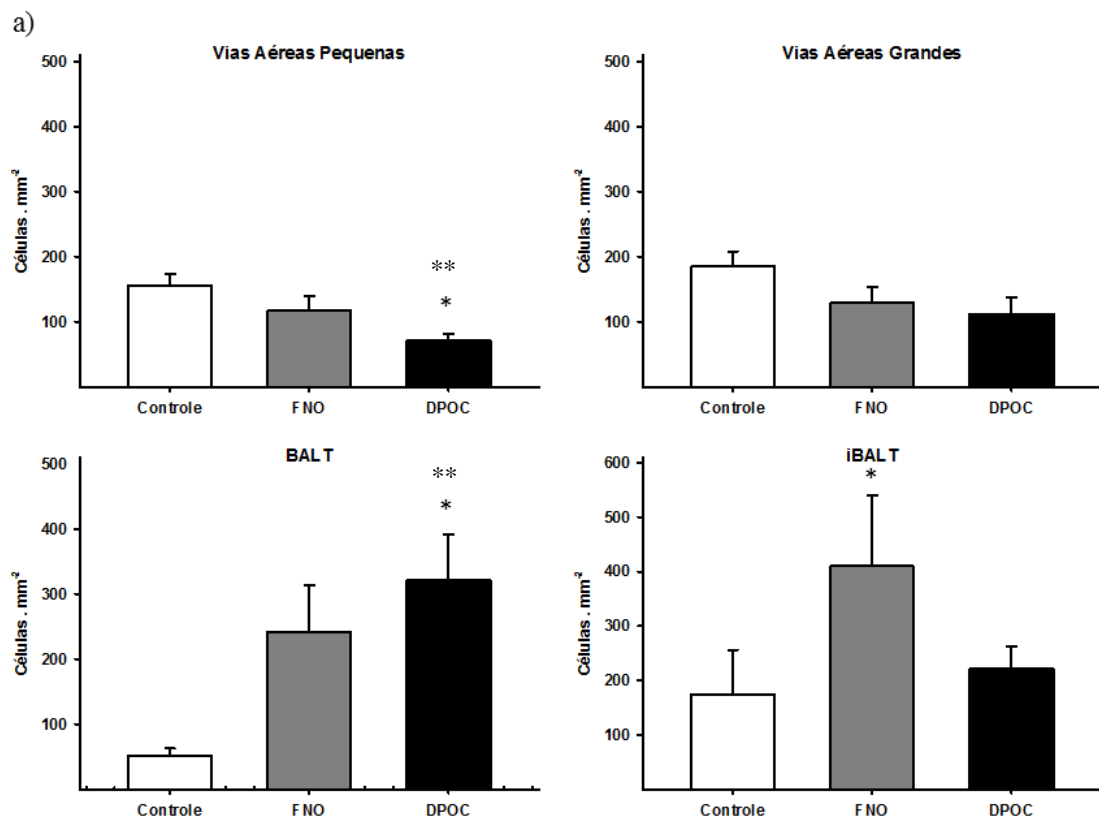
Quando realizadas as análises da densidade de células B nos diferentes compartimentos estudados, observou-se um aumento significativo no grupo DPOC, quando comparado aos grupos FNO ( $p = 0,002$ ) e controle ( $p < 0,001$ ) em vias aéreas pequenas, bem como nos tecidos linfoides associados aos brônquios quando comparado ao grupo controle ( $p < 0,05$ ). Já nas vias aéreas grandes, este aumento se mostrou significativo apenas quando comparados os indivíduos fumantes (DPOC –  $p = 0,017$ ; FNO –  $p = 0,025$ ) aos não fumantes, não havendo diferença entre fumantes obstrutivos e não-obstrutivos. Não houve diferença estatística quando analisados os iBALT ( $p = 0,249$ ) (figura 5).



**Figura 5.** a) Densidade de células BCD20 em vias aéreas e tecidos linfoides associados aos brônquios (BALT). Foi observada diferença estatística entre os grupos estudados: \*quando comparados ao grupo controle, \*\*quando comparados ao grupo FNO.

#### 5.4. Células T Regulatórias (FOXP3+)

Quando realizada a análise referente às células T regulatórias, observou-se uma diminuição destas em vias aéreas pequenas dos indivíduos fumantes obstrutivos quando comparado aos demais grupos ( $p < 0,05$ ). Em contrapartida, nos tecidos linfoides houve uma padronização inversamente proporcional: foi observado um aumento de Treg no grupo DPOC comparado aos demais grupos nos BALTs ( $p < 0,05$ ). Nos iBALTS, este aumento foi observado no grupo FNO, quando comparado aos grupos DPOC e controle ( $p < 0,05$ ) (figura 6).

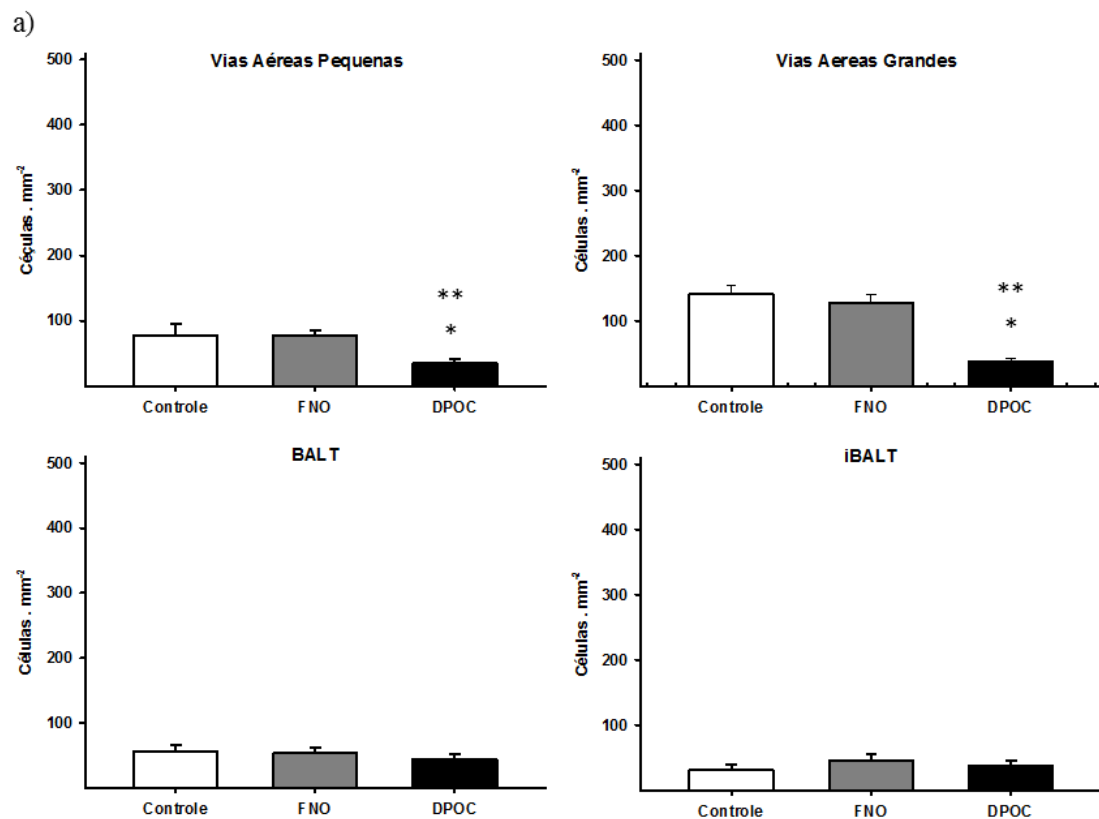


**Figura 6.** a) Densidade de células T regulatórias em vias aéreas e tecidos linfoides associados aos brônquios (BALT). Foi observada diferença estatística entre os grupos estudados: \*quando comparados aos demais grupos.



