



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências da Saúde

Populações linfocitárias na doença obstrutiva pulmonar crónica (DPOC): estudo de células do sangue periférico e revisão da literatura

Luís Daniel Vieira da Costa

Dissertação para a obtenção do grau de Mestre em
Ciências Biomédicas
(2º ciclo de estudos)

Orientador: Prof. Fernando Aguilár Arosa
Co-orientador: Prof.^a Elsa Cardoso

Covilhã, Setembro de 2014

Agradecimentos

Depois de um ano dedicado à pesquisa e escrita desta tese, há muita gente a quem eu quero agradecer.

Em primeiro lugar quero agradecer aos meus coordenadores, Prof. Doutor Fernando Arosa e Prof.^a Doutora Elsa Cardoso por todo o seu trabalho, paciência, dedicação e conhecimento, pois sem isso este projeto nunca teria sido possível. Também agradeço por tudo o que me ensinaram sobre imunologia, citometria de fluxo, métodos de trabalho e práticas laboratoriais. E em especial, agradeço ao Prof. Doutor Fernando Arosa por não ter desistido de mim.

Ao Prof. Doutor Luís Taborda Barata, pela disponibilidade e ajuda que forneceu na aquisição de amostras de sangue de doentes com doença pulmonar obstrutiva crónica. Sem essa ajuda não seria possível a realização desta tese.

Ao Serviço de Imunohemoterapia do Centro Hospitalar Cova da Beira por disponibilizar o transporte de amostras dos *buffy coats* de indivíduos saudáveis, e em particular ao Sr. Rui pela simpatia e preocupação que revelou.

Ao Centro de Coimbra do Sangue e Transplantação por disponibilizar *buffy coats* dos dadores saudáveis.

À Prof.^a Doutora Mafalda Fonseca que teve alguma influência, positiva, na minha escolha desta área e pela ajuda que forneceu no manuseamento do citómetro de fluxo

À minha família, em especial aos meus pais e irmão, por tudo o que fizeram, por acreditarem em mim e por me tornarem na pessoa que sou hoje. Sem eles isto não seria possível. Apesar das dificuldades sempre estiveram do meu lado.

À Mara, pelo amor, carinho, amizade, companhia e força que me deu nestes anos. Obrigado por estares sempre presente, e me apoiares nos momentos mais difíceis.

Ao André, Duarte, Margarida, Marília, Ana, Henrique, Debora, Naia, Diogo que estiveram sempre presentes e me ajudaram a crescer, durante estes longos 5 anos de espírito académico. Por toda a amizade, alegria e carinho um muito obrigado, sem vocês não tinha sido a mesma coisa. Em especial ao André, que tenho como um irmão, pela grande amizade, companheirismo e disponibilidade que revelou desde o início deste percurso académico.

Ao Luís Daniel Crisóstomo e ao David Xavier pelas vezes que me apoiaram, sempre com um sorriso na cara.

À Raquel que apesar do árduo trabalho, foi uma boa colega e sempre se mostrou disponível para ajudar.

De uma forma geral, a todos os meus amigos, tanto de infância como da faculdade, sem esquecer o pessoal do XP. Um muito obrigado a todos!

Resumo

A doença pulmonar obstrutiva crónica (DPOC) é uma doença comum evitável e tratável, caracterizada por dificuldades respiratórias persistentes, geralmente progressiva e associada a respostas inflamatórias crónicas nas vias respiratórias e pulmões devido a partículas ou gases nocivos, sendo uma das suas principais causas o fumo de tabaco. A DPOC é agravada pelas exacerbações e comorbilidades. A organização mundial da saúde previu que por volta de 2030 se tornará na terceira principal causa de morte. Consequentemente, é muito importante compreender o seu funcionamento e as alterações que provoca nos doentes.

Sabe-se atualmente que a resposta inflamatória pulmonar em doentes com DPOC provoca alterações nas populações linfocitárias, podendo, contribuir para o agravamento da doença. Assim, o principal objetivo deste trabalho foi determinar populações linfocitárias em leucócitos isolados de amostras de sangue periférico de doentes com DPOC recorrendo à citometria de fluxo.

A população de estudo foi constituída por oito dadores de sangue saudáveis, os quais constituem o grupo de controlo, e por oito doentes com DPOC. Após serem marcadas com anticorpos específicos, as populações linfocitárias foram quantificadas por citometria de fluxo.

Os principais resultados obtidos foram o aumento de linfócitos T CD8⁺highCD28⁻ no sangue periférico de doentes com DPOC quando comparados com o grupo de controlo. Por outro lado, os níveis de linfócitos B (CD19⁺) estavam bastante diminuídos no sangue periférico de doentes com DPOC, quando comparados com as pessoas saudáveis. Estes resultados experimentais foram discutidos no contexto de uma pesquisa bibliográfica na base de dados PubMed sobre populações linfocitárias em doentes com DPOC.

Palavras-chave

DPOC; linfócitos T; linfócitos B; linfócitos NK e NKT.

Abstract

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is a preventable and treatable common disease characterized by persistent difficulty in breathing, often progressive and associated with chronic inflammatory responses in the airways and lungs due to noxious particles or gases in particular due to tobacco smoke. COPD is aggravated by exacerbations and comorbidities. The World Health Organization has predicted that by 2030 it will become the third leading cause of death. Therefore it is very important to understand its functioning and the changes caused in patients.

It is now known that the pulmonary inflammatory response in patients with COPD causes changes in lymphocyte populations, which may contribute to the worsening of the disease. Thus, the main objective of this study was to determinate lymphocyte populations in isolated leukocytes from peripheral blood samples of patients with COPD, using the flow cytometry.

The study population included eight healthy blood donors who are part of the control group, and eight patients with COPD. After being labelled with specific antibodies, the lymphocyte populations were quantified by flow cytometry. The main results obtained were an increase on number of CD8+highCD28-T cells in patients with COPD compared to the control group. On the other hand the number of B lymphocytes (CD19+) cells was very diminished in patients with COPD when compared with healthy people. These experimental results were discussed under the scope of PubMed Database bibliographic research on lymphocyte population on CPOD patients.

Keywords

COPD; T lymphocytes; B lymphocytes; NK and NKT lymphocytes.

Índice

Capítulo 1 - Introdução	1
1.1 Doença pulmonar obstrutiva crónica: características, relevância e implicações na saúde	1
1.2 Diferença entre DPOC e asma	3
1.3 Fisiopatologia da DPOC: estadiamentos GOLD e efeitos sistémicos de doentes com DPOC	4
1.4 Tratamentos farmacológicos da DPOC: broncodilatadores <i>versus</i> anti-inflamatórios	6
1.5 Sistema imunológico e a DPOC: componente inata <i>versus</i> adaptativa	10
1.5.1 Células do sistema imunológico inato e a DPOC	11
1.5.2 Células do sistema imunológico adaptativo e a DPOC	14
Capítulo 2 - Objetivos	16
Capítulo 3 - Materiais e métodos	17
3.1 População de estudo	17
3.2 Isolamento de leucócitos totais e análise por citometria de fluxo	17
3.3 Análise estatística	18
3.4 Revisão da Literatura	19
Capítulo 4 - Resultados	20
4.1 Pesquisa Bibliográfica	20
4.1.1 Linfócitos T CD4+ e CD8+	20
4.1.2 Linfócitos T CD4+CD28- e CD8+CD28-	21
4.1.3 Linfócitos NK (CD3-CD56+) e linfócitos NKT (CD3+CD56+)	23
4.1.4 Linfócitos B (CD19+)	25
4.2 Caracterização clínica dos doentes estudados com DPOC	28
4.3 Análise de populações linfocitárias em doentes com DPOC	30
Capítulo 5 - Discussão e Conclusão	36
5.1 Perspetivas futuras	38
Capítulo 6 - Referências	40

Lista de figuras

Figura 1 - Células imunológicas inatas e adaptativas na patogénese e no curso da doença pulmonar obstrutiva crónica.	11
Figura 2 - Papel do sistema imunológico inato na patogénese da DPOC.	12
Figura 3 - Exemplo de um caso de aquisição de um gráfico de pontos em dispersão frontal (FSC) - lateral (SSC) de luz por citometria de fluxo.	30
Figura 4 - Exemplos de aquisição de diferentes populações linfocitárias por citometria de fluxo.	31
Figura 5 - Gráficos de barras de percentagem de linfócitos para cada grupo de indivíduos. ..	33
Figura 6 - Gráficos de barras de percentagem de linfócitos CD3-CD56+ e linfócitos CD19+. ..	34
Figura 7 - Gráficos de barras de percentagem de linfócitos em doentes com DPOC agrupados de acordo com a severidade da doença.	35

Lista de tabelas

Tabela 1 - Classificação espirométrica da doença pulmonar obstrutiva crónica baseada no VEF ₁ após broncodilatador	4
Tabela 2 - Tratamento farmacológico inicial da DPOC.....	9
Tabela 3 - Anticorpos usados na marcação das células para citometria de fluxo	18
Tabela 4 - Resultados da pesquisa bibliográfica.....	27
Tabela 5 - Registo de dados dos doentes com DPOC voluntários para o estudo.	28
Tabela 6 - Hemograma dos doentes voluntários com DPOC estudados.....	29
Tabela 7 - Média dos níveis das populações estudadas, classificadas por grupos.	32

Lista de abreviaturas

ACD - Anticolinérgicos de curta duração

ADN - Ácido desoxirribonucleico

ALD - Anticolinérgicos de longa duração

BC - Bronquite Crónica

BCD - β_2 -agonistas de curta duração

Bcl- linfoma celular B (do inglês *B cell lymphoma*)

BLD - β_2 -agonistas de longa duração

CAT - Teste de avaliação da DPOC (do inglês *COPD Assessment Test*)

CD - Células dendríticas

CF - Citometria de fluxo.

CHCM - Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média

CI - Corticosteroides inalados.

CT - Corticosteroides

CVF - Capacidade vital forçada

DME - Disfunção muscular esquelética

DPOC - Doença pulmonar obstrutiva crónica

EF - Ex-fumador

F - Fumador

FSC - Dispersão frontal da luz (do inglês *Forward Scatter*)

GOLD - Iniciativa Global para DPOC (do inglês *Global initiative for chronic Obstructive Lung Disease*)

HCM= Hemoglobina Corpuscular Média

IF4 - Inibidor de fosfodiesterase-4.

IFN - Interferão

IG - Imunoglobulina

IL - Interleucina

KIR - (do inglês) *Killer cell Immunoglobulin-like Receptor*

MA - Macrófagos Alveolares

mMRC - Questionário do Conselho Médico Britânico Modificado (do inglês *Modified British Medical Research Council*)

N - Não

NK - (do inglês) *Natural Killer*

PSF - Pessoas saudáveis fumadoras

PSNF - Pessoas saudáveis não fumadoras

S - Sim

SSC - Dispersão lateral da luz (do inglês *Side Scatter*)

SSE - Sem significância estatística

TNF - Fator de necrose tumoral

VCM - Volume Corpuscular Médio

VEF₁ - Volume expiratório forçado no primeiro segundo

Capítulo 1

Introdução

1.1 Doença pulmonar obstrutiva crónica: características, relevância e implicações na saúde

A doença pulmonar obstrutiva crónica (DPOC) é uma doença comum evitável e tratável, sendo caracterizada por uma limitação respiratória persistente que é geralmente progressiva e associada a uma resposta inflamatória crónica nas vias respiratórias e pulmões devido a partículas ou gases nocivos (1, 2). As exacerbações^a e comorbilidades^b, contribuem para a gravidade global de cada doente (2, 3). A DPOC afeta mundialmente mais de 200 milhões de pessoas e, segundo a organização mundial de saúde, é a quarta principal causa de morte. O principal fator de risco ambiental é o fumo do tabaco havendo 20% dos fumadores a desenvolver DPOC (4).

Prevê-se que esta doença tornar-se-á num dos principais desafios da saúde nas próximas décadas. Estudos de prevalência sugerem que até um quarto dos adultos com 40 anos, ou mais, possuem uma leve obstrução das vias respiratórias. A organização mundial da saúde prevê que por volta de 2030 se tornará na terceira principal causa de morte (5). A inalação de fumo de tabaco e de outras partículas nocivas, como fumo de combustíveis de biomassa, causam inflamação pulmonar. Esta resposta inflamatória crónica pode induzir destruição dos tecidos do parênquima (resultando em enfisema) e pode perturbar os mecanismos de reparação e de defesa normais (resultando em fibrose das pequenas vias respiratórias). Estas alterações patológicas levam ao aprisionamento de ar e a limitações progressivas do fluxo respiratório, e por sua vez à falta de ar e outros sintomas característicos da DPOC.

A limitação crónica do fluxo respiratório, característica da DPOC, pode ser causada por bronquiolite obstrutiva e/ou pela destruição do parênquima pulmonar (enfisema), sendo que as contribuições relativas destas duas patologias variam de pessoa para pessoa (6). A bronquite crónica (BC) é uma entidade clínica e epidemiológica, definida como a presença de tosse e expetoração durante pelo menos 3 meses em cada um de dois anos consecutivos. A tosse crónica e produção de expetoração são sintomas de hipersecreção de muco nas vias respiratórias proximais (7). A bronquite crónica é considerada uma das principais

^a Eventos agudos caracterizados pelo agravamento dos sintomas respiratórios do doente que estão para além das variações normais do dia-a-dia e levam a uma alteração da medicação [2].

^b Doenças que geralmente não alteram o tratamento da DPOC e são tratadas como se o doente não tivesse DPOC; estas coexistem com a DPOC e podem ter um impacto significativo no prognóstico [2].

manifestações da DPOC, mas a sua prevalência é muito variável. Em estudos de base populacional foi encontrada menor prevalência (14-30%) (8), sendo esta maior em estudos clínicos (27.3-74.1%) (9). Segundo certos estudos, a BC pode ser uma desordem pulmonar independente, que pode ou não estar associada com a DPOC. Contudo a BC não é uma manifestação inconsequente em doentes com DPOC e está associada com maior risco de mortalidade (10), exacerbações frequentes, incluindo aquelas que requerem hospitalização, sintomas respiratórios mais graves, limitação de atividade física, pior estado geral de saúde (8) e maior progressão da doença (7). Alguns dados mostram que a exposição ocupacional a poeiras do ar, gases e vapores está consistentemente associada à bronquite crónica e a uma maior capacidade de difusão pulmonar. Isto sugere que a exposição ocupacional em doentes com DPOC produz bronquite em vez de enfisema (11). Os enfisemas são uma manifestação histopatológica da DPOC (12) e são definidos anatomicamente pelo permanente alargamento destrutivo dos espaços respiratórios distais aos bronquíolos terminais, sem fibrose óbvia (13). Estes provocam uma diminuição do recolhimento elástico levando, conseqüentemente, à diminuição da permeabilidade das pequenas vias respiratórias durante a expiração, causando uma limitação no fluxo respiratório, que não é totalmente reversível, e a um aumento do volume residual pulmonar (12).

Apesar da DPOC ser primariamente uma doença dos pulmões, existe atualmente uma constatação de que muitas das manifestações da doença ocorrem fora do pulmão, tais como caquexia, disfunção muscular esquelética (DME), depressão e osteoporose (14). Todas estas manifestações potenciam a morbidez da DPOC, levando ao aumento de hospitalização e custos de saúde (3).

Apesar dos conhecimentos que existem sobre a DPOC, ela permanece com mortalidade crescente, provavelmente porque não se procura o diagnóstico precoce e a prevenção como foi feito noutras doenças (doença arterial coronária, cancro e enfartes). Sendo, assim, torna-se necessário o desenvolvimento de novas formas para diagnosticar antecipadamente esta doença, uma vez que a DPOC é evitável na sua fase inicial (15).

A prevalência, a morbilidade e a mortalidade da DPOC variam entre países e entre diferentes grupos nesses mesmos países. Sendo resultado de uma exposição crónica, muitas vezes a prevalência da DPOC está diretamente relacionada com os hábitos tabágicos, ou em certos países com simples facto de andar na rua, exposição no trabalho, e estar sujeito a poluição em espaços fechados (esta última resultante da queima de madeira e outros combustíveis de biomassas), sendo estes considerados os principais fatores de risco (2). A prevalência da DPOC (no estadio 1) é sensivelmente maior em fumadores e ex-fumadores, com mais de 40 anos em comparação com aqueles com menos de 40 anos, do que em não fumadores e é maior em homens do que em mulheres (6). Medidas de morbilidade incluem tradicionalmente consultas médicas, visitas ao departamento de emergência e hospitalizações. A morbilidade por DPOC aumenta com a idade (16, 17) e pode ser afetada

por outras condições crônicas de comorbilidades (por exemplo, doença cardiovascular, ou diabetes *mellitus*), que são frequentes em doentes com DPOC e podem ter impacto sobre o estado de saúde do doente, bem como interferir com a gestão de DPOC.

O baixo reconhecimento e subdiagnóstico da DPOC ainda afetam a precisão dos dados de mortalidade (18) com a DPOC a ser, frequentemente, listada como uma causa contribuinte para a morte ou sendo completamente omitida na certidão de óbito (19). Como anteriormente referido, prevê-se um aumento da mortalidade da DPOC, sendo este impulsionado principalmente pela expansão da epidemia do tabagismo, redução da mortalidade por outras causas comuns de morte e envelhecimento da população mundial. Apesar das campanhas contra o tabagismo, a prevalência da doença e as taxas de mortalidade por DPOC continuará a aumentar, também devido a outro aspeto importante: a falta de conhecimento que muitos doentes têm sobre a doença (18).

1.2 Diferença entre DPOC e asma

Tanto a DPOC como a asma são doenças respiratórias obstrutivas crônicas que envolvem inflamação nas vias respiratórias e podem ser difíceis de distinguir (13, 20). Doentes assintomáticos com risco de DPOC, principalmente fumadores, nem sempre são testados a nível da deterioração da função pulmonar pelos seus médicos de cuidados primários, e desse modo, aos doentes com sintomas de DPOC pode ser diagnosticada asma (15).

A asma é uma doença inflamatória crônica das vias respiratórias na qual participam diferentes tipos de células. A inflamação crônica está associada a hiperresponsividade das vias respiratórias, que levam a episódios recorrentes de pieira, falta de ar, aperto no peito e tosse, particularmente à noite ou no início da manhã. Estes episódios são normalmente associados com ampla, mas variável, obstrução ao fluxo respiratório no pulmão, que muitas vezes é reversível espontaneamente ou com tratamento (20). Ao contrário da asma, a limitação respiratória da DPOC não é completamente reversível, e é normalmente progressiva, mas os sintomas podem ser difíceis de distinguir dos asmáticos, principalmente quando estão em causa os asmáticos idosos e fumadores (21, 22). Outro problema, é que a asma e a DPOC podem envolver tipos de células inflamatórias recrutadas comuns, diferindo apenas na sua localização no pulmão (23). Contudo observou-se que os doentes com asma possuem mais sensibilidade alérgica, maior eosinofilia no sangue periférico, lavagem broncoalveolar e escarro, níveis mais elevados de imunoglobulinas IgE sérica, maiores aumentos no volume expiratório forçado no primeiro segundo (VEF₁) após tratamento com corticosteroides e menor histórico de consumo de tabaco, quando comparados aos doentes com DPOC (22, 24).

1.3 Fisiopatologia da DPOC: estadiamentos GOLD e efeitos sistémicos de doentes com DPOC

As alterações patológicas nos pulmões levam a alterações fisiológicas características da doença, incluindo a hipersecreção de muco, disfunção ciliar, limitação do fluxo respiratório, hiperdilatação pulmonar, anomalias nas trocas gasosas e hipertensão pulmonar. Geralmente desenvolvem-se, por esta ordem, com a evolução da doença. A hipersecreção do muco e a disfunção ciliar levam à tosse crónica e à produção de expectoração. Estes sintomas podem estar presentes durante muitos anos antes de outros sintomas ou anomalias fisiológicas se desenvolverem. A limitação do fluxo respiratório, medida através da espirometria, é a mudança fisiológica característica da DPOC e a chave para o diagnóstico da doença. É causada principalmente por obstrução fixa das vias respiratórias e pelo conseqüente aumento na resistência das vias respiratórias. A destruição das conexões alveolares, que inibem a capacidade das pequenas vias respiratórias manter a permeabilidade, desempenha um papel menor (25). A gravidade da DPOC é determinada pelo grau de limitação do fluxo respiratório, e a progressão da doença é avaliada por um declínio no VEF_1 (26).

Tabela 1 - Classificação espirométrica da doença pulmonar obstrutiva crónica baseada no VEF_1 após broncodilatador.

Categoria	Gravidade	VEF_1	Sintomas
GOLD 1*	Suave	$VEF_1/CFV < 0,70$ $VEF_1 \geq 80\%$ do previsto	Tosse crónica Produção de expectoração (pode ou não estar presente)
GOLD 2**	Moderada	$VEF_1/CFV < 0,70$ $50\% \leq VEF_1 < 80\%$ do previsto	Falta de ar Tosse Produção de expectoração
GOLD 3	Severa	$VEF_1/CFV < 0,70$ $30\% \leq VEF_1 < 50\%$ do previsto	Maior falta de ar Menor capacidade de exercício físico Fadiga Exacerbações repetidas
GOLD 4	Muito Severa	$VEF_1/CFV < 0,70$ $VEF_1 < 30\%$ do previsto	Sintomas severos

A limitação do fluxo respiratório, determinado pela espirometria é dividida em quatro categorias (GOLD 1, leve; GOLD 2, moderada; GOLD 3, grave e GOLD 4, muito grave) usando o VEF_1 pós-broncodilatador. A razão fixa VEF_1 / capacidade vital forçada (CVF) menor que 0,70 é também usada para definir a espirometria. *Doentes ainda não desconfiam que a sua função pulmonar está anormal. **Doentes começam a procurar ajuda médica. Modificado de (6).

Uma maneira de classificar o estado da DPOC é um método baseado na população usando a classificação espirométrica da iniciativa global para a doença pulmonar obstrutiva crónica ou GOLD (do inglês *Global initiative for chronic Obstructive Lung Disease*), em que as categorias GOLD 3 ou GOLD 4 indicam grande risco (Tabela 1). A Tabela 1 mostra a classificação da gravidade da limitação do fluxo respiratório na DPOC. Os pontos de mudança específicos de espirometria são usados para fins de simplicidade. A espirometria deve ser realizada após a administração de uma dose adequada de um broncodilatador inalado de

curta ação para minimizar a variabilidade (2). A espirometria é a medida mais reprodutível e objetiva para a limitação do fluxo respiratório disponível. Contudo ela por si só não pode ser usada de forma confiável, pois apesar da sua boa sensibilidade, possui uma fraca especificidade como único teste de diagnóstico.

Além da severidade da limitação respiratória, na avaliação da DPOC, deve-se também considerar outros aspetos da doença, como é o caso do nível atual de sintomas do doente, o risco de exacerbações e a presença de comorbilidades (2).

Estudos confirmam que a DPOC com exacerbações frequentes são vistas como um fenótipo distinto que acontece nas fases moderadas e graves da doença e que a incidência de exacerbações frequentes aumenta com o aumento da gravidade da doença constituindo, assim, um determinante muito importante na classificação da DPOC. Esta descoberta apoia a hipótese de que os doentes que estão mais sujeitos a exacerbações frequentes, alguns dos quais têm a doença mais branda, têm um fenótipo de suscetibilidade distinto que é relativamente estável ao longo do tempo e pode ser identificado com base na lembrança de eventos previamente tratados do doente (27).

Recentemente, além das patologias pulmonares típicas da DPOC (isto é, bronquite crónica e enfisema), têm sido descritos vários efeitos que ocorrem noutros sistemas do organismo, como anteriormente referido, chamados de efeitos sistémicos da DPOC. Estes efeitos são clinicamente relevantes, pois podem modificar e ajudar na classificação e tratamento da doença (28). Em particular, dentro destes efeitos, cabe referir a DME, perda de peso e osteoporose. Vários estudos têm mostrado claramente que a DME contribui, frequente e significativamente para limitações das capacidades físicas e na qualidade de vida destes doentes. A identificação da DME como um grande efeito sistémico da DPOC tem aumentado o interesse na fisiologia do músculo-esquelético na DPOC de forma muito significativa e tem claramente contribuído para uma melhor definição do papel do exercício físico (29, 30) e dos programas de reabilitação na gestão clínica desses doentes (31, 32). A DME na DPOC tem assim duas consequências óbvias: 1º) contribui significativamente para a perda de peso, um fator de prognóstico negativo nesses doentes (33), 2º) é uma das principais causas que limita o exercício (30), tendo um impacto profundo na qualidade de vida. Outros estudos demonstraram que a perda de peso (associada com perda de massa muscular), outro efeito sistémico da DPOC, é um fator de prognóstico negativo, Porém ao contrário das mudanças no VEF_1 , a perda de peso, em doentes com DPOC, é reversível com terapia adequada, e quando isso acontece o prognóstico melhora (33).

A identificação da perda de peso e da DME como efeitos sistémicos da DPOC chamou a atenção para a importância do suporte nutricional, muitas vezes combinados com programas de exercícios, para a melhoria da qualidade de vida e prognóstico desses doentes, podendo ser visto como outro meio, complementar, na ajuda da classificação da doença (29, 34). Com base na importância da função muscular, na conhecida morbidade e na qualidade de vida, os tratamentos devem ser baseados em caracterizações adequadas dos doentes. Estas

caracterizações precisam incluir, pelo menos, as avaliações da função do músculo-esquelético e respiratório da massa muscular (34).

A osteoporose, definida como a degradação da microarquitetura do osso devido à diminuição da densidade mineral óssea (35), pode ter múltiplas causas, isoladamente ou combinadas, incluindo uma má nutrição, sedentarismo e tabagismo (36). Uma vez que a maioria deles já são considerados potenciais fatores patogénicos da DME na DPOC, podem, teoricamente, também contribuir para a osteoporose, e, neste contexto, a osteoporose excessiva em relação à idade também pode ser considerada um efeito sistémico da DPOC (37).

Concluindo, a doença pulmonar obstrutiva crónica tem uma componente sistémica importante e a avaliação clínica da DPOC deve ter em consideração os componentes sistémicos da doença. O tratamento destes efeitos extrapulmonares parece ser importante na gestão clínica da doença. Uma melhor compreensão dos efeitos sistémicos da DPOC pode permitir novas estratégias terapêuticas que possam resultar num melhor estado de saúde e prognóstico para esses doentes (28).