## 5.5. Interleucina-10

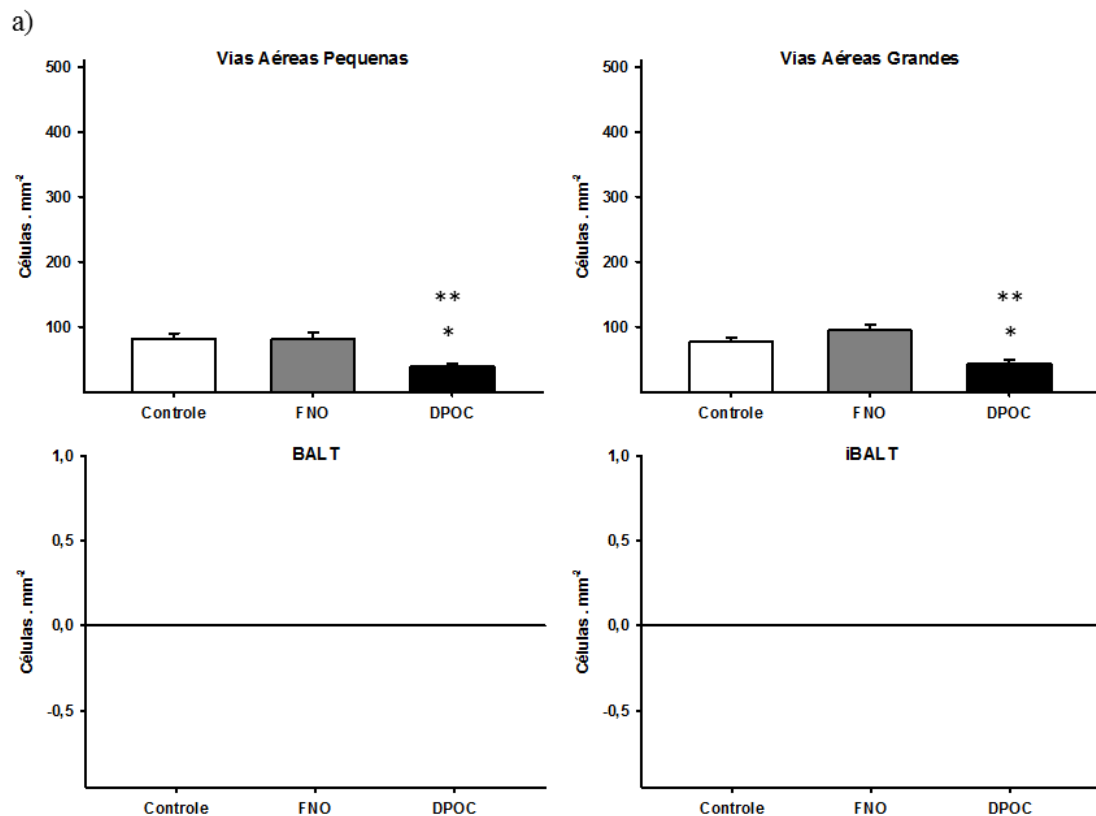
Avaliada a densidade de IL-10 nos três grupos estudados, foi observado padrão semelhante ao visto anteriormente em células T regulatórias, no que diz respeito às vias aéreas pequenas: uma diminuição no grupo DPOC quando comparado aos demais grupos ( $p < 0,05$ ). Entretanto, também foi detectada redução de densidade de IL-10 em vias aéreas grandes no mesmo grupo, em comparação aos fumantes não obstrutivos e não fumantes ( $p < 0,05$ ). Não houve diferença estatisticamente significativa nessa análise em relação aos tecidos linfoides associados ( $p = 0,694$ ) ou não ( $p = 0,555$ ) aos brônquios (figura 7).



**Figura 7.** a) Densidade de células com expressão de IL-10 em vias aéreas e tecidos linfoides associados aos brônquios (BALT). Foi observada diferença estatística entre os grupos estudados: \*quando comparados ao grupo controle, \*\*quando comparados ao grupo FNO.

## 5.6. Fator de Transcrição – TGF- $\beta$

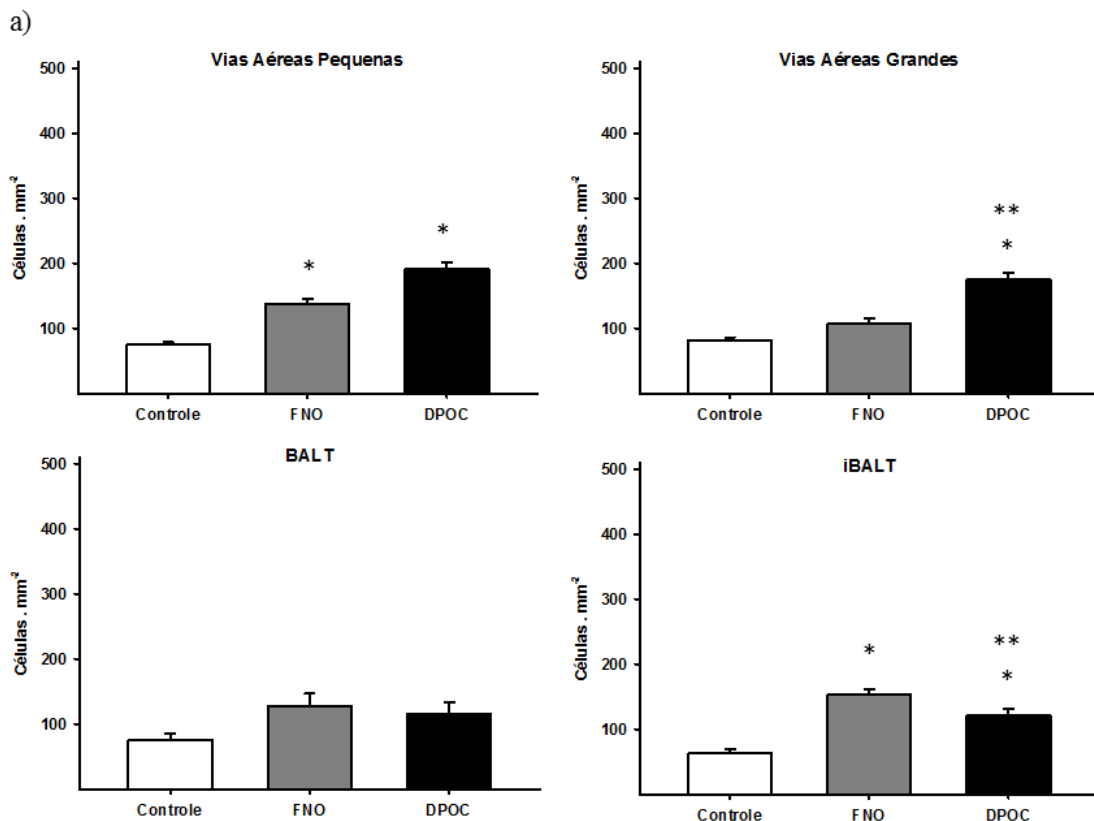
A análise do fator de transcrição TGF- $\beta$  seguiu padrão equivalente ao observado na densidade de células T regulatórias em vias aéreas. Tanto em vias aéreas pequenas ( $p < 0,05$ ) como nas de maior calibre ( $p < 0,001$ ), foi observada uma redução na expressão deste fator nos indivíduos do grupo DPOC quando comparados aos demais grupos. Não foi observada expressão de TGF- $\beta$  em BALT e iBALT (figura 8).