1.4 Tratamentos farmacológicos da DPOC: broncodilatadores *versus* anti-inflamatórios

Existem várias classes de medicamentos para o tratamento das exacerbações da DPOC. Os broncodilatadores inalatórios são os principais agentes farmacológicos que melhoram os sintomas, diminuem as exacerbações, melhoram a capacidade física e a qualidade de vida dos doentes com DPOC (38). Broncodilatadores inalatórios podem ser, por exemplo, os β_2 -agonistas, em que a sua principal ação é relaxar as vias respiratórias do músculo liso, estimulando recetores β_2 -adrenérgicos (39), ou antagonistas do recetor colinérgico que funcionam competindo com a acetilcolina, inibindo a sua ação na zona de recetores do pulmão e, indiretamente, a contração do músculo liso das vias respiratórias (40). O primeiro pode ser de ação curta (por exemplo, salbutamol), ou de ação longa (por exemplo, fumarato de formoterol e xinafoato de salmeterol). Do mesmo modo, os antagonistas dos recetores colinérgicos podem ser de curta duração (por exemplo, brometo de ipratrópio) ou de longa duração (por exemplo, brometo de tiotrópio). Doentes com limitação respiratória leve podem ser tratados com um único broncodilatador seja salbutamol ou ipratrópio; ambos os fármacos são eficazes para aliviar sintomas e melhorar a respiração. Contudo a combinação de broncodilatadores de curta duração, agonistas do recetor β_2 -adrenérgico com antagonistas do recetor colinérgico, mostrou ter uma maior broncodilatação do que cada fármaco usado sozinho (39, 41). Assim como combinar agonistas do recetor β_2 -adrenérgico de longa duração com antagonistas do recetor colinérgico de curta duração mostrou melhorar a obstrução das vias respiratórias (42).

O facto de a DPOC estar associada com inflamação crónica, levou ao uso de anti-inflamatórios esteroides, como por exemplo corticosteroides. Corticoides inalatórios, como a fluticasona ou budesonida têm sido usados para encurtar o tempo de recuperação, melhorar a função pulmonar, hipoxemia arterial, diminuir o tempo de internação hospitalar (2, 43), melhorar os sintomas, a qualidade de vida e para reduzir a frequência de exacerbações em doentes com DPOC com $VEF_1 < 50\%$ (44). Porém os corticosteroides inalados possuem efeitos adversos como a candidíase oral, rouquidão da voz e contusões na pele. O tratamento a longo prazo com corticosteroides inalados tem demonstrado estar associada a um risco aumentado de pneumonia (45). Os corticosteroides orais não são recomendados como monoterapia de longo prazo em doentes com DPOC e têm numerosos efeitos secundários, se administrados dessa forma.

Os antibióticos também costumam ser usados nas exacerbações quando os doentes têm sinais clínicos de infeção bacteriana, tais como um aumento de pus na expectoração (46). A duração recomendada de antibioticoterapia é geralmente 5-10 dias. A escolha do antibiótico deve basear-se no padrão local de resistência bacteriana (2).

A avaliação da DPOC é feita considerando, separadamente, os sintomas atuais do doente, a severidade da anormalidade espirométrica, o risco de exacerbações e a presença de comorbilidades. Os guias GOLD recomendam o questionário do Conselho Médico Britânico Modificado ou mMRC (do inglês *Modified British Medical Research Council*), em que um nível alto de sintomas é indicado por um grau maior que dois ou no caso do Teste de Avaliação da DPOC ou CAT (do inglês *COPD Assessment Test*) um resultado maior que dez, este último com uma cobertura mais ampla no impacto da DPOC sobre a vida diária e bem-estar do doente. (47). A avaliação de espirometria é necessária para classificar a gravidade da limitação do fluxo respiratório. A melhor previsão para ter exacerbações frequentes (2 ou mais exacerbações por ano) é a história de eventos tratados anteriormente, que neste caso indicam maior risco (48). A avaliação de comorbilidades é essencial na DPOC, uma vez que estas podem influenciar a mortalidade e hospitalizações (49). Combinando estas avaliações da DPOC surgem quatro grupos de doentes com DPOC (Tabela 2) (2). O grupo A (baixo risco, menos sintomas): GOLD 1 ou 2 (limitação respiratória leve ou moderada) e/ou 0-1 exacerbações por ano e grau de mMRC 0-1 ou resultado CAT <10; o grupo B (baixo risco, mais sintomas): GOLD 1 ou 2 (limitação respiratória leve ou moderada) e/ou 0-1 exacerbações por ano e grau de mMRC ≥ 2 ou resultado CAT ≥ 10 ; o grupo C (alto risco, menos sintomas): GOLD 3 ou 4 (limitação respiratória severa ou muito severa) e/ou ≥ 2 exacerbações por ano e grau de mMRC 0-1 ou resultado CAT <10; o grupo D (alto risco, mais sintomas): GOLD 3 ou 4 (limitação respiratória severa ou muito severa) e/ou ≥ 2 exacerbações por ano e grau de mMRC ≥ 2 ou resultado CAT ≥ 10 (49).

Um modelo proposto para a gestão farmacológica inicial de DPOC de acordo com a avaliação dos sintomas individualizados e risco de exacerbações é apresentado na Tabela 2. Para os doentes do grupo A, que possuem poucos sintomas e um baixo risco de exacerbações,

é recomendado o uso de um broncodilatador de curta duração (β_2 -agonistas ou anticolinérgicos) como primeira escolha com base nos seus efeitos sobre a função pulmonar e falta de ar. Como segunda opção pode-se usar uma combinação de broncodilatadores de curta duração ou a introdução de um broncodilatador de longa duração (2, 49). Contudo as evidências são um pouco fracas, pois existem poucos estudos sobre a combinação de broncodilatadores, e a maioria dos ensaios de terapia com broncodilatadores de longa duração foram realizados em doentes com limitações respiratórias mais graves (50). A teofilina, um broncodilatador oral fraco, é um inibidor de fosfodiesterase não seletivo que pode ser uma escolha alternativa. Este fármaco possui propriedades anti-inflamatórias. Contudo, possui efeitos adversos como dor de cabeça, náuseas e insónia (51). A escolha entre β_2 -agonistas, anticolinérgicos, teofilina, ou terapia combinada depende da disponibilidade desses medicamentos e resposta do doente (52).

Os doentes do grupo B possuem sintomas mais significativos, mas continuam com um baixo risco de exacerbações. Os broncodilatadores de longa duração são superiores comparativamente ao de curta duração sendo, portanto, recomendados (sejam β_2 -agonistas ou anticolinérgicos) (50). Não há evidências para recomendar uma classe de broncodilatadores de longa duração sobre outra para o tratamento inicial. Em cada doente, a escolha tem de depender da perceção do alívio dos sintomas do doente. Para doentes com falta de ar grave, uma segunda opção é a combinação, por exemplo, de broncodilatadores de longa duração anticolinérgicos com β_2 -agonistas (49, 53). Os doentes que são tratados com a combinação de broncodilatadores de longa duração devem ser cuidadosamente seguidos e os efeitos desse tratamento devem ser avaliados. Apenas foram relatados estudos, desta opção, a curto prazo. Escolhas alternativas incluem ainda broncodilatadores de curta duração ou teofilina (2).

Doentes do grupo C têm poucos sintomas mas um alto risco de exacerbações. Como primeira opção, um anticolinérgico de longa duração, ou uma combinação de corticosteroides com β_2 -agonistas de longa duração são recomendados (44, 50, 54, 55). O uso de broncodilatadores de longa duração anticolinérgicos com β_2 -agonistas reduz o risco de exacerbações e, apesar de não haver estudos a longo prazo, este princípio de tratamento combinado aparenta ser bom. Um inibidor de fosfodiesterase-4, como o roflumilaste, pode também ser adicionado ao tratamento caso o doente tenha bronquite crónica (56).

Tabela 2 - Tratamento farmacológico inicial da DPOC.

Grupo	Estadio GOLD	Sintomas (mMRC/CAT)	Exacerbações (por ano)	Primeira escolha recomendada	Escolha Alternativa	Outro tratamento possível
A	1-2	0-1/<10	0-1	ACD ou BCD	ACD ou BLD ou ACD e BCD	Teofilina
B	1-2	≥2/≥10	0-1	ALD ou BLD	ALD e BLD	ACD e/ou BCD e/ou teofilina
C	3-4	0-1/<10	≥2 (≥ 1 hospitalização)	Inalação de CT e BLD ou ALD	ALD e BLD	IF4 e/ou BCD e/ou ACD e/ou teofilina
D	3-4	≥2/≥10	≥2 (≥ 1 hospitalização)	Inalação de CT e BLD ou ALD	Inalação de CT, BLD e ALD ou inalação de CT, BLD e IF4 ou ALD e BLD ou ALD e IF4	Carbocisteína e/ou BCD e/ou ACD e/ou teofilina

A escolha dentro de cada classe depende da disponibilidade de medicamentos e da resposta do doente. ACD= Anticolinérgicos de curta duração; BCD= B₂-agonistas de curta duração; ALD= Anticolinérgicos de longa duração; BLD= B₂-agonistas de longa duração; CT= Corticosteroides; IF4= Inibidor de fosfodiesterase-4. Modificado de (2).

Por fim, os doentes do grupo D possuem muitos sintomas e um grande risco de exacerbações. O modo de terapia pode ser igual aos doentes do grupo C (β₂-agonistas e anticolinérgicos de ação prolongada) uma vez que a redução do risco de exacerbações é importante. Estes doentes podem ser tratados com uma combinação fixa de corticosteroides inalatórios e β₂-agonistas de ação prolongada ou anticolinérgicos de longa duração (49). As combinações são recomendadas para estes doentes. Essas combinações de fármacos podem ser corticosteroides por inalação e anticolinérgicos de longa ação ou corticosteroides por inalação mais β₂-agonistas de longa ação e anticolinérgicos de ação prolongada (57). Também é possível acrescentar um inibidor de fosfodiesterase-4 para o tratamento, desde que o doente tenha bronquite crónica. Um inibidor da fosfodiesterase-4 é eficaz quando adicionado a broncodilatadores de longa ação. Exemplos de combinações são corticosteroides por inalação com β₂-agonistas de longa ação e inibidores de fosfodiesterase-4, ou anticolinérgicos de longa ação com inibidores fosfodiesterase-4 (56). Escolhas alternativas incluem broncodilatadores de curta ação e teofilina ou carbocisteína (58)

1.5 Sistema imunológico e a DPOC: componente inata *versus* adaptativa

Atualmente é aceite que uma resposta inflamatória excessiva ou inadequada nos pulmões, devido uma variedade de gases ou partículas nocivas inaladas, (principalmente fumo de tabaco) é um mecanismo chave na patogenicidade da DPOC. Vários estudos têm mostrado que a resposta inflamatória pulmonar é caracterizada por um aumento no número de neutrófilos, macrófagos e linfócitos T, com predominância de CD8+, por concentrações aumentadas de moléculas e citocinas pró-inflamatórias, tais como o leucotrieno B4, a interleucina-8 (IL-8) e o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), entre outros (28, 59). Apesar de ser menos frequente, podem ser detetadas alterações inflamatórias semelhantes na circulação sistémica destes doentes, incluindo evidências de stress oxidativo, a presença de células inflamatórias ativadas e aumento dos níveis plasmáticos de citocinas pró-inflamatórias (28).

O sistema imunológico inato é composto por células mieloides tais como granulócitos, monócitos, macrófagos e por células linfoides tais como as linfócitos NK (do inglês *Natural Killer*). A resposta imunológica inata é dependente de recetores invariantes que reconhecem padrões conservados encontrados em moléculas associadas a agentes patogénicos ou a compostos endógenos, indicativos de danos celulares ou tecidulares (60). As células do sistema imunológico inato proporcionam uma resposta inicial à infeção, e/ou a danos nos tecidos. O sistema imunitário adaptativo inclui linfócitos que se desenvolvem no timo, conhecidas como linfócitos T, ou na medula óssea, denominados linfócitos B. Estes linfócitos adaptativos expressam recetores celulares na sua superfície codificados por *loci* de ácido desoxirribonucleico (ADN) que se submetem a recombinações somáticas durante o desenvolvimento destas células para criar uma grande diversidade de especificidades para antigénios (61). O sistema imunológico adaptativo é responsável pela memória imunológica e concentra-se na resposta imunitária a agentes patogénicos específicos. No contexto da DPOC, o sistema imunológico adaptativo e inato cooperam para constituir uma resposta equilibrada aos desafios infecciosos e para reparar o tecido danificado (Figura 1) (62).

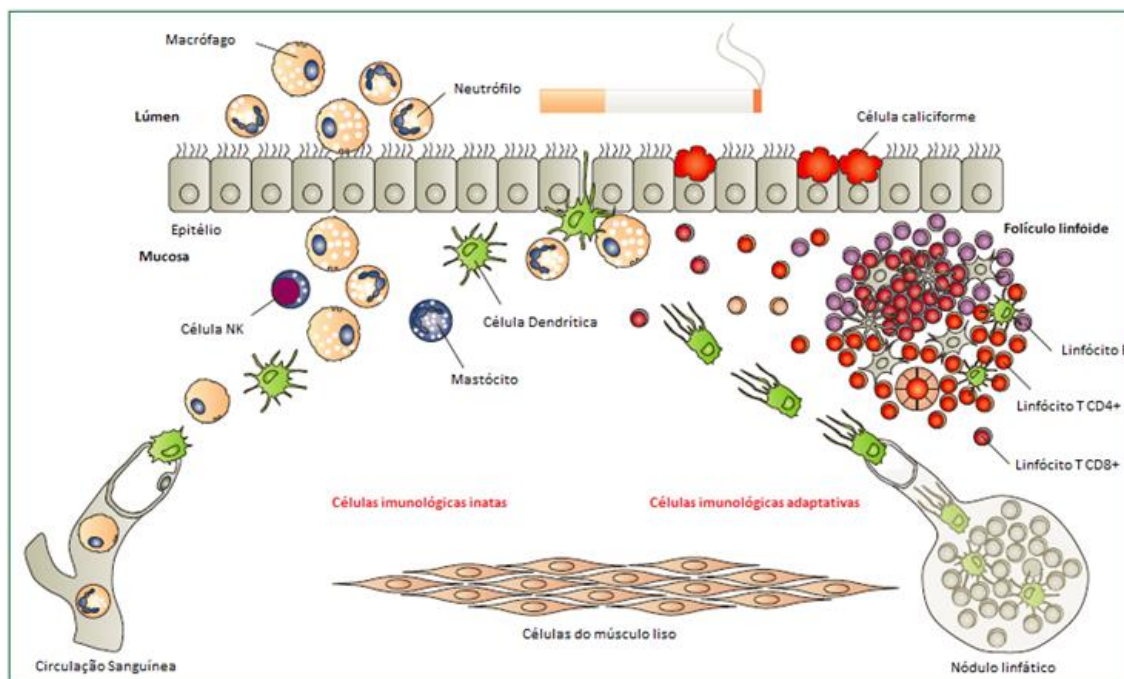


Figura 1 - Células imunológicas inatas e adaptativas na patogênese e no curso da doença pulmonar obstrutiva crônica. O fumo do tabaco ativa as células epiteliais e células do sistema imunológico inato, como macrófagos, neutrófilos e linfócitos NK. As células dendríticas ativadas orquestram respostas imunológicas adaptativas incluindo linfócitos citotóxicos T CD8+, linfócitos T auxiliares CD4+, e as respostas de linfócitos B, que conduzem ao desenvolvimento de nódulos linfáticos na inflamação crônica. Adaptada de (4).

1.5.1 Células do sistema imunológico inato e a DPOC

O sistema imunológico inato é a primeira linha de defesa contra infecções microbianas. Vários fatores humorais e celulares (neutrófilos, macrófagos, células dendríticas, linfócitos *natural killer*, monócitos e mastócitos) que participam na imunidade inata estão presentes em locais do nosso organismo que estão em contacto com o meio exterior, sendo uma das suas funções controlar a entrada potencial de agentes patogénicos (59). O sistema imunológico inato do pulmão é composto por cinco componentes principais: a barreira epitelial das vias respiratórias, macrófagos alveolares, células dendríticas, neutrófilos e linfócitos NK (Figura 2) (4, 63).

O epitélio das vias respiratórias, uma camada pseudoestratificada de células epiteliais que revestem o trato respiratório, é a população inicial de células que interage com os contaminantes ambientais inalados, incluindo os componentes do fumo do tabaco, agentes patogénicos respiratórios e diversas substâncias tóxicas presentes no ar. O fumo do tabaco provoca mudanças dramáticas na arquitetura epitelial das vias respiratórias, levando à diminuição do número de células ciliadas e ao aumento da produção de muco o que está relacionado com a obstrução do fluxo respiratório nos doentes com DPOC (64). Além disso, o fumo do tabaco altera a capacidade das células das vias respiratórias na geração de defesas antimicrobianas eficazes através da supressão da ativação do fator nuclear (NF)- κ B, um fator de transcrição crítico para várias respostas imunológicas inatas (65).

Os macrófagos alveolares (MA) residem na superfície externa ou luminal do epitélio respiratório estando diretamente expostos ao ambiente externo. Sendo os representantes pulmonares do sistema mononuclear fagocitário, os MA são responsáveis por um amplo conjunto de funções de defesa do hospedeiro, incluindo o reconhecimento e a fagocitose de agentes patogénicos e células em apoptose. Os números de MA são significativamente maiores nos pulmões dos fumadores, incluindo aqueles com DPOC, onde os MA se acumulam nas áreas de destruição enfisematosa, e existe uma correlação entre o número de MA, a obstrução das vias respiratórias e a gravidade da DPOC (66). Um mecanismo importante de supressão na função imunológica inata dos MA nos doentes com DPOC é a diminuição da capacidade de se defenderem contra o stress oxidativo induzido pelo fumo (67).

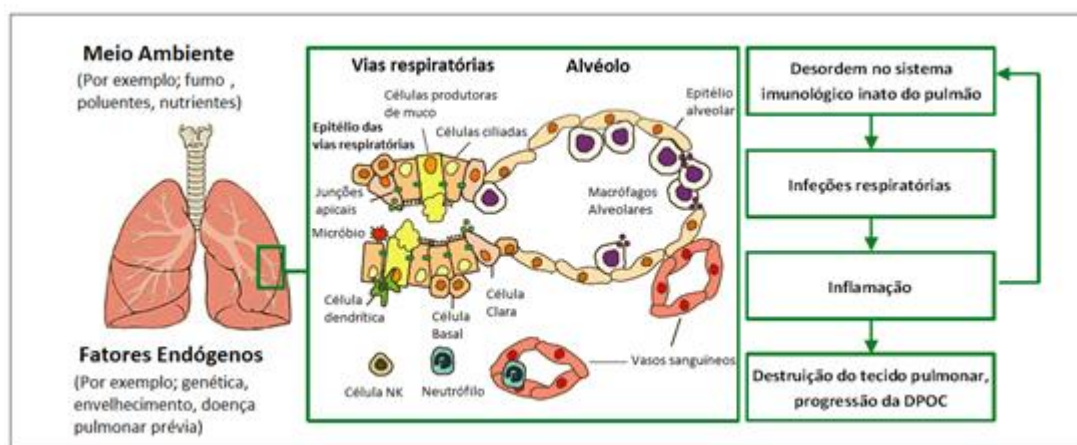


Figura 2 - Papel do sistema imunológico inato na patogénese da DPOC. Vários fatores ambientais e endógenos determinam o estado do sistema imunológico inato do pulmão, a qual inclui a barreira epitelial das vias respiratórias compostas por diferentes populações de células epiteliais (ciliadas, Clara, basais, produtoras de muco) ligadas umas às outras por meio de junções apicais e também por células de defesa de origem hematopoiética tais como macrófagos alveolares, células dendríticas, neutrófilos e linfócitos NK. A exposição crónica ao fumo de tabaco e de outros fatores ambientais prejudiciais, bem como processos endógenos do pulmão, tais como o envelhecimento e as alterações patológicas associadas com doenças anteriores podem suprimir o potencial de defesa do hospedeiro nos mecanismos do sistema imunológico pulmonar, aumentando a suscetibilidade a infeções respiratórias que causam inflamações secundárias e, assim, contribuir para a destruição do tecido pulmonar e declínio progressivo da função pulmonar em doentes com DPOC. Além disso, a inflamação e o dano dos tecidos associada à DPOC suprime ainda mais os mecanismos do sistema imunológico pulmonar. Adaptada de (63).

As células dendríticas (CD) são uma população especializada de células mononucleares responsáveis pelo reconhecimento e captação de agentes patogénicos. As CD das vias respiratórias residem ao lado de células epiteliais e estendem-se por saliências citoplasmáticas para interagir com antígenos luminiais e outros sinais ambientais. As CD migram para os tecidos linfoides locais, como os nódulos linfáticos regionais ou agregados linfoides das mucosas, para apresentarem os antígenos processados aos linfócitos T, iniciando a resposta imunológica adaptativa contra agentes patogénicos (63). Um aumento no número de CD que expressam a langerina, um marcador de CD imaturas, foi encontrado nas pequenas vias respiratórias de doentes com DPOC (68). O número de CD maduras, definido pela expressão do marcador de maturação CD83, está significativamente reduzido nas pequenas

vias respiratórias e alvéolos dos fumadores com DPOC (63). A exposição ao fumo do tabaco diminuiu a frequência e o estado das CD maduras no pulmão e reduziu a ativação e a capacidade das CD para estimular os linfócitos T e iniciar respostas imunológicas antivirais em estudos animais (69).

Em contraste com os MA e as CD, os neutrófilos são células do sistema imunológico inato presentes no tecido pulmonar em pequenas quantidades e em condições de estado estacionário. Todavia, rapidamente migram para os locais de infecção ou lesão, como resposta a um conjunto distinto de quimioatrativos pró-inflamatórios libertados pelas células epiteliais e MA. Uma vez no parênquima pulmonar, os neutrófilos fagocitam bactérias, restos celulares e libertam fatores antimicrobianos e oxidantes altamente reativos que inativam agentes patogénicos. No entanto, estes mediadores também podem danificar o tecido do hospedeiro, caso a resposta inflamatória, mediada por neutrófilos, não seja controlada adequadamente. Na DPOC, a resposta mediada por neutrófilos é bastante dirigida contra o próprio tecido do pulmão. Assim, o aumento do número de neutrófilos observado em doentes com DPOC não é acompanhado pela eficaz eliminação de bactérias, contribuindo ao invés para a obstrução das vias respiratórias e enfisema. Os componentes do fumo do tabaco podem inibir o processo oxidativo e as capacidades fagocíticas dos neutrófilos (70, 71).

Por fim, os linfócitos NK são células da componente inata do sistema imunológico que detetam células infetadas por vírus, transformadas ou stressadas, independentemente do antigénio. Os linfócitos NK secretam uma variedade de citocinas, incluindo interferão- γ (IFN- γ), TNF- α , e IL-12 necessárias para a ativação de outras células imunitárias, ajudando a destruir as células infetadas e transformadas por vírus através da secreção de perforina e outros fatores citotóxicos. Os fumadores apresentam uma atividade de linfócitos NK diminuída, e há evidências recentes de que a exposição de linfócitos NK humanas ao fumo do tabaco inibe a produção de IFN- γ e de TNF- α , a expressão da perforina e a atividade citotóxica dessas células (72). Apesar dos números e função dos linfócitos NK no pulmão de fumadores saudáveis e com DPOC serem controversos, foi observada uma atividade de NK reduzida em linfócitos do sangue em indivíduos com DPOC (73).

Uma imunidade inata deficiente nos pulmões de fumadores provavelmente contribui para o aumento da frequência de infeções bacterianas e virais, uma causa comum de exacerbações da DPOC, e facilita a inflamação secundária causada por agentes patogénicos respiratórios (74). As infeções virais do pulmão suprimem ainda mais o sistema imune inato do pulmão através da degradação de proteínas antimicrobianas e anti-inflamatórias, tais como inibidores de leucoprotease secretor (inibidor de serina protease dos neutrófilos expresso em muitas superfícies mucosas, como a do pulmão (75)) e a lactoferrina, que conduz a uma infeção bacteriana secundária (76). Assim, as inflamações crónicas na DPOC são iniciadas e mantidas por relações complexas das células pulmonares com agentes patogénicos respiratórios, resultando numa ampla repressão dos mecanismos da imunidade inata no

pulmão. Além disso, a desorganização da barreira juncional nas vias respiratórias de fumadores com DPOC resulta num aumento da permeabilidade do epitélio das vias aéreas (77), podendo permitir que os produtos microbianos ou componentes do fumo do cigarro se difundam através da camada epitelial e ativem as células inflamatórias da mucosa nas vias respiratórias.

1.5.2 Células do sistema imunológico adaptativo e a DPOC

Os efetores celulares do sistema imunológico adaptativo são os linfócitos (linfócitos T e B), e as características distintivas deste sistema incluem especificidade antigénica, expansões clonais de linfócitos ativados por antígenos, e a geração de memória imunológica (78). Uma melhor compreensão destes processos imunológicos adaptativos na DPOC pode talvez levar a interdições mais eficazes da doença, incluindo a eliminação ou erradicação de antígeno(s) associados com a inflamação, a indução de tolerância ao(s) antígeno(s), a manipulações de mecanismos imunorreguladores, ou talvez as depleções alvo de subpopulações de linfócitos específicas associadas à doença (79). Antígenos derivados do fumo do tabaco, agentes bacterianos ou virais, produtos de degradação da matriz extracelular, e, possivelmente, auto-antígenos do tecido pulmonar podem provocar respostas imunológicas adaptativas nos pulmões de doentes com DPOC, com a participação de linfócitos T citotóxicos CD8+, linfócitos T auxiliares CD4+, e as respostas dos linfócitos B com produção de anticorpos.

A maior parte dos estudos usando doentes aparentam indicar que os linfócitos T CD8+ apresentam um papel particularmente importante no desenvolvimento e progressão da DPOC (80, 81). A maioria dos investigadores relataram que os linfócitos T CD8+ na DPOC secretam um perfil de citocinas predominantemente do tipo Th1, que inclui o aumento da produção de IFN- γ , proteína induzida pelo interferão (IP-10) e de monócitos induzidos por IFN- γ . Por sua vez, estes mediadores podem causar a destruição dos tecidos através do aumento da expressão de metaloproteinases na matriz, da produção de macrófagos e outros efetores imunológicos (82). O número de linfócitos T CD8+ aumenta substancialmente em estádios de limitação respiratória e enfisema (83). Estes, quando ativados, libertam enzimas proteolíticas como perforinas e granzimas, que causam morte celular das células epiteliais por apoptose ou necrose (80, 84). Embora a função dos linfócitos T CD8+ se encontre em destaque nos estudos da DPOC, os linfócitos T CD4+ possuem contribuições potenciais no processo da doença que também parecem ser substanciais. Ainda que tipicamente menos frequentes do que linfócitos T CD8+, os linfócitos T CD4+ intraparenquimais também estão presentes em números anormalmente aumentados dentro dos pulmões com enfisema (81).