**Figura 8.** a) Densidade de células com expressão de TGF- $\beta$  em vias aéreas e tecidos linfoides associados aos brônquios (BALT). Foi observada diferença estatística entre os grupos estudados: \*quando comparados ao grupo controle, \*\*quando comparados ao grupo FNO.

## 5.7. Interleucina-17

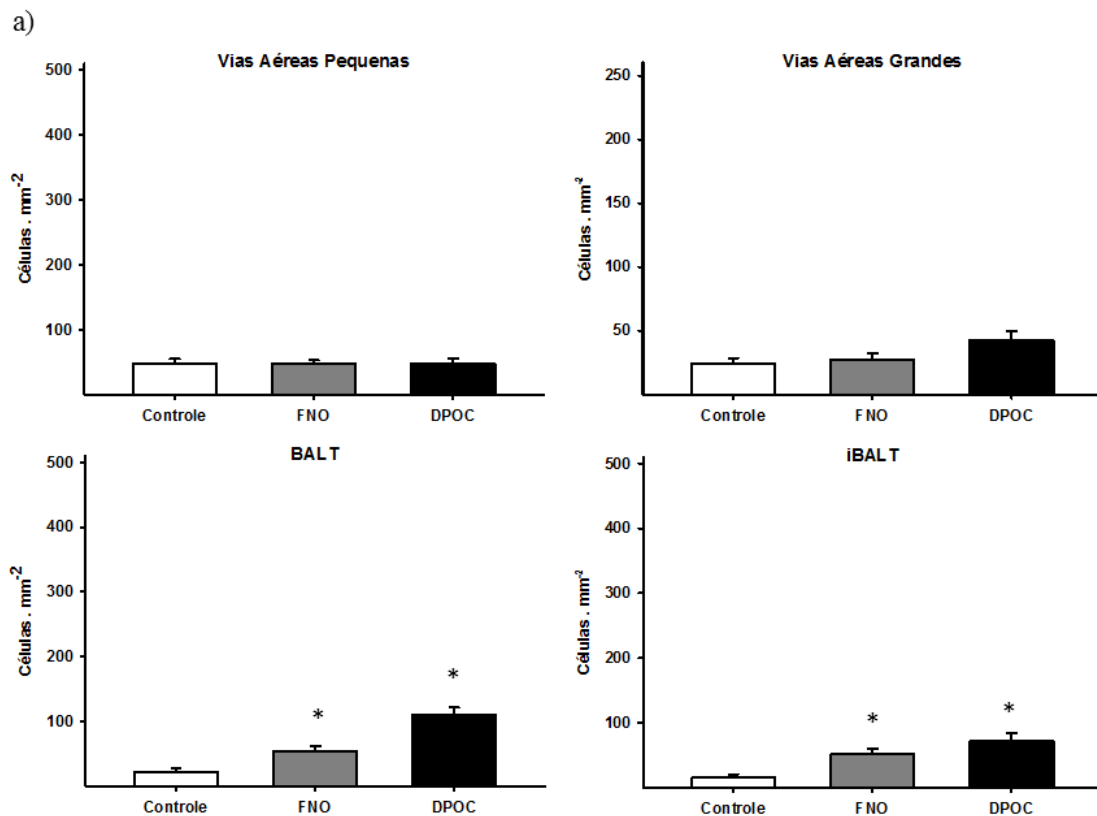
Avaliada a densidade de IL-17 em vias aéreas e tecidos linfoides dos sujeitos do estudo, pode-se observar um aumento desta concentração em vias aéreas pequenas, quando comparado o fator fumo entre os três grupos ( $p < 0,05$ ); os indivíduos fumantes apresentaram maior densidade de IL-17 que os não fumantes. Em contrapartida, em vias aéreas grandes a diferença foi observada apenas em relação ao fator obstrução; os valores encontrados em indivíduos do grupo DPOC se sobrepuseram aos dos grupos controle e FNO ( $p < 0,05$ ). Quando comparada a densidade nos iBALT, tanto os indivíduos obstrutivos, como os não obstrutivos apresentaram aumento em relação ao grupo controle ( $p < 0,001$ ), com um aumento ainda maior para os indivíduos com DPOC ( $p = 0,023$ ). Não houve diferença estatística quando comparados os valores relacionados aos BALT ( $p = 0,096$ ) (figura 9).



**Figura 9.** a) Densidade de células com expressão de IL-17 em vias aéreas e tecidos linfoides associados aos brônquios (BALT). Foi observada diferença estatística entre os grupos estudados: \*quando comparados ao grupo controle, \*\*quando comparados ao grupo FNO.

## 5.8. Citocina – CCL19

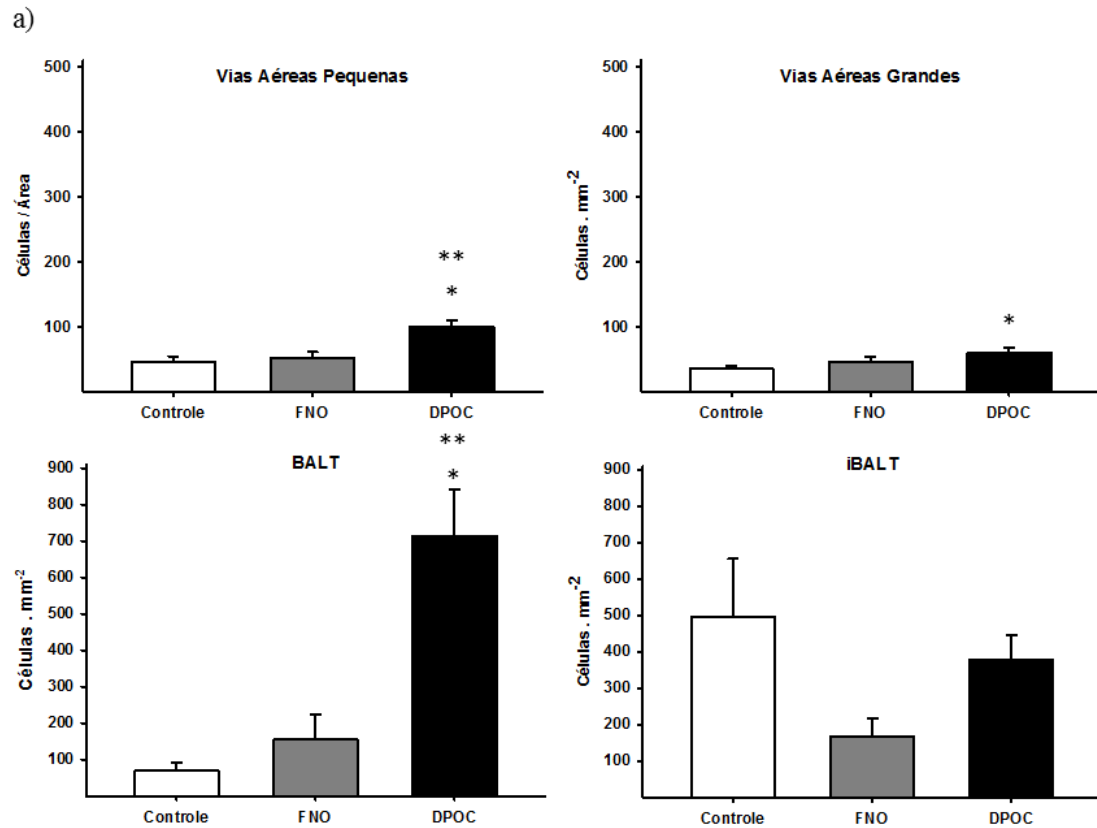
Após a análise da expressão da citocina CCL19 nos tecidos pulmonares estudados, foi observado um pequeno aumento nestes valores nos indivíduos do grupo DPOC quando realizada a comparação com os demais grupos, mas sem diferença estatística entre as marcações realizadas nas vias aéreas pequenas nos grupos estudados ( $p = 0,998$ ) e nas vias aéreas grandes ( $p = 0,061$ ). Porém quando comparadas as marcações no tecido linfoide, observou-se um aumento dessa expressão nos indivíduos fumantes comparados aos não fumantes ( $p = 0,008$ ), com aumento ainda maior nos que desenvolveram a obstrução ao fluxo aéreo ( $p < 0,001$ ). Nos iBALT, foi encontrado aumento significativo nos indivíduos dos grupos FNO ( $p = 0,008$ ) e DPOC ( $p < 0,001$ ), quando comparados ambos ao grupo controle (figura 10).