Os linfócitos T CD4+ são, em grande parte responsáveis, por orquestrar processos imunológicos pela libertação de citocinas ativadoras, e são importantes, se não críticos, na focagem e amplificação de respostas inflamatórias de outros agentes celulares imunológicos (79). O número de linfócitos T CD4+ é maior nas vias respiratórias e pulmões de fumadores

com DPOC. Há dois subtipos de linfócitos T CD4+ que se acumulam nos pulmões de doentes com DPOC estável, os linfócitos Th1 e Th17 (23, 85, 86). Os linfócitos Th1 segregam mais IFN- γ , enquanto que os linfócitos Th17 regulam a inflamação do tecido através da produção de IL-17A e IL-17F (87, 88).

As ações dos linfócitos T CD4+ são essenciais para o pleno desenvolvimento da citotoxicidade adaptativa imunológica por ativação inicial (reduzindo os limiares de ativação) e para promover a sobrevivência a longo prazo dos linfócitos T CD8+. A ajuda facultativa fornecida pelos linfócitos T CD4+ também é importante para a ativação e diferenciação de linfócitos B na produção de anticorpos. Esta "ajuda" é especialmente crítica para induzir linfócitos B a comutarem o isotipo de IgM para IgG com afinidade de ligação mais potente, particularmente contra antigénios proteicos (79).

Apesar de emergirem novas evidências sobre os linfócitos B foliculares, o seu papel patogénico na DPOC ainda é controverso; podem ser benéficas se protegerem contra a colonização e infeção microbiana, ou prejudicial se forem dirigidas contra antigénios do tecido pulmonar (59). A DPOC tem também sido considerada como uma doença autoimune, com base na presença de folículos linfocitários de linfócitos B em doentes com DPOC avançada e na deteção de vários auto-anticorpos no soro de doentes com DPOC (89, 90).

A acumulação destas evidências indica que as respostas inflamatórias e imunológicas crónicas desempenham papéis fundamentais no desenvolvimento e progressão da DPOC. Vários mediadores moleculares e celulares das respostas imunológicas inatas e adaptativas são considerados como alvos terapêuticos. Porém, muita pesquisa tem que ser feita antes de surgirem novos medicamentos para DPOC.

Capítulo 2

Objetivos

1. Sumariar os dados científicos relativos a populações linfocitárias T, B e NK em doentes com DPOC publicados em artigos originais durante os últimos 5 anos.
2. Determinar as populações linfocitárias em amostras de sangue periférico de doentes com DPOC e em controlos saudáveis, por citometria de fluxo.
3. Avaliar a relação entre populações linfocitárias e estadios da doença (graus II, III e IV)
4. Comparar e discutir os resultados experimentais com os dados publicados.

Capítulo 3

Materiais e métodos

3.1 População de estudo

Os indivíduos estudados foram subdivididos em dois grupos: grupo de controlo e grupo de doentes com DPOC. Oito dadores de sangue saudáveis (3 femininos e 4 masculinos; idade média±SEM, 35±3 anos) foram usados como controlo. As amostras (*buffy coats*) foram recolhidas no Instituto Português do Sangue e da Transplantação em Coimbra, tendo sido, posteriormente enviadas para o Centro Hospitalar da Cova da Beira da Covilhã. Foram também usadas amostras de oito doentes com DPOC (Todos do género masculino; idade média±SEM, 65±3 anos). Todos eles estavam medicados com broncodilatadores e corticosteroides inalados (fluticasona ou budesonina) e nenhum dos doentes tomou corticosteroides orais. Neste caso as amostras consistiam em sangue periférico (aproximadamente 5mL recolhido num tubo com anticoagulante). Estes doentes foram submetidos a um formulário de registo de dados, com a caracterização demográfica, dados clínicos, função pulmonar e um hemograma. Os doentes estudados não tiveram exacerbações recentes (menos de 4 semanas), não se encontravam a tomar imunomoduladores ou imunossuppressores orais e não tinham história de asma, doenças autoimunes ou outras doenças relevantes do pulmão (por exemplo, neoplasia pulmonar, défice de α 1-anti-tripsina), tuberculose ou outra infeção atual (critérios de exclusão). Em relação aos voluntários saudáveis apenas se teve acesso à idade e género. Todos os dadores de sangue permanecem anónimos, tendo sido apenas registados os dados dos doentes com DPOC que se encontram na Tabela 6. Todos os indivíduos deram o consentimento informado e o estudo foi aprovado pela comissão de ética do Centro Hospitalar da Cova da Beira.

3.2 Isolamento de leucócitos totais e análise por citometria de fluxo

O isolamento de leucócitos totais foi efetuado através da lise dos eritrócitos. Assim, estes foram primeiramente lisados com solução de lise (10mM Trizma Base, 150mM NH_4Cl , pH 7.2) pré-aquecida, durante 10 minutos a 37°C. Depois as células foram lavadas duas vezes com PBS 1X. A marcação foi realizada a 4°C durante 30 minutos em solução de marcação (PBS, 0.2% albumina de soro bovino (BSA), 0.1% NaN_3) em placas de 96 poços com 0.5×10^6 células/poço. Os anticorpos usados para marcação foram o anticorpo anti-humano CD3 conjugado-PE, anticorpo anti-humano CD3 conjugado-APC, anticorpo anti-humano CD4 conjugado-PE, anticorpo anti-humano CD8 conjugado-PE, anticorpo anti-humano CD8

conjugado-PE/Dy647, anticorpo anti-humano CD19 conjugado-FITC (Immunotools, Friesoythe, Germany), anticorpo anti-humano CD56 conjugado-Alexa488 (BD Biosciences) e anti-humano CD28 conjugado-PE/Cy5 (BioLegend, London, United Kingdom) (Tabela 3). Na marcação de células usaram-se diferentes combinações de anticorpos: CD3-PE/CD8-PEDy647, CD3-APC/CD4-PE, CD8-PE/CD28-PECy5, CD4-PE/CD28-PECy5 e CD56-Alexa488/CD3-PE. Na marcação de linfócitos B foi efetuada marcação simples, usando apenas um anticorpo (anti-humano CD19-FITC). No controlo negativo não foi adicionado qualquer anticorpo. Posteriormente centrifugaram-se as células a 1100 rpm com a solução PBS, 0.2% BSA, 0.1% NaN₃ três vezes, e uma quarta vez com PBS 1X para lavar as células. Para finalizar as células foram transferidas para tubos de FACS, contendo 500µl de solução PBS 1X para serem adquiridas no citometro de fluxo e analisadas com o programa Cell Quest Pro (FACSCalibur, BD Biosciences). Para cada amostra, foram adquiridos entre 10.000 a 20.000 linfócitos viáveis usando as características de dispersão frontal *versus* lateral de luz (FSC, do inglês *Forward Scatter versus* SSC, do inglês *Side Scatter, respetivamente*).

Tabela 3 - Anticorpos usados na marcação das células para citometria de fluxo

Anticorpo	Clone	Marca	Diluição
Anti-humano CD3-PE	UCHT-1	Immunotools	1:10
Anti-humano CD3-APC	UCHT-1	Immunotools	1:10
Anti-humano CD4-PE	MEM-241	Immunotools	1:10
Anti-humano CD8-PE	MEM-31	Immunotools	1:10
Anti-humano CD8-PE/Dy647	MEM-31	Immunotools	1:20
Anti-humano CD19-FITC	LT19	Immunotools	1:10
Anti-humano CD56-Alexa488	B159	BD Biosciences	1:10
Anti-humano CD28-PE/Cy5	CD28.2	BioLegend	1:10

3.3 Análise estatística

Toda a análise estatística foi efetuada usando o GraphPad Prism 5 (San Diego, California).

Os resultados foram expressos como média \pm SEM. O teste T Student, não emparelhado foi usado para comparar os dados entre os dois grupos, enquanto o teste T Student emparelhado foi usado para comparar os valores entre as populações linfocitárias do hemograma e da citometria de fluxo. Para valores de p menores que 0,05 foi considerado uma diferença estatisticamente significativa.

3.4 Revisão da Literatura

Para a elaboração da revisão bibliográfica foi realizada uma pesquisa sobre populações linfocitárias na base de dados PubMed no período de 2009 a 2014, na espécie humana. Foram usadas como palavras chave “COPD” and “T Cells”, “COPD” and “CD4+ T cells”, “COPD” and “CD8+ T cells”, “COPD” and “CD28+ T cells”, “COPD” and “B cells” e “COPD” and “NK cells”. O tipo de artigos foi “Journal Type”, a categoria do jornal foi “MEDLINE” e o campo de pesquisa “Title & Abstract” com acesso disponível, cujo contexto era diretamente relacionado com o tema deste trabalho. Ainda foram usados alguns artigos fora do período de tempo referido, por serem relevantes. Após concluída a pesquisa sobre as populações linfocitárias isoladas de amostras de sangue periférico de doentes com DPOC, foram publicados aproximadamente 35 artigos. Foram selecionados 12 artigos na elaboração desta revisão (Tabela 4). Os restantes artigos foram descartados por não possuírem informação relevante para esta revisão ou por apresentarem resultados semelhantes aos artigos selecionados.

Capítulo 4

Resultados

4.1 Pesquisa Bibliográfica

Todos os resultados da pesquisa bibliográfica estão sumariados na Tabela 4.

4.1.1 Linfócitos T CD4+ e CD8+

Foram analisados 5 artigos recentes para a recolha de informação sobre as populações de linfócitos T CD4+ e CD8+ em indivíduos com DPOC (91,95). No estudo de Gupta *et al* (91) mostrou-se que doentes com DPOC apresentam uma diminuição, estatisticamente significativa, no número de linfócitos T CD4+ no sangue periférico, quando comparados com os controlos. Contudo, relativamente aos linfócitos T CD8+ apesar de se verificar um ligeiro decréscimo em número, este não foi estatisticamente significativo quando comparado com os controlos. É de notar, que no grupo dos doentes se verificou uma grande variabilidade no número de linfócitos T CD8+ presentes no sangue periférico, sendo que no grupo de controlo os resultados foram muito mais homogéneos.

Sabe-se que um desequilíbrio entre linfócitos T CD8+ citotóxicos e linfócitos T CD4+ auxiliares pode contribuir para o processo inflamatório anormal das vias respiratórias em doentes com DPOC (83). Anomalias na função dos linfócitos T podem provocar infeções crónicas levando à inflamação, o que pode resultar na libertação local de enzimas proteolíticas. Caso o hospedeiro não seja capaz de neutralizar estas proteases, podem surgir complicações graves e progressão de doenças respiratórias. O estudo de Gupta *et al* descreve alterações no equilíbrio de populações linfocitárias no sangue periférico de doentes com DPOC, alterações que poderão contribuir para o desenvolvimento da DPOC (91). Parte destes resultados são suportados ainda por outros estudos, como em Tang *et al* (92), onde os resultados mostraram que o sangue periférico de doentes com DPOC apresentava um número de linfócitos T CD4+ significativamente menor, quando comparado com o de pessoas saudáveis não fumadoras. Porém, os linfócitos T CD8+ não revelaram qualquer diferença entre os grupos em estudo.

Outro estudo interessante é o de Di Stefano *et al* (93) onde observaram a quantidade de linfócitos T CD4+ e linfócitos T CD8+ na mucosa bronquial de doentes com DPOC severa e moderada. Verificou-se que comparado aos grupos de DPOC moderada e fumadores saudáveis, o número de linfócitos T CD8+ era significativamente menor no grupo de DPOC severa

(durante o mês de estudo nenhum sujeito recebeu glicocorticosteroides ou antibióticos). O facto de os doentes com dificuldades respiratórias, apresentarem um número reduzido de linfócitos T CD8+ na mucosa bronquial poderá justificar em parte, uma maior incidência de infeções e o aumento de exacerbações no grupo de doentes com DPOC severa. Assim, mudanças no número de células presentes na mucosa bronquial podem estar relacionadas com o estado da doença.