**Figura 10.** a) Densidade de células com expressão de CCL19 em vias aéreas e tecidos linfoides associados aos brônquios (BALT). Foi observada diferença estatística entre os grupos estudados: \*quando comparados ao grupo controle.

### 5.9. Fator de Transcrição – BAFF

A análise dos dados do fator de transcrição BAFF mostrou um padrão semelhante tanto em vias aéreas pequenas como nos BALT: houve um aumento significativo quando comparado o grupo DPOC aos grupos FNO e controle ( $p < 0,05$ ). Não foi observada diferença estatística para os iBALT ( $p = 0,108$ ) (figura 11).



**Figura 11.** a) Densidade de células com expressão de BAFF em vias aéreas e tecidos linfoides associados aos brônquios (BALT). Foi observada diferença estatística entre os grupos estudados: \*quando comparados ao grupo controle, \*\*quando comparados ao grupo FNO.

### 5.10. Correlação entre a carga tabágica e a densidade de marcadores inflamatórios em vias aéreas pequenas e vias aéreas grandes

Não houve correlação dos dados em relação à variável carga tabágica para a maioria das comparações realizadas via análise estatística, apenas uma pequena correlação negativa para os dados tabulados de CD8+ em vias aéreas pequenas e para IL-10 em vias aéreas grandes (tabela 4).

**Tabela 4. Correlação entre a carga tabágica e a densidade demarcadores inflamatório in vias aéreas pequenas (VAP) e vias aéreas grandes (VAG)**

	VAP	VAG
<b>CD4</b>	R= 0,0436 P= 0,813	R= 0,580 P= -0,105
<b>CD8</b>	R= -0,384* P= 0,0398	R= -0,188 P= 0,335
<b>CD20</b>	R=-0,428 P=0,157	R=0 P=0,991
<b>FOXP3</b>	R= -0,0515 P= 0,819	R= 0,0316 P= 0,876
<b>IL10</b>	R= -0,171 P= 0,372	R= -0,398* P= 0,0400
<b>TGF-β</b>	R= -0,17 P= 0,365	R= -0,256 P= 0,365
<b>IL17</b>	R= 0,227 P= 0,246	R= 0,300 P= 0,134
<b>CCL19</b>	R=0,541 P=0,0663	R=-0,0351 P=0,904
<b>BAFF</b>	R=-0,0868 P=0,776	R=-0,333 P=0,296

**DISCUSSÃO**

## 6. DISCUSSÃO

Nossos resultados demonstraram haver uma diferença entre os diferentes compartimentos estudados: vias aéreas grandes, vias aéreas pequenas, BALTs e iBALT, no que se refere à quantificação das células inflamatórias e à expressão das citocinas estudadas até o momento. Na população estudada, verificamos que a progressão da obstrução em indivíduos fumantes estava associada a uma diminuição na regulação do processo inflamatório em vias aéreas pequenas, caracterizada por uma diminuição na expressão de TGF- $\beta$ , que, por consequência, pode levar a uma redução na densidade de Treg e expressão de IL-10.

Considerando-se a distribuição da densidade de células T CD4+ e CD8+, foi observado o mesmo padrão tanto em pequenas como em grandes vias aéreas nos indivíduos fumantes. Embora os fumantes obstrutivos e não-obstrutivos apresentaram aumento destas células em relação ao grupo controle, os pacientes com DPOC apresentaram valores mais elevados para os linfócitos CD8+ em comparação com o grupo FNO nas pequenas vias aéreas. Considerando as vias aéreas de maior calibre, foi observado um aumento em células T CD8+ apenas em fumantes obstrutivos.

Já se encontra bem estabelecida pela literatura a relação do sistema imune inato na iniciação e progressão da DPOC em seus estágios iniciais. Hogg e colaboradores <sup>(26)</sup> demonstraram em pacientes com diferentes graus de DPOC submetidos à ressecção pulmonar que a progressão da DPOC está fortemente associada ao aumento do processo inflamatório, caracterizado pelo espessamento da musculatura lisa, aumento da produção de muco e da migração de linfócitos CD4+ e CD8+ nas pequenas vias aéreas destes pacientes. Além disso, estes autores atribuem a esta resposta inflamatória persistente, a transição da imunidade inata para a adaptativa, com uma associação positiva entre o aumento de células T, porcentagem de células contendo tecidos linfoides associados aos brônquios e a progressão da doença.

O perfil inflamatório em pacientes com DPOC não é exclusividade do tecido pulmonar, sendo também inclusos a circulação sistêmica e linfonodos regionais <sup>(18,20,53)</sup>. Linfócitos organizados em folículos próximos ao epitélio facilitam a apresentação de antígenos, corroborando com a caracterização de um processo inflamatório persistente <sup>(26)</sup>.

Desta forma, o aumento de células CD8+ e, por consequência, uma diminuição na razão CD4/CD8, são esperados em diversos compartimentos pulmonares, sendo considerados bons marcadores de diferenciação entre indivíduos que fumam e desenvolvem a obstrução ao



fluxo aéreo, dos que fumam e apresentam função pulmonar dentro dos padrões de normalidade <sup>(54)</sup>. Battaglia e colaboradores <sup>(55)</sup>, ao estudar o perfil inflamatório de fumantes, mostraram valores mais elevados de linfócitos CD8+, neutrófilos, macrófagos e mastócitos apenas em pequenas vias aéreas, enquanto em vias aéreas grandes, houve um aumento apenas para linfócitos CD4+.

Saetta e colaboradores <sup>(56)</sup>, ao realizarem comparação entre fumantes obstrutivos e não obstrutivos com idade similar e sem diferenças estatísticas entre a carga tabágica assim como na casuística de nossa pesquisa, apresentaram evidências de remodelamento no grupo DPOC associadas ao perfil inflamatório das pequenas vias aéreas destes pacientes. Observou-se não só um aumento de linfócitos T CD8+, como também houve correlação positiva à medida que havia piora da limitação ao fluxo aéreo entre esses dois fatores. Paralelamente, O'Shaughnessy <sup>(19)</sup> e colaboradores também demonstraram aumento deste mesmo tipo celular em biópsia pulmonar por broncoscopia ao compararem fumantes obstrutivos e não obstrutivos.

É importante destacar que em nosso estudo não houve correlação entre a carga tabágica e o aumento da densidade de células T CD4+ e que houve uma fraca correlação negativa entre o mesmo fator e a densidade de linfócitos T CD8+.

A obstrução das pequenas vias aéreas, e seu processo de remodelamento associado à reparação tecidual e mau funcionamento do sistema mucociliar, gera um acúmulo de exsudato no lúmen das vias aéreas. A colonização e infecção das vias aéreas periféricas associadas à resposta imune adaptativa também contribuem para um aumento no número de linfócitos, que se organizam em tecidos linfoides associados aos brônquios <sup>(26)</sup>. Tais achados corroboram com o nosso estudo, visto que houve um aumento no número de linfócitos T CD8+ e CD4+ em BALT e iBALT de indivíduos portadores de DPOC em comparação aos indivíduos fumantes sem obstrução e não fumantes, com predominância destes aumentos em pequenas vias aéreas.

Como já descrito nas páginas introdutórias desta dissertação, células T CD4+ podem diferenciar-se em Th17 ou células T reguladoras, a partir da presença de TGF- $\beta$  <sup>(35)</sup>. Em nosso estudo, uma redução na densidade de TGF- $\beta$  foi observada em pequenas vias aéreas, fato correlacionado à obstrução nos fumantes.

O papel desta citocina na progressão da inflamação permanece como um fator de controvérsia na literatura, tanto nos modelos experimentais de enfisema com em humanos. Embora a maioria dos estudos relatem um aumento da expressão de TGF- $\beta$  no epitélio das

vias aéreas de pacientes com DPOC, provocando o desenvolvimento da doença das pequenas vias aéreas <sup>(57,58)</sup>, a diminuição da expressão de TGF- $\beta$ 1 também foi descrita em macrófagos alveolares de pacientes com DPOC, em comparação com fumantes não-obstrutivos e não-fumantes <sup>(59)</sup>, e nas células epiteliais de indivíduos DPOC (GOLD II), quando comparados aos controles <sup>(60)</sup>.

Além disso, esta citocina foi descrita em alguns estudos como um dos fatores indiretos, em conjunto com a secreção de IL-10, responsáveis pela supressão da inflamação por células T reguladoras em doenças auto-imunes e crônicas <sup>(61,62)</sup>.

A maioria dos estudos que descrevem a densidade Treg em fumantes saudáveis ou portadores de DPOC o fizeram em plasma ou lavado broncoalveolar (BAL), demonstrando um aumento de tais células em pacientes com DPOC em comparação com os não fumantes <sup>(25,34,63-66)</sup>, sugerindo que a expressão de FOXP3 é responsável pela supressão de proliferação de células Th17. Evidências recentes concordam que as células Treg FOXP3 + também podem suprimir a proliferação de células B, macrófagos e células dendríticas, que conduz a uma atividade reguladora da inflamação <sup>(35)</sup>.

Em nosso estudo, entretanto, foi avaliada a densidade de células T regulatórias por área de tecido pulmonar e observou-se uma redução na densidade destas células em vias aéreas pequenas dos indivíduos do grupo DPOC quando comparados aos grupos FNO e controle.

Corroborando com os achados encontrados em nosso estudo, Chu e colaboradores <sup>(36)</sup> realizaram uma pesquisa em parênquima pulmonar humano e compararam valores de expressão de FOXP3 entre indivíduos fumantes com DPOC, fumantes não obstrutivos e não fumantes. Foi encontrada uma redução significativa para o fator obstrução, porém quando foi relacionada ao fumo, a densidade apresentou apenas discreta redução. Tal fato demonstra a participação do fator FOXP3 na resposta imune adaptativa durante o desenvolvimento da inflamação local nos pulmões.

Quando comparados os subconjuntos de células T reguladoras em amostras de sangue de DPOC e fumadores saudáveis, um aumento de células pró-inflamatórias foi observado a medida que a doença persistiu, sugerindo que o desequilíbrio do perfil inflamatório desempenha um papel importante na progressão da DPOC <sup>(66,67)</sup>.

A resposta imune celular mediada pelas células T regulatórias na patogênese da DPOC, portanto, induz a uma inflamação pulmonar local e não sistêmica, de caráter diferenciado entre parênquima pulmonar, tecido linfóide e vias aéreas.

Em consonância ao nosso estudo, Isajevs e colaboradores <sup>(65)</sup> também observaram comportamento distinto nos diferentes compartimentos de tecido pulmonar e atribuíram a este evento o fato de haver diferença entre epítomos nos dois compartimentos estudados. A exposição crônica a fumaça de cigarro induz a secreção de enzimas proteolíticas a partir de células do sistema imune inato, o que levará a liberação de fragmentos de elastina em vias aéreas e alvéolos, que em indivíduos imunossusceptíveis, pode desencadear uma resposta imune mediada por células T e B <sup>(24,39)</sup>.

Lee e colaboradores <sup>(24)</sup> foram uns dos primeiros autores que propuseram que uma redução nos valores de células T regulatórias estava associada a progressão da DPOC. Foram contabilizadas células dispersas ao longo do tecido pulmonar de pacientes enfisematosos, comparados a indivíduos controles saudáveis. Neste estudo, também foi observada uma redução de expressão nos níveis de RNAm para FOXP3, bem como menor expressão de IL-10, reforçando a teoria de uma menor resposta regulatória em pacientes portadores de DPOC.

Em nosso estudo, observamos uma redução de IL-10 em vias aéreas pequenas e nas vias aéreas grandes dos indivíduos fumantes obstrutivos, quando comparados aos demais grupos. Considerando que a IL-10 é uma interleucina de caráter anti-inflamatório e é predominantemente produzida pelas Tregs <sup>(25)</sup>, acreditamos que nesta população que estudamos, as Tregs apresentam um papel no controle da resposta imune adaptativa através da produção de IL-10.

Na literatura, alguns estudos já sugerem o papel importante das Tregs via mediação por IL-10 no controle desta resposta imunológica em pacientes DPOC. Entretanto, são poucos os estudos que correlacionam o papel das células Treg e da produção de IL-10 por estas células na regulação da resposta imune adaptativa. Acredita-se que as células Tregs são importantes para a regulação da resposta inflamatória na tentativa de suprimir a resposta a autoantígenos e sua ausência em outros compartimentos pulmonares não permite que esse mecanismo tenha sua função completa, corroborando com a inflamação persistente e contribuindo para a perpetuação da doença <sup>(25)</sup>.

Diferentemente da resposta encontrada nas vias aéreas, nos BALTs e iBALTs, observamos um aumento de células Treg e diminuição de IL-10. Possivelmente, isto se deve ao fato de haver aumento da produção de TGF- $\beta$  e BAFF nesses folículos linfoides, o que direcionaria a diferenciação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> para células Treg, não permitindo a produção e secreção de IL-10, perpetuando uma resposta imune deficitária próxima as vias aéreas, causando a lesão tecidual característica dos pacientes com DPOC.

Concomitante a estes resultados, observou-se um aumento significativo da densidade de células positivas para IL-17 em pequenas e grandes vias aéreas. No entanto, enquanto em pequenas vias aéreas houve uma diferença entre fumantes e não fumantes, a análise de grandes vias aéreas mostrou diferenças em indivíduos obstrutivos comparação com o grupo não-obstrutivo.

Há evidências da existência de subtipos de células T CD4 + com potente ação pró-inflamatória, denominados células Th17, com capacidade de produção de IL-17A e IL-17F <sup>(49,68)</sup>. Até o momento, não encontramos estudos que comprovem a presença ou ausência de IL-17 no tecido pulmonar de pacientes com DPOC.

Corroborando com os nossos achados em tecido, Imai e colaboradores <sup>(49)</sup> demonstraram em amostra de plasma de pacientes DPOC, aumento da resposta Th17, bem como de resposta Th1, células T CD4+ e T regulatórias, em comparação a indivíduos fumantes não obstrutivos e não fumantes, apresentando correlação direta com o aumento dos níveis de depleção pulmonar, sendo considerado um importante marcador para a predição da presença e severidade da limitação ao fluxo aéreo.

Em modelo animal, por sua vez, Wang e colaboradores <sup>(69)</sup> realizaram um estudo com camundongos submetidos à exposição crônica à fumaça de cigarro com medidas de citometria de fluxo para tecido pulmonar e encontraram um padrão semelhante ao nosso estudo, com aumento de resposta Th17, associada à redução de células T regulatórias (FOXP3+), RNAm para FOXP3 e IL10, sugerindo um desequilíbrio na relação Th17/Treg, contribuindo à neogênese do enfisema.