Para finalizar Paats *et al* (94) analisaram a relação entre as populações linfocitárias T CD4+ e CD8+ em doentes com DPOC, e as inflamações sistémicas na doença da DPOC. No estudo de Paats *et al* não foram detetadas diferenças significativas nos linfócitos T CD8+ ou CD4+ no sangue periférico de doentes com DPOC e os controlos. Porém, verificaram que proporções de linfócitos T CD8+ que expressam IFN- γ (CD8+IFN- γ +) e linfócitos T CD8+ que expressam TNF- α (CD8+TNF- α +) estavam significativamente aumentadas no sangue periférico de doentes com DPOC quando comparados com os controlos. Por outro lado, os linfócitos T CD4+ que expressam IFN- γ (CD4+IFN- γ +) e os linfócitos T CD4+ que expressam TNF- α (CD4+TNF- α +) não estavam aumentados. Verificaram, ainda, que ambos os linfócitos T CD8+TNF- α + e CD8+IFN- γ + se encontram, significativamente, em menor proporção no sangue periférico de doentes no estado GOLD IV do que em doentes no estado II. Isto não quer dizer que doentes com baixo número de linfócitos T CD8+IFN- γ + e CD8+TNF- α + possuam maior suscetibilidade para progredir para o estado GOLD IV, apenas mostram a importância de analisar compartimentos periféricos no contexto da heterogeneidade da DPOC, uma vez que estes resultados suportam a possibilidade da inflamação sistémica estar presente em doentes com DPOC. O TNF- α é uma citocina inflamatória que aumenta a quimiotaxia e a migração de neutrófilos induzindo a expressão da quimiocina IL-8, que é essencial para o recrutamento de neutrófilos. O TNF- α pode ter um papel importante na compreensão da inflamação sistémica da DPOC. O estudo de Hodge *et al* (95) é consistente com o de Paats *et al* (94) no sentido em que comparados com controlos saudáveis, os linfócitos T CD8+IFN- γ + e CD8+TNF- α + estão aumentados no sangue periférico de doentes com DPOC. Assim a marcação (targeting) sistémica terapêutica de TNF- α e IFN- γ produzidos por linfócitos T CD8+ pode, talvez, melhorar a morbidade em doentes com DPOC, sendo necessário realizar testes para confirmar esta conclusão. Estes resultados ainda suportam a hipótese de existirem inflamações sistémicas em doentes com DPOC. Neste mesmo estudo de Hodge *et al*, contrariamente ao estudo de Gupta *et al* (91), verificou-se um aumento significativo no número de linfócitos T CD8+ presentes no sangue periférico de doentes com DPOC quando comparado com o dos controlos.

4.1.2 Linfócitos T CD4+CD28- e CD8+CD28-

Tanto os linfócitos T CD4+CD28- como os linfócitos T CD8+CD28- têm sido relacionados com a patogénese de várias doenças autoimunes (96, 97). Um estudo recente de Hoetzenecker *et al* (98) mostrou que o sangue periférico de doentes com DPOC apresenta

números aumentados de linfócitos T CD4+CD28- comparativamente aos controlos. Contudo, as contagens de linfócitos T CD4+CD28- eram significativamente mais elevadas no tecido do pulmão do que na circulação de doentes com DPOC. Em indivíduos saudáveis estas eram residuais, tanto no sangue periférico como nos pulmões. Esta observação leva a crer que os linfócitos T CD4+CD28-, presentes nos pulmões, podem estar diretamente envolvidos na patogénese da DPOC (98). Os linfócitos T CD4+CD28- libertam grandes quantidades de IFN- γ , um potente estimulador de macrófagos, que conduz à secreção de metaloproteinases da matriz extracelular e à destruição dos tecidos (99, 100). Além disso, os linfócitos T CD4+CD28- contêm perforinas e granzima B intracelular, fornecendo-lhes a capacidade de lisar células alvo (101). Assim, linfócitos T CD4+CD28- podem contribuir diretamente para a perda de parênquima pulmonar através de mecanismos de indução de apoptose no epitélio respiratório (102). O aumento de linfócitos T CD4+CD28- pode ser atribuído parcialmente a um aumento de Bcl-2, que torna os linfócitos T CD4+CD28- resistentes à apoptose (103). O estudo de Lambers *et al* (104) é consistente com o de Hoetzenecker *et al*. No estudo de Lambers *et al* observou-se que comparativamente aos controlos saudáveis, o sangue periférico de doentes com DPOC apresentava níveis aumentados de linfócitos T CD4+CD28-. Adicionalmente, também se verificou que doentes no estado GOLD III-IV apresentam maiores níveis de linfócitos T CD4+CD28- no sangue periférico do que pessoas saudáveis fumadoras ou não fumadoras. Doentes no estado GOLD I-II apresentaram, significativamente, maiores níveis de linfócitos T CD4+CD28- do que os controlos saudáveis fumadores.

Lambers *et al* compararam os linfócitos T CD4+CD28- com os linfócitos T CD4+CD28+, verificando que os primeiros possuem maior prevalência de perforina e granzima B intracelular e ainda descobriram que os linfócitos T CD4+CD28- expressam recetores de linfócitos NK como CD94 e CD158 podendo partilhar várias características com as células NK. Isto pode tornar possível a combinação de propriedades funcionais do sistema imunológico inato e adaptativo em doentes com DPOC.

Num outro estudo de Hodge *et al* (105) os autores mostraram que linfócitos T CD8+CD28- estão aumentados significativamente no sangue periférico, tanto em doentes fumadores com DPOC, como em ex-fumadores com DPOC comparativamente com os controlos, não existindo uma diferença significativa entre os controlos e os fumadores saudáveis, apesar de se observar um ligeiro aumento nos fumadores saudáveis. Entre os doentes com DPOC também não foram encontradas diferenças significativas. Em relação aos linfócitos CD4+CD28- não houve mudanças significativas entre os grupos. Os linfócitos T CD8+CD28-, tais como os linfócitos T CD4+CD28-, estão funcionalmente ativos e produzem grandes níveis da citocina pró-inflamatória IFN- γ e mediadores citotóxicos granzima B e perforina, que segundo Hodge *et al*, podem desempenhar um papel nas respostas inflamatórias ou na componente autoimune desta doença. Além disso, Hodge *et al* também mostraram que os linfócitos T CD8+CD28- expressam significativamente mais IFN- γ , granzima

e perforina que os linfócitos T CD8+CD28+. Fenómeno que pode ser explicado pelo aumento da expressão de moléculas coestimuladoras alternativas como OX40, CTL4 e 4-1BB, que estimulam mais eficientemente os linfócitos T CD8+CD28- do que os linfócitos T CD8+CD28+ (105).

4.1.3 Linfócitos NK (CD3-CD56+) e linfócitos NKT (CD3+CD56+)

Recentemente os linfócitos NK e NKT têm ganho uma maior atenção pelos investigadores. Eles fazem parte da primeira linha de defesa contra infeções no sistema imunológico inato, tendo a habilidade para destruir diretamente células alvo e para interagir com as células apresentadoras de antígenos, tão bem como os linfócitos T (92). Quando ativados, os linfócitos NK destroem diretamente as células alvo através da libertação de grânulos citolíticos, que formam poros na membrana das células, o que contribui para combater agentes patogénicos intracelulares (106). Os linfócitos NKT constituem uma população linfocitária menor e exibem característica de linfócitos T e linfócitos NK podendo modular a resposta inata e adaptativa de outros linfócitos; linfócitos T, B, NK e células dendríticas. Depois de estimulados produzem rapidamente grandes quantidades de citocinas para combater agentes patogénicos intracelulares (107).

No estudo de Urbanowicz *et al* (108) mostraram uma diminuição significativa de linfócitos CD3-CD56+ no sangue periférico de doentes com DPOC quando comparados a pessoas saudáveis, o mesmo também se verificou quando comparados com pessoas saudáveis fumadoras. No estudo de Urbanowicz *et al* ainda se verificou que a atividade citotóxica de ambos os linfócitos NK e NKT estava significativamente diminuída em doentes com DPOC quando comparados com fumadores e pessoas saudáveis. Além disso, quando comparados com pessoas saudáveis, os linfócitos NK e NKT do grupo dos fumadores apresentavam-se significativamente menos citotóxicos. Uma das explicações para o facto desses linfócitos NK e NKT estarem reduzidos no sangue periférico de doentes com DPOC pode ser o recrutamento destes linfócitos para o pulmão.

Contrariamente ao estudo de Urbanowicz *et al* (108), um estudo recente de Tang *et al* (92) mostrou que o sangue periférico de doentes com DPOC apresenta, significativamente, níveis aumentados de linfócitos CD3-CD56+ e linfócitos CD3+CD56+ comparativamente com pessoas não fumadoras saudáveis. Neste estudo, também se verificou que a frequência de secreção de IFN- γ pelos linfócitos NK e NKT era significativamente menor em doentes com DPOC, comparativamente com pessoas saudáveis não fumadoras. Estes dados indicam que os linfócitos NK e NKT estão debilitados o que pode explicar a maior propensão a infeções pelos doentes com DPOC. Adicionalmente, partindo do princípio que as funções dos linfócitos NK e NKT estão debilitadas devido a recetores de ativação e inibição, também se estudou a expressão dos recetores inibitórios CD158a e CD158b (109). O CD158b é um recetor KIR específico para o antígeno HLA-C (110) sendo capaz de recrutar e ativar fosfatases SHP-1 e SHP-2 para a transdução de sinais inibitórios (111, 112). O CD158a é parecido estrutural e

funcionalmente. Assim sendo, em doentes com DPOC, quando comparados com controlos saudáveis não fumadores, foi verificada a existência de uma maior expressão dos recetores CD158a e CD158b em linfócitos NK. Nos linfócitos NKT foi apenas observada uma maior expressão do recetor inibitório CD158b. Estes resultados suportam a hipótese de que os linfócitos NK e NKT estão comprometidos devido ao aumento dos recetores inibitórios CD158a e CD158b. O que levou à conclusão de que linfócitos NK e NKT que expressam recetores inibitórios podem participar na patogénese da DPOC.

Num outro estudo, Wang *et al* (113) verificaram que os linfócitos CD3-CD56+ estão mais ativados no sangue periférico (por medição realizada através da expressão de CD69 e CD25) em ex-fumadores com DPOC, em fumadores com DPOC e em fumadores saudáveis, mas não em não fumadores saudáveis. Relativamente aos linfócitos CD3+CD56+, estes encontravam-se mais ativados no sangue periférico de fumadores saudáveis e em fumadores com DPOC, do que quando comparados com pessoas saudáveis não fumadoras. Além disso, também se verificou que existe uma correlação positiva significativa entre o número de cigarros que são fumados por dia e o nível de ativação dos linfócitos NK. No sangue periférico, os fumadores com ou sem DPOC apresentam uma maior proporção de linfócitos NK ativados comparativamente com os não fumadores e ex-fumadores com DPOC. Estes dados, indicam que, os níveis de ativação celular no sangue periférico estão mais relacionadas com o hábito de fumar do que com a doença. Assim sendo, os resultados indicam que fumar afeta a ativação celular sistémica dos linfócitos NK e NKT. Estes linfócitos NK desempenham papéis chave nas respostas inflamatórias e na ativação destas, o que pode levar à produção de citocinas e quimiocinas inflamatórias, tais como TNF- α e IL-8, que podem induzir características patológicas na DPOC e danos nos tecidos do pulmão (114).

Wang *et al* avaliaram ainda a expressão do CD158e1 em fumadores com ou sem DPOC e em não fumadores saudáveis, como um possível mecanismo para as diferenças de ativação no sangue periférico. Os níveis de expressão do recetor inibidor CD158e1, quando comparados com não fumadores saudáveis, eram menores no sangue periférico de fumadores com ou sem DPOC. Isto sugere que a baixa expressão de recetores inibidores KIR pode estar associada com a ativação dos linfócitos NK e NKT. Apesar disso, além de recetores inibidores, essas células possuem também recetores ativadores (115). Posto isto, também foi comparada a expressão do recetor de ativação NKG2D no sangue periférico de todos os grupos, porém não foram encontradas alterações significativas (altamente expresso em todos os grupos).

No entanto, no mesmo estudo, Wang *et al* mostraram que a proporção de linfócitos NK e NKT ativadas na expetoração induzida de fumadores e ex-fumadores com DPOC é significativamente maior do que em pessoas não fumadoras e fumadoras saudáveis. Assim, foi proposto que estas células ativadas na DPOC podem migrar do sangue periférico para o pulmão. Tendo em conta o observado acima, foi concluído que a ativação de linfócitos NK

dentro das vias respiratórias dos doentes com DPOC pode desempenhar um papel na patogénese da DPOC (113).

4.1.4 Linfócitos B (CD19+)

Os linfócitos B também têm sido amplamente estudados, uma vez que são encontrados nos pulmões de doentes com DPOC, sugerindo que existam respostas imunes humorais aos antigénios pulmonares (116). Apesar de Tang *et al* (92) não terem detetado diferenças significativas nos linfócitos B presentes no sangue periférico de doentes com DPOC e em pessoas saudáveis, Brandsma *et al* (117) verificaram que doentes com DPOC possuem uma menor percentagem de linfócitos B no sangue periférico, quando comparados com pessoas saudáveis. Este facto pode dever-se ao aumento do recrutamento de linfócitos B do sangue periférico para o pulmão, justificado, talvez, pela presença aumentada de antigénios neste tecido. Esta possível presença aumentada de linfócitos B já foi observada experimentalmente, em tecidos de pulmão de doentes com DPOC (118). Além disso, analisando os grupos com base no seu estado atual em relação ao tabagismo, verificou-se que ex-fumadores com DPOC apresentam menores percentagens de linfócitos B no sangue periférico do que os fumadores saudáveis, ex-fumadores e não fumadores. Interessantemente, os ex-fumadores com DPOC apresentaram uma tendência de diminuição na percentagem de linfócitos B quando comparados com os doentes fumadores com DPOC, embora ainda sem significância.

Neste mesmo estudo, de Brandsma *et al* (117) verificou-se que existe uma maior quantidade de linfócitos B de memória em fumadores (com DPOC ou saudáveis) do que em ex-fumadores ou pessoas que nunca fumaram. A influência da quantidade de linfócitos B de memória na patogénese da DPOC é discutível, sendo que esta resposta imunológica específica está, de certa forma, presente em todos os fumadores com histórico considerável de consumo e não é o único fator que leva a patogénese da DPOC. Contudo, acredita-se que a maior quantidade de linfócitos B verificada em fumadores, pode estar envolvida na resposta inflamatória crónica da DPOC. Então, uma das possíveis formas para começar a combater esta doença será parar de fumar.

Por último, também foi detetado um aumento significativo de linfócitos B de memória que apresentam comutação de classe (de isotipo) no sangue periférico de fumadores saudáveis quando comparados com ex-fumadores e pessoas que nunca fumaram (117). Estes linfócitos B são linfócitos maduros que trocam o seu recetor de membrana primário (IgM) por IgG, IgA ou IgE em resposta ao reconhecimento contínuo de antigénios. Esta alteração, sugere uma resposta imunológica crónica específica ao antigénio causada, particularmente, pelo fumo de tabaco. Recentemente, Brandsma *et al* (119) conseguiram distinguir o aumento dos níveis destes linfócitos B no sangue periférico em doentes com DPOC fumadores e em pessoas saudáveis fumadoras. Nos fumadores saudáveis, os linfócitos B trocam para isotipo IgA (típico de respostas imunológicas na mucosa). Contudo quando está presente a DPOC, os linfócitos

trocam maioritariamente para o isotipo IgG. Esta alteração, pode refletir uma resposta autoimune específica contra neoantígenos induzidos pelo tabaco, ou uma resposta imunológica específica contra agentes patogénicos microbianos (120).

Todos os resultados atrás mencionados indicaram que existem alterações nas funções imunológicas de doentes com DPOC, o que pode explicar a tendência destes doentes serem mais suscetíveis as infeções do que pessoas saudáveis, e estão sumariados na Tabela 4.

Tabela 4 - Resultados da pesquisa bibliográfica.

Autores	Ano	Resultados	Referências
Di Stefano <i>et al</i>	2001	↓ Linfócitos T CD8+* (DPOC severa / DPOC moderada e fumadores saudáveis)	(93)
Hodge <i>et al</i>	2007	↑ Linfócitos T CD8+IFN-γ+ e Linfócitos T CD8+TNF-α+ ↑ Linfócitos T CD8+ (DPOC / Controlos)	(95)
Gupta <i>et al</i>	2007	↓ Linfócitos T CD4+ Linfócitos T CD8+ (SSE) (DPOC / Controlos) ↑ Linfócitos T CD4+CD28- (DPOC / Controlos)	(91)
Lambers <i>et al</i>	2009	↑ Linfócitos T CD4+CD28- (DPOC GOLD III-IV / PSF e PSNF) ↑ Linfócitos T CD4+CD28- (DPOC GOLD I-II / PSF)	(104)
Brandsma <i>et al</i>	2009	↓ Linfócitos B (DPOC / Controlos) ↓ Linfócitos B (EF DPOC / PSF, EF, PSNF e F DPOC) ↑ Linfócitos B de memória (F DPOC e PFS / EF PSNF) ↓ Linfócitos CD3-CD56+ (DPOC / PSNF)	(117)
Urbanowicz <i>et al</i>	2009	↓ Linfócitos CD3+CD56+ (DPOC / PSNF e PSF)	(108)
Hodge <i>et al</i>	2011	Linfócitos T CD4+CD28- (SSE) ↑ Linfócitos T CD8+CD28- (DPOC / Controlos)	(105)
Brandsma <i>et al</i>	2012	↑ Linfócitos B com comutação de isotipos (PFS / EF e PSNF)	(119)
Paats <i>et al</i>	2012	Linfócitos T CD4+ e Linfócitos T CD8+ (SSE) ↑ Linfócitos T CD8+IFN-γ+ e Linfócitos T CD8+TNF-α+ Linfócitos T CD4+IFN-γ+ e Linfócitos T CD4+TNF-α+ (SSE) (DPOC / Controlos) ↓ Linfócitos T CD8+IFN-γ+ e Linfócitos T CD8+TNF-α+ (DPOC GOLD IV / DPOC GOLD II)	(94)
Tang <i>et al</i>	2013	↓ Linfócitos T CD4+ Linfócitos T CD8+ e Linfócitos B (SSE) ↑ Linfócitos CD3-CD56+ e Linfócitos CD3+CD56+ ↓ Linfócitos T CD3+ Linfócitos B (SSE) (DPOC/PSNF)	(92)
Wang <i>et al</i>	2013	↑ Linfócitos CD3-CD56+ ativados (EF DPOC, F DPOC e PSF / PSNF) ↑ Linfócitos CD3+CD56+ ativados (F DPOC e PFS / PSNF)	(113)
Hoetzenecker <i>et al</i>	2013	↑Linfócitos CD4+CD28- (DPOC / Controlos) ↑Linfócitos CD4+CD28- (Tecido de pulmão / Circulação)	(98)

Comparação de populações linfocitárias no sangue periférico de diferentes grupos. SSE= Sem significância estatística; /= Comparativamente; ↑= Aumento; ↓= Diminuição. PSF= Pessoas saudáveis fumadoras; PSNF= Pessoas saudáveis não fumadoras; F =fumadores; EF= Ex-fumadores. *Dados relativos à mucosa bronquial de doentes com DPOC.

4.2 Caracterização clínica dos doentes estudados com DPOC

Na Tabela 5 podem ver-se os diferentes dados dos doentes com DPOC. Nela podemos verificar que os doentes estudados são todos do sexo masculino e quatro continuam a fumar. Dois dos doentes com DPOC tiveram três exacerbações nos últimos 12 meses pelo que necessitaram tomar antibióticos para infeções respiratórias. Adicionalmente, todos os doentes estavam medicados com broncodilatadores e anti-inflamatórios inalados. Três doentes encontram-se no estadio GOLD II, um no estadio Gold III e quatro no estadio GOLD IV.

Tabela 5 - Registo de dados dos doentes com DPOC voluntários para o estudo.

Doentes	1	2	3	4*	5	6**	7*	8***
Género	M	M	M	M	M	M	M	M
Idade (anos)	67	57	78	78	61	68	63	63
Hábitos Tabágicos	F	EF	EF	EF	F	F	EF	F
Unidades Maço-Ano	30	64	84	0,8	38	45	36	50
Nº de episódios de exacerbações nos últimos 12 meses	3	3	0	0	0	0	0	0
Antibióticos para IR	S	S	N	N	N	N	N	N
Internamento hospitalar por IR (nº episódios)	0	0	0	0	0	0	0	0
Broncodilatadores	S	S	S	S	S	S	S	S
Anti-inflamatórios (CI)	S	S	S	S	S	S	S	S
Gravidade de dispneia (mMRC)	1	4	4	0	1	1	2	3
Gravidade dispneia (CAT)	10	27	23	13	17	20	14	22
FEV1 (% valor predicto)	47,7	19	28,30	60,8	73,6	70,4	22,1	29,6
Estadio GOLD	3	4	4	2	2	2	4	4

M= masculino; S= sim; N= não; F= fumador; EF= Ex-fumador; IR= Infeção respiratória; CI= Corticosteroides inalados; S= sim. *Doente com hipertensão arterial. **Doente com diabetes mellitus tipo 2 e hipertensão arterial. ***Doente teve acidente vascular cerebral. Dados cedidos pelo Centro Hospitalar Cova da Beira

Na Tabela 6 encontram-se os dados do hemograma dos doentes com DPOC e alguns resultados por análise de citometria de fluxo (linfócitos, monócitos e granulócitos). Todos os indivíduos, à exceção dos doentes 4 e 6, tinham a população de linfócitos diminuída quando comparada com os valores de referência (dados do hemograma). A percentagem de linfócitos e de monócitos quantificada por citometria de fluxo estava estatisticamente diminuída quando comparada com os valores do hemograma ($p=0.002$ e $p=0.018$, respetivamente). Por outro lado, verificou-se que a percentagem dos granulócitos estava aumentada nos dados

obtidos por citometria, apesar de este aumento não ter atingido significância estatística ($p=0.060$).

Tabela 6 - Hemograma dos doentes voluntários com DPOC estudados.

Doentes	1	2	3	4	5	6	7	8	Média±SEM	Valores de Referência
Leucócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	6,1	7,8	8,1	7,8	7,4	7,8	6,4	8,8	7,5±0,3	4,0 - 10,0
Linfócitos (%)	23,1	20,1	17,6	25,3	17,0	25,6	19,9	19,5	21,0±1,2*	25,0 - 40,0%
Dados CF (%)	19,5	8,2	15,2	19,6	8,0	19,6	16,7	16,4	15,4±1,7	
Monócitos (%)	10,3	5,4	5,7	8,3	9,2	6,8	11,6	10,3	8,5±0,8*	2,0 - 8,0%
Dados CF (%)	8,5	2,1	6,8	7,1	4,3	6,5	7,0	5,2	6,0±0,7	
Granulócitos (%)	66,6	74,5	76,7	66,4	73,8	67,1	68,5	70,2	70,5±1,4	55,0 - 80,0%
Dados CF (%)	72,0	89,7	77,9	73,2	87,7	73,9	71,6	63,0	76,1±3,1	
Plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	159	202	238	194	191	214	130	239	191,5±11,8	140 - 440
Eritrócitos ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	6,99	5,14	5,40	-	4,51	5,09	4,08	5,22	5,2±0,3	4,31 - 6,40
Hemoglobina (g/dL)	16,0	16,0	17,4	13,1	16,6	16,3	13,9	16,2	15,69±0,5	13,6 - 18,0
Hematócrito (%)	48,7	47,8	52,1	40,2	48,6	49,2	41,1	50,8	47,31±1,5	39,8 - 52,0
VCM (fL)	69,7	93,1	96,4	94,4	107,8	96,7	100,7	97,2	94,5±3,9	80,0 - 97,0
HCM (pg)	22,8	31,1	32,1	29,5	41,1	32,1	34,0	31,0	31,7±1,8	26,0 - 34,0
CHCM (g/dL)	32,8	33,4	33,3	32,6	50,8	33,2	33,8	31,8	35,2±2,2	32,0 - 36,0

VCM= Volume Corpuscular Médio; HCM= Hemoglobina Corpuscular Média; CHCM= Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média; CF= Citometria de fluxo. Dados cedidos pelo Centro Hospitalar Cova da Beira. *Significância estatística para valores de $p<0,05$.

4.3 Análise de populações linfocitárias em doentes com DPOC

A população de interesse, linfocitária (R1), bem como a população de monócitos (R2) e de granulócitos (R3) podem ser identificadas claramente num gráfico de pontos FSC *versus* SSC. O FSC dá informação sobre o tamanho / forma celular, enquanto o SSC permite obter informação sobre a granulosidade / complexidade celular. O estudo combinado destas características permite a identificação de diferentes populações de leucócitos (121).

Desenharam-se regiões, para os controlos e doentes, que continham os linfócitos, monócitos e granulócitos, como se pode ver na Figura 3. Posteriormente selecionou-se a região 1 (R1), que corresponde à população linfocitária, para se poder analisar e quantificar os linfócitos T, NK e B para os controlos e doentes.

Além dos detetores de dispersão da luz (FSC e SSC), o citómetro de fluxo possui filtros dicroicos, que funcionam como espelhos que refletem um determinado comprimento de onda da fluorescência emitida pelo fluorocromo, e detetores de fluorescência ou PMT (do inglês *Photo Multiplier Tubes*), com diferentes intensidades de fluorescência (FL), que captam a emissão de fluorescência refletida. Isto permite que as diferentes cores de diferentes fluorocromos (como por exemplo PE, FITC, APC) sejam separadas por filtros óticos e enviados para os detetores PMT, que convertem a fluorescência num sinal eletrónico que será digitalizado para gerar parâmetros de FL. O citómetro usado (FACSCalibur) está equipado com um laser de 15mW e outro de 9 mW de potência que emitem luz a dois comprimentos de ondas; 488 e 635 nm, respetivamente, o que permitiu analisar quatro parâmetros de fluorescência diferentes em simultâneo (FL1, FL2, FL3 e FL4) (121).

Dependendo dos anticorpos usados para a identificação de cada linfócito, foram utilizados diferentes detetores. Assim, para analisar o controlo negativo, os linfócitos CD3+CD56-, CD3-CD56+ e ainda os linfócitos CD19+ foram usados gráficos de pontos FL1-FL2. Para analisar os linfócitos T CD3+CD8+, CD8+CD28+, CD8+CD28-, CD4+CD28+ e CD4+CD28 usaram-se gráficos de pontos FL2-FL3. Gráficos de pontos FL2-FL4 foram usados para a análise de linfócitos T CD3+CD4+ como se poder ver na Figura 4.

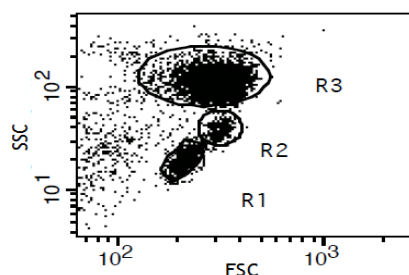


Figura 3 - Exemplo de um caso de aquisição de um gráfico de pontos em dispersão frontal (FSC) - lateral (SSC) de luz por citometria de fluxo. R1 - Representa a população de linfócitos. R2 - Representa a população de monócitos. R3 - representa a população de granulócitos. FSC - Dispersão frontal (do inglês *Forward Scatter*). SSC - Dispersão lateral (do inglês *Side Scatter*).