Quando realizamos a análise em BALT e iBALT para os mesmos mediadores inflamatórios e células, detectamos diferenças entre estes diferentes compartimentos.

A análise do BALT e iBALT revelou uma resposta oposta em comparação às vias aéreas para a densidade Treg. Em BALT, observamos um aumento na densidade de Treg em fumantes com DPOC e em iBALT, houve um aumento destas células apenas em fumantes não-obstrutivos, enquanto que para a análise da expressão IL-10, não houve diferenças entre os grupos.

Plumb e colaboradores <sup>(38)</sup>, ao estudarem a resposta imune regulatória em folículos linfóides de pacientes com DPOC, observaram um aumento na proporção de Treg nesses compartimentos em relação a indivíduos fumantes não obstrutivos e não fumantes, não havendo diferença estatística quando comparada a densidade desse tipo celular em iBALT. Dados semelhantes foram encontrados em nosso estudo.

Estudos sugerem que o aumento de células T regulatórias nos folículos linfoides ocorre como uma tentativa de supressão da interação entre células dendríticas e células T o que acarretará proliferação de células T CD8+ <sup>(38,40)</sup>, e para a supressão da ativação de células B correlacionada com aumento da progressão da doença <sup>(38)</sup>.

Este mesmo padrão é observado em outras patologias. Quando estudados pacientes com diagnóstico de artrite reumatoide e doenças inflamatórias de intestino, há maior presença de células T regulatórias em folículos linfoides destes pacientes quando comparados a indivíduos dos grupos controle <sup>(70,71)</sup>. Seguindo a mesma linha de raciocínio, já foi constatado aumento de células com ativação para FOXP3 em tecidos linfoides associados a mucosa intestinal em pacientes com HIV/AIDS, atenuando a hiperativação da doença e suprimindo a resposta imune aos agentes patógenos <sup>(72,73)</sup>.

A colonização e infecção das vias aéreas periféricas associadas com a resposta imunitária adaptativa também contribuir para o aumento do número de linfócitos, que são organizadas em BALT <sup>(26)</sup>. Esses achados corroboram com nosso estudo, uma vez que houve um aumento no número de CD8 + e CD4 + no BALT e iBALT de indivíduos com DPOC em comparação com fumantes não-obstrutivos e não fumantes.

Não foi feita nenhuma distinção relativa à quantificação de BALT associada com a gravidade da doença, mas existe uma maior quantidade de BALT e iBALT no grupo de DPOC em comparação com os demais grupos.

Como em outros estudos descritos na literatura <sup>(51)</sup>, as amostras de tecido utilizadas em nosso estudo foram retiradas das regiões periféricas de tecido pulmonar durante procedimento cirúrgico de ressecção pulmonar por tumor de pulmão. Para minimizar os efeitos dos tumores carcinogênicos, houve um cuidado em se fazer a coleta de tecido em regiões distantes do tumor.

Considerando os nossos resultados, a progressão obstrução em fumantes foi relacionada a uma diminuição na inflamação atividade regulatória nas pequenas vias aéreas, mediadas por células T reguladoras, levando a uma menor expressão de IL-10 e aumento da produção de IL-17. Além disso, verificou-se que tal atividade regulatória de inflamação mostrou diferenças entre BALT e vias aéreas.

**CONCLUSÕES**

## 7. CONCLUSÕES

Levando em consideração o papel da resposta imune na progressão da DPOC em indivíduos fumantes, foi observado um processo inflamatório persistente diretamente associado à obstrução ao fluxo aéreo, com aumento de linfócitos T CD4+ e CD8+ tanto em vias aéreas como em tecidos linfoides associados aos brônquios, estes se apresentando em maior quantidade nos indivíduos fumantes que apresentam obstrução.

Os resultados apresentados neste grupo amostral sugerem que a obstrução em vias aéreas também esteve diretamente relacionada à diminuição da regulação do processo inflamatório mediado por células T regulatórias, com consequente diminuição da produção de Interleucina 10 e aumento da produção de Interleucina 17.

Além disso, houve uma diferença na resposta regulatória entre os compartimentos das vias aéreas e dos tecidos linfoides (BALT e iBALT), no que se refere à densidade de Treg.

# Anexo 1

## Aprovação do comitê de ética

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA  
FACULDADE DE MEDICINA DA  
USP - HCFMUSP



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** ANÁLISE DE CÉLULAS B E T EM VIAS AÉREAS DE INDIVÍDUOS FUMANTES OBSTRUTIVOS E NÃO-OBSTRUTIVOS

**Pesquisador:** Fernanda Degobbi Tenorio Quirino dos Santos Lopes

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 11300312.0.0000.0068

**Instituição Proponente:** Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 195.416

**Data da Relatoria:** 21/01/2013

#### Apresentação do Projeto:

O trabalho se apresenta conciso e objetivo com bom embasamento de literatura.

#### Objetivo da Pesquisa:

O projeto tem como objetivo a caracterização fenotípica das subpopulações celulares potencialmente envolvidas no processo inflamatório da doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) de indivíduos fumantes obstrutivos, fumantes não obstrutivos e controles (não tabagistas) submetidos à ressecção pulmonar por tumor metastático primário. Segundo a pesquisadora, até o momento, na literatura a maior parte dos estudos que contempla a reatividade imunológica na DPOC tem sido feita no plasma.

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não há risco pois as análises serão feitas seções teciduais de material biopsiado previamente e estocados.

#### Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A análise concomitante de subpopulações celulares e citocinas associadas em tecido pulmonar pode fornecer uma caracterização adicional na tentativa de se compreender melhor a diferença nos processos inflamatórios envolvidos nos quadros pulmonares de fumantes que desenvolvem DPOC daqueles fumantes que não desenvolvem a doença.

**Endereço:** Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar

**Bairro:** Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010

**UF:** SP **Município:** SAO PAULO

**Telefone:** (11)2661-6442 **Fax:** (11)2661-6442 **E-mail:** marcia.carvalho@hc.fm.usp.br



HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA  
FACULDADE DE MEDICINA DA  
USP - HCFMUSP



**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Não há pendências.

**Recomendações:**

Não há.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Não há.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

: Em conformidade com o item IX.2 da Resolução CNS nº 196/96, cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar relatórios parciais e final; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

SAO PAULO, 07 de Fevereiro de 2013

---

**Assinador por:**  
**Luiz Eugênio Garcez Leme**  
**(Coordenador)**

## **REFERÊNCIAS**

1. From the *Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of COPD*, Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) 2014. Available from: <http://www.goldcopd.org>.
2. Decramer M, Janssens W, Miravittles M. **Chronic obstructive pulmonary disease.** *Lancet.* 2012; 379(9823):1341-51
3. Rabe KF, Suzanne H, Azueto A, Barnes PJ, Buist AS, Calverley P, et al. **Global strategy for the diagnosis, management and prevention of Chronic Pulmonary Obstructive Disease.** *Am J Respir Crit Care Med.* 2007; 176(6):532-55
4. Zhang X, Peiyang S, Jiang G, Cohn L, Lee PJ. **Toll-like receptor 4 deficiency causes pulmonary emphysema.** *J Clin Invest.* 2006; 116(11):3050-9
5. Lopez AD, Mather CD, Ezzati M, Jamison DT, Murray CJ. **Global and regional burden of disease and risk factors, 2001: systematic analysis of population health data.** *Lancet,* 2006; 367(9524):1747-57
6. World Health Organization (WHO). *World health statistics 2008.* [http://www.who.int/whosis/whostat/ EN\\_WHS08\\_Full.pdf](http://www.who.int/whosis/whostat/EN_WHS08_Full.pdf). [Acesso em 13 Out, 2015].
7. Jemal A, Ward E, Hao Y, Thun M. **Trends in leading causes of death in United States, 1970-2002.** *JAMA.* 2005; 294(10):1255-9
8. Gershon AS, Wang C, Wilton AS, Raut R, To T. **Trends in chronic obstructive pulmonary disease prevalence, incidence and mortality in Ontario, Canada, 1996 to 2007: a population-based study.** *Arch Intern Med.* 2010; 170(6):560-5
9. Sorhein IC, Johannessen A, Gulsvik A, Bakke PS, Silverman EK, DeMeo DL.I. **Gender differences in COPD: are women more susceptible to smoke effects than men?** *Thorax* 2010; 65(6):480-5
10. Ekeowa UI, Gooptu B, Belorgey D, Hägglöf P, Karlsson-Li S, Miranda E, et al. **Alpha1-Antitrypsin deficiency, chronic obstructive pulmonary disease and the serpinopathies.** *Clin Sci (Lond).* 2009; 116(12):837-50
11. Lambrechts D, Buyschaert I, Zanen P, Coolen J, Lays N, Cuppens H, et al. **The 15q24/25 susceptibility variant for lung cancer and chronic obstructive pulmonary disease is associated to emphysema.** *Am J Respir Ctir Care Med.* 2010; 181(5): 486-93
12. Svanes C, Sunyer J, Plana E, Dharmage S, Heinrich J, Jarvis D, et al. **Early life origins of chronic pulmonary obstructive disease.** *Thorax.* 2010; 65: 14-20
13. Eisner MD, Anthonisen N, Coultas D, Kuenzli N, Perez-Padilla R, Postma D, et al. **An official American Thoracic Society public policy statement: novel risk factors and**

- global burden of chronic pulmonary obstructive disease.** *Am J Respir Crit Care Med.* 2010; 182(5): 693-718
14. National Heart, Lung and Blood Institute. **Morbidity and mortality cartbook on cardiovascular, lung and blood diseases.** Bethesda: Maryland - US department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health. 2009
  15. Mannino DM, Homa DM, Akinbarni LJ, Ford ES, Redd SC. **Chronic obstructive pulmonary disease surveillance-United States, 1971-2000.** *Respir Care.* 2002; 47(10): 1184-99
  16. Foreman MG, Zhang L, Murphy J, Hanseini NN, Make B, Hokanson JE, et al. **Early-onset chronic obstructive pulmonary disease is associated to female sex, maternal factors and African American Race in the COPD Gene study.** *Am J Respir Crit Care Med.* 2011; 184(4):414-20
  17. Eisner MD, Balmes J, Kats PP, Trupin L, Yelin EH, Blanc PD. **Lifetime environmental tobacco smoke exposure and the risk of chronic obstructive pulmonary disease.** *Env Health.* 2005; 4(1):7
  18. 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(6):1304-9
  19. O'Shaughnessy TC, Ansari TW, Barnes NC, Jeffery PK. **Inflammation in bronchial biopsies of subjects with chronic bronchitis: inverse relationship of CD8+ T lymphocytes with FEV1.** *Am J Respir Crit Care Med.* 1997; 155(3):852-7
  20. Saetta M, Baraldo S, Corbino L, Turato G, Braccioni F, Rea F, et al. **CD8+ve cells in the lungs of smokers with chronic obstructive pulmonary disease.** *Am J Respir Crit Care Med.* 1999; 160(2):711-717
  21. Cosio MG, Saetta M, Agusti A. **Immunologic aspects of chronic obstructive pulmonary disease.** *N Engl J Med.* 2009; 360(23):2445-54
  22. Baraldo S, Saetta M. **To reg or not to reg: that is the question in COPD.** *Eur Respir J.* 2008; 31(3):486-8
  23. Cosio MG, Majo J, Cosio MG. **Inflammation of the airways and lung parenchyma in COPD: role of T cells.** *Chest.* 2002; 121(Supl.5):160S-5S
  24. Lee SH, Goswami S, Grudo A, Song LZ, Bandi V, Goodnight-White S, et al. **Anti-elastin auto-immunity in tobacco smoking-induced emphysema.** *Nat Med.* 2007; 13(5):567-

25. Brusselle GC, Joos GF, Bracke KR. **New Insights into the immunology of chronic obstructive pulmonary disease.** *Lancet.* 2011; 378(9795):1015-26
26. Hogg JC, Chu F, Utokarpach S, Woods R, Elliot M, Buzatu L, et al. **The nature of small-airway obstruction in Chronic Obstructive Pulmonary Disease.** *N Eng J Med.* 2004; 350(26):2645-56
27. Jiang D, Liang J, Li Y, Noble PW. **The role of toll-like receptors in non-infectious lung injury.** *Cell Res.* 2006; 16(8):693-701
28. Sarir H, Henricks PAJ, Van Houwelingen AH, Nijkamp FP, Folkerts G. **Cells, mediators and toll-like receptors in COPD.** *Eur J Pharm.* 2008; 585(2-3):346-53
29. Nembrini C, Marsland BJ, Kopf M. **IL-17 producing T cells in lung immunity and inflammation.** *J Allergy Clin Immunol* 2009;123(5):986-94.
30. Zhou L, Chong MM, Littman DR. **Plasticity of CD4<sup>+</sup> T cell lineage differentiation.** *Immunity* 2009;30(5):646-55.
31. Lambrecht BN, Prins JB, Hoogsteden HC. **Lung dendritic cells and host immunity to infection.** *ERJ.* 2001; 18(4):692-704
32. Breatke K, Klug M, Bier A, Julius P, Kuepper M, Virchow JC, et al. **Function-associated surface molecules on airway dendritic cells in cigarette smokers.** *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2008; 38(6):655
33. Freeman CM, Curtis JL, Chensue SW. **CC chemokine receptor 5 and CXC chemokine receptor 6 expression by lung CD8<sup>+</sup> cells correlates with chronic obstructive pulmonary disease severity.** *Am J Pathol.* 2007; 171(3):767-76
34. Di Stefano A, Caramori G, Capelli A, Gnemmi I, Ricciardolo FL, Oates T, et al. **STAT4 activation in smokers and patients with chronic obstructive pulmonary disease.** *ERJ.* 2004; 24(1):78-85
35. Chen Z, Lin F, Gao Y, Li Z, Zhang J, Xing Y, et al. **FOXP3 and ROR $\gamma$ t: Transcriptional regulation of Treg and Th17.** *Inter Immunopharmacol.* 2011; 11(6):536-42
36. Chu S, Zhong X, Zhang J, Lao Q, He Z, Bai J. **The expression of FOXP3 and ROR gamma t in lung tissues from normal smokers and chronic obstructive pulmonary disease patients.** *International Immunopharmacology.* 2011; 11(11):1780-8
37. Tan DBA, Fernandez S, Price P, et al. **Impaired function of T-cells in chronic obstructive pulmonary disease (COPD).** *Immunobiol.* 2014; 219(12):975-9.

38. J. Plumb, L.J.C. Smyth, H.R. Adams, J. Vestbo, A. Bentley. S.D. Singh. **Increased T-regulatory cells within lymphocyte follicles in moderate COPD.** *Eur Respir J* 2009; 34(1):89–94
39. Van der Strate BW, Postma DS, Brandsma CA, Melgert BN, Luinge MA, Geerlings M, et al. **Cigarette smoke-induced emphysema: a role for the B cell?** *Am J Respir Crit Care Med.* 2006; 173(7):751–8
40. Tsoumakido M, Demedts IK, Brusselle GG, Jeffery PK. **Dendritic cells in chronic obstructive pulmonary disease: new players in an old game.** *Am J Respir Crit Care Med.* 2008; 177: 1180-6
41. Sullivan AK, Simonian PL, Falta MT, Mitchel JD, Cosgrove GP, Brown KK, et al. **Oligoclonal CD4+ T cell in the lungs of patients with severe emphysema.** *Am J Respir Crit Care Med.* 2005; 172(5):590-6
42. Agusti A, McNee W, Donaldson K, Cosio M. **Hypotesis: does COPD have an autoimmune component?** *Thorax.* 2003; 58(10):832-4
43. Grumelli S, Corry DB, Song LZ, Song L, Green L, Huh J, et al. **An imune basis for lung parenchymal destruction in chronic obstructive pulmonar disease and emphysema.** *PLoS Med.* 2004; 1(1):75-83
44. Pridgeon C, Bugeon L, Donnelly L, Straschil U, Tudhope SJ, Fenwick P, et al. **Regulation of IL-17 in chronic inflammation in the human lung.** *Clin Sci.* 2011; 120:515-24
45. Lommatzsch M, Cicko S, Muller T, Lucatelli M, Bratke K, Stoll P, et al. **Extracellular adenosine triphosphate and COPD.** *Am J Respir Crit Care Med.* 2010; 181(9):928-34
46. Demedts IK, Morel-Montero A, Lebeque S, Pacheco Y, Cataldo D, Joos GF, et al. **Elevated MMP-12 protein levels in induced sputum from patients with COPD.** *Thorax.* 2006; 61(3):196-201
47. Martin TR, Raghu C, Maunder RJ, Springmeyer SC. **The effects of chronic bronchitis and chronic air flow obstruction on lung cells population recovered by bronchoalveolar lavage.** *Am Rev Respir Dis.* 1985; 132(2):254-60
48. Pasare C, Medzhitov R. **Toll-Like receptors and acquired immunity.** *Semin Immunol.* 2004; 16(1):23-6
49. Imai K, Mercer BA, Schulman LL, Sonet JR, D'Armiento JM. **Correlation of lung surface area to apoptosis and proliferation in human emphysema.** *ERJ.* 2005; 25(2):250-8

50. Chapman HA Jr, Shi GP. **Protease injury in the development of COPD: Thomas A. Neff lecture.** *Chest.* 2000; 117(5 Supl1):2958-98
51. Hogg JC. **Pathophysiology of airflow limitation in chronic obstructive pulmonary disease.** *Lancet.* 2004; 364(9435):709-21
52. Mauad T, Silva LF, Santos MA, Grinberg L, Bernardi FD, Martins MA, et al. **Abnormal alveolar attachments with decreased elastic fiber content in distal lung in fatal asthma.** *Am J Respir Crit Care Med.* 2004; 170(8):857-62
53. Gan WQ, Men SF, Senthilselvan A, Sin DD. **Association between chronic obstructive pulmonary disease and systemic inflammation: a systematic review and a meta-analysis.** *Thorax* 2004;59(7):574-80.
54. Zuo L, He F, Sergakis GG, Koozehchian MS, Stimpft JN, Rong Y, et al. **Interrelated role of cigarette smoke, oxidative stress, and immune response in COPD and corresponding treatments.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2014; 307(3):205-218
55. Battaglia S, Mauad T, Schadewijk AV, Vignola AM, Rabe KF, Bellia V, et al. **Differential distribution of inflammatory cells in large and small airways in smokers.** *J Clin Pathol* 2007;60:907-11.
56. Saetta M, Di Stefano A, Turato G, Facchini FM, Corbino L, Mapp CE, et al. **CD8+ T-lymphocytes in the peripheral airways of smokers with chronic pulmonary disease.** *Am J Respir Crit Care Med.* 1998; 157(3 Pt 1):822–6
57. Takizawa H, Tanaka M, Takami K, Ohtoshi T, Ito K, Satoh M. **Increased expression of transforming growth factor-beta1 in small airway epithelium from tobacco smokers and patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD).** *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;163(6):1476–83.
58. Königshoff M, Kneidinger N, Eickelberg O. **TGF-beta signaling in COPD: deciphering genetic and cellular susceptibilities for future therapeutic regimen.** *Swiss Med Wkly.* 2009; 139(39-40):554-63.
59. Pons AR, Sauleda J, Noguera A, Pons J, Barcelo B, Fuster A, et al. **Decreased macrophage release of TGF-beta and TIMP-1 in chronic obstructive pulmonary disease.** *Eur Respir J.* 2005; 26(1):60–6.
60. Zandvoort A, Postma DS, Jonker MR, Nordhoek JA, Vos JT, van der Geld YM, et al. **Altered expression of the Smad signaling pathway: implications for COPD pathogenesis.** *Eur Respir J.* 2006;28(3):533-41.

61. Wouters EF. **Local and systemic inflammation in chronic obstructive pulmonary disease.** *Proc Am Thorac Soc.* 2005; 2(1):26–33.
62. Hodge SJ, Hodge GL, Reynolds PN, et al. **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(2):492–9.
63. Barcelo B, Pons J, Ferrer JM, Sauleda J, Fuster A, Agusti AGN. **Phenotypic characterisation of T-lymphocytes in COPD: abnormal CD4+CD25+ regulatory T-lymphocyte response to tobacco smoking.** *Eur Respir J.* 2008; 31(3):555–62
64. Smyth LJ, Starkey C, Vestbo J, Singh D. **CD4-regulatory cells in COPD patients.** *Chest.* 2007; 132(1):156–63
65. Isajevs S, Taivans I, Strazda G, Kopeika U, Bukovskis M, Gordjusina V, et al. **Decreased FOXP3 expression in small airways of smokers with COPD.** *ERJ.* 2009; 33(1):61-7
66. Vargas-Rojas MI, Ramirez-Venegas A, Limon-Camacho L, Ochoa L, Hernández-Zenteno R, Sansores RH **Increase of Th17 cells in peripheral blood of patients with chronic obstructive pulmonary disease.** *Respir Med.* 2011; 105(11):1648–54
67. Hou J, Sun Y, Hao Y, Zhuo J, Liu X, Bai P, et al. **Imbalance between subpopulations of regulatory T cells in COPD.** *Thorax.* 2013; 68(12):1131-9
68. Kim V, Rogers TJ, Criner GJ. **New concepts in the pathobiology of COPD.** *Proc Am Thorac Soc.* 2008; 5(4):478-85
69. Wang H, Ying H, Wang S, Gu X, Weng Y, Peng W, et al. **Imbalance of peripheral blood Th17 and Treg responses in patients with chronic obstructive pulmonary disease.** *Clin Respir J.* 2015; 9(3):330-41
70. Magalhães R, Stiehl P, Morawietz L, Berek C, Krenn V. **Morphological and molecular pathology of the B cell response in synovitis of rheumatoid arthritis.** *Virchows Arch.* 2002; 441(5):415-27
71. Maul J, Loddenkemper C, Mundt P, Berg E, Giese T, Stallmach A, et al. **Peripheral and intestinal regulatory CD4+ CD25(high) T cells in inflammatory bowel disease.** *Gastroenterology.* 2005; 128(7):1868–78
72. Epple HJ, Loddenkemper C, Kunkel D, Tröger H, Maul J, Moos V, et al. **Mucosal but not peripheral FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells are highly increased in untreated HIV infection and normalize after suppressive HAART.** *Blood.* 2006; 108(9):3072-8



73. Nilsson J, Boasso A, Vellila PA, Zhang R, Vaccari M, Franchini G, et al. **HIV-1-driven regulatory T-cell accumulation in lymphoid tissues is associated with disease progression in HIV/AIDS.** *Blood.* 2006; 108(12):3808-17