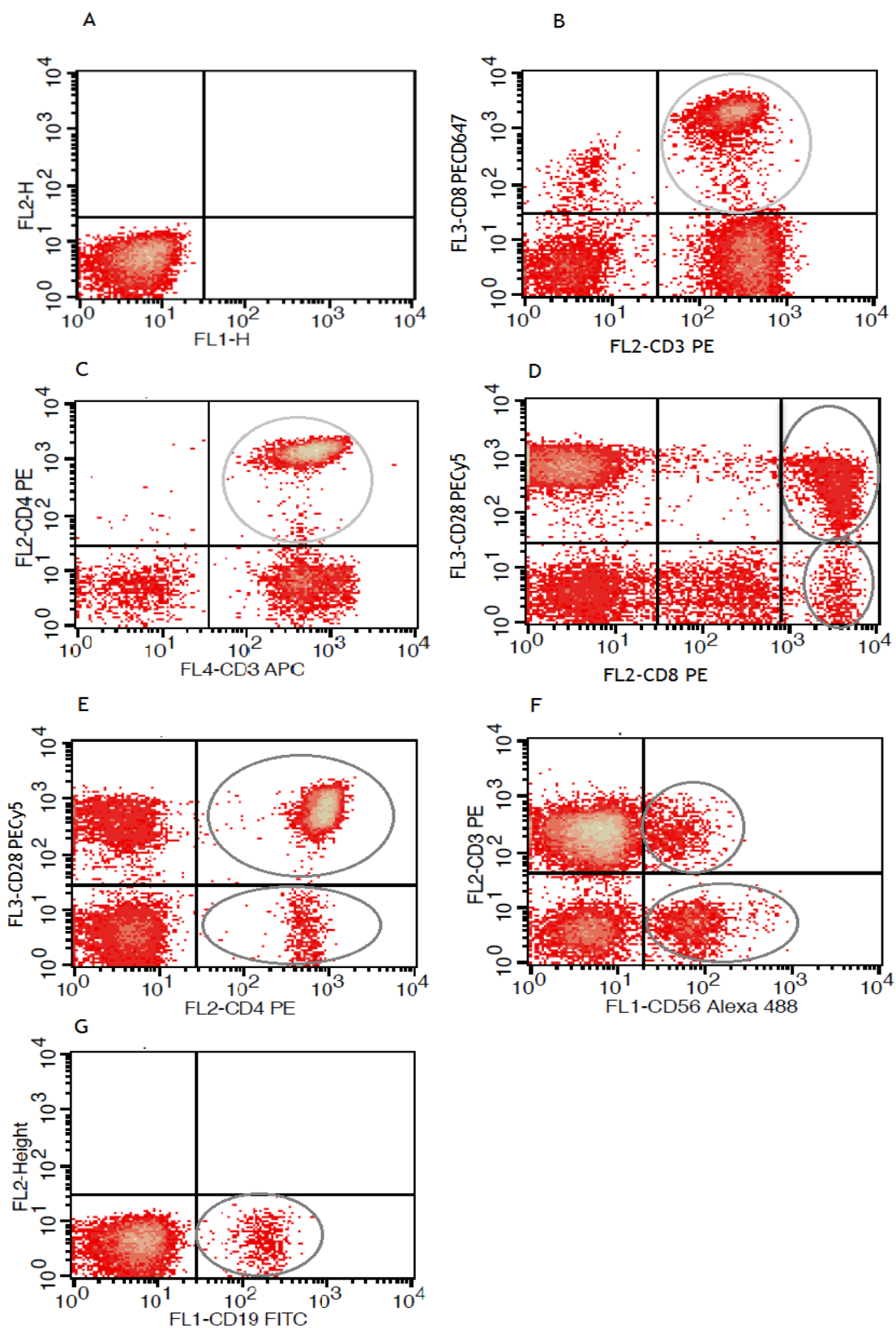


Figura 4 - Exemplos de aquisição de diferentes populações linfocitárias por citometria de fluxo. (A) - Negativo. (B) - Linfócitos T CD8⁺ (CD3⁺CD8⁺). (C) - Linfócitos T CD4⁺ (CD3⁺CD4⁺). (D) - Linfócitos T CD8^{high}CD28⁺ e CD8^{high}CD28⁻. (E) - Linfócitos T CD4⁺CD28⁺ e CD4⁺CD28⁻. (F) - Linfócitos NK (CD3⁻CD56⁺) e linfócitos NKT (CD3⁺CD56⁺). G - Linfócitos B (CD19⁺). Os círculos representam as zonas analisadas.

Tabela 7 - Média dos níveis das populações estudadas, classificadas por grupos.

Populações	Controlos (n=8)	Doentes (n=8)	Significância estatística
Granulócitos (%)	58,30 ± 3,23 (n=7)	76,14 ± 3,11	p=0,002
Monócitos (%)	10,54 ± 1,62 (n=7)	6,41 ± 0,71	p=0,030
Linfócitos (%)	31,26 ± 2,37 (n=7)	15,40 ± 1,69	p<0,001
CD3+CD8+ (%)	25,10 ± 1,70	24,60 ± 3,75	SSE
CD3+CD8high (%)	19,97 ± 1,58	23,32 ± 2,87	SSE
CD3+CD4+ (%)	48,63 ± 2,03	55,88 ± 7,20	SSE
CD8highCD28+ (%)	14,05 ± 1,56	13,14 ± 1,52	SSE
CD28+/CD8high (% relativa)	70,15 ± 5,48	56,84 ± 2,31	p=0,042
CD8highCD28- (%)	5,92 ± 1,10	10,18 ± 1,65	p=0,049
CD28-/CD8high (% relativa)	29,86 ± 5,48	43,16 ± 2,31	p=0,042
CD4+CD28+ (%)	51,72 ± 2,96	51,06 ± 5,47	SSE
CD28+/CD4+ (% relativa)	93,40 ± 1,70	95,23 ± 1,32	SSE
CD4+CD28- (%)	3,71 ± 1,05	2,80 ± 0,89	SSE
CD28-/CD4+ (% relativa)	6,60 ± 1,70	4,77 ± 1,32	SSE
CD3+CD56+ (%)	3,52 ± 0,50	4,83 ± 1,13	SSE
CD3-CD56+ (%)	7,39 ± 1,38	11,92 ± 1,97	SSE (p=0,081)
CD19+ (%)	10,10 ± 1,44	3,83 ± 0,54	p=0,001
CD3+ (%)	75,56 ± 2,20	76,08 ± 2,81	SSE
Negativo (%)	99,95 ± 0,03	99,82 ± 0,16	SSE

Dados expressos como média±SEM. SSE= Sem significância estatística.

A Tabela 7 mostra um resumo das médias das diferentes populações leucocitárias quantificadas.

No sangue periférico de doentes com DPOC o número de granulócitos está significativamente aumentado (p=0,002) comparativamente aos controlos. Pelo contrário, o número de monócitos e linfócitos encontra-se diminuído. Relativamente às populações de linfócitos T (CD3+), linfócitos T CD8+ (CD3+CD8+), linfócitos T CD8high (CD3+CD8high) e linfócitos T CD4+ (CD3+CD4+), ao comparar o sangue periférico de doentes com o grupo de controlo, não se observaram quaisquer diferenças estatisticamente significativas (p=0,888; p=0,905; p=0,324; p=0,349 respetivamente).

No que respeita às subpopulações de linfócitos T CD8highCD28- e linfócitos T CD4highCD28- foram observadas diferenças estatisticamente significativas apenas na subpopulação de linfócitos T CD8highCD28-. Assim, o sangue periférico de doentes com DPOC possuía um aumento na percentagem de linfócitos CD8highCD28- quando comparado aos controlos ($p=0,049$) (Figura 5B). Nas subpopulações de linfócitos T CD8highCD28+ (Figura 5A) e linfócitos T CD4+CD28+ não houve qualquer diferença significativa entre os doentes com DPOC e os controlos ($p=0,684$; $p=0,917$, respetivamente). O mesmo se verificou ao analisar a frequência relativa de linfócitos CD28+ e linfócitos CD28- nos linfócitos T CD4+ ($p=0,409$; $p=0,409$, respetivamente). Porém, ao analisar a frequência relativa dos linfócitos CD28+ e linfócitos CD28- nos linfócitos T CD8high, verificou-se uma diminuição significativa e um aumento significativo, respetivamente, nos doentes com DPOC ($p=0,042$; $p=0,042$, respetivamente) (Figura 5C e 5D).

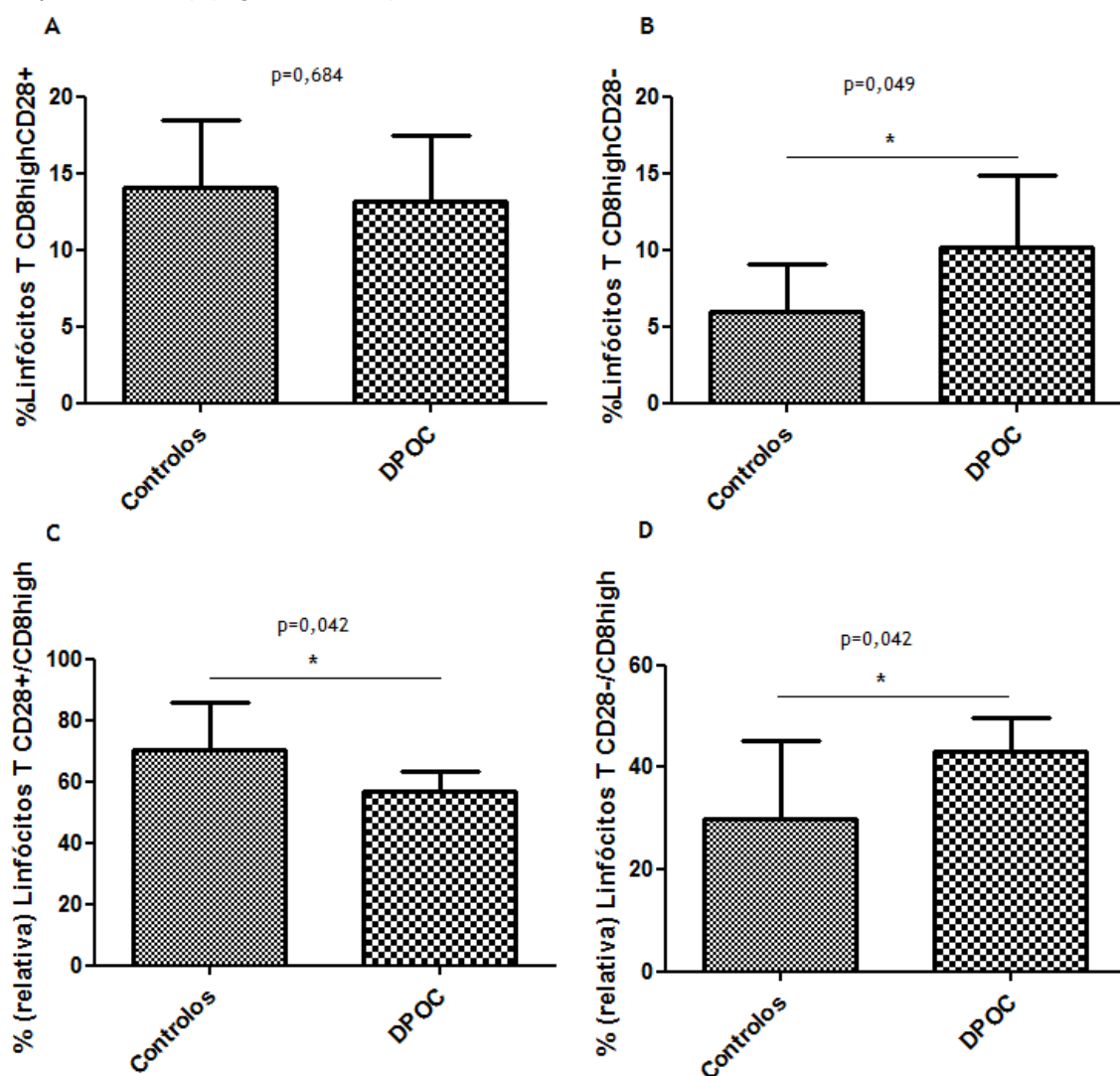


Figura 5 - Gráficos de barras de percentagem de linfócitos para cada grupo de indivíduos. (A) - Gráfico de linfócitos T CD8highCD28+; $p=0,684$. (B) - Gráfico de linfócitos T CD8highCD28-; $p=0,049$. (C) - Gráfico de linfócitos T CD28+/CD8high (%relativa); $p=0,042$. (D) - Gráfico de linfócito T CD28-/CD8high (%relativa); $p=0,042$. *Significância estatística pra valores de $p<0,05$.

Ainda, no sangue periférico de doentes com DPOC não houve qualquer diferença estatisticamente significativa no número de linfócitos NKT (CD3+CD56+) comparativamente com os controlos ($p=0,308$). Relativamente aos linfócitos NK (CD3-CD56+), verificou-se que apresentavam um ligeiro aumento nos doentes com DPOC. Porém, este aumento não atingiu significância estatística ($p=0,08$) (Figura 6).

Por fim os linfócitos B (CD19+) mostraram-se significativamente diminuídos ($p= 0,001$) no grupo de doentes com DPOC comparativamente aos controlos (Figura 6B).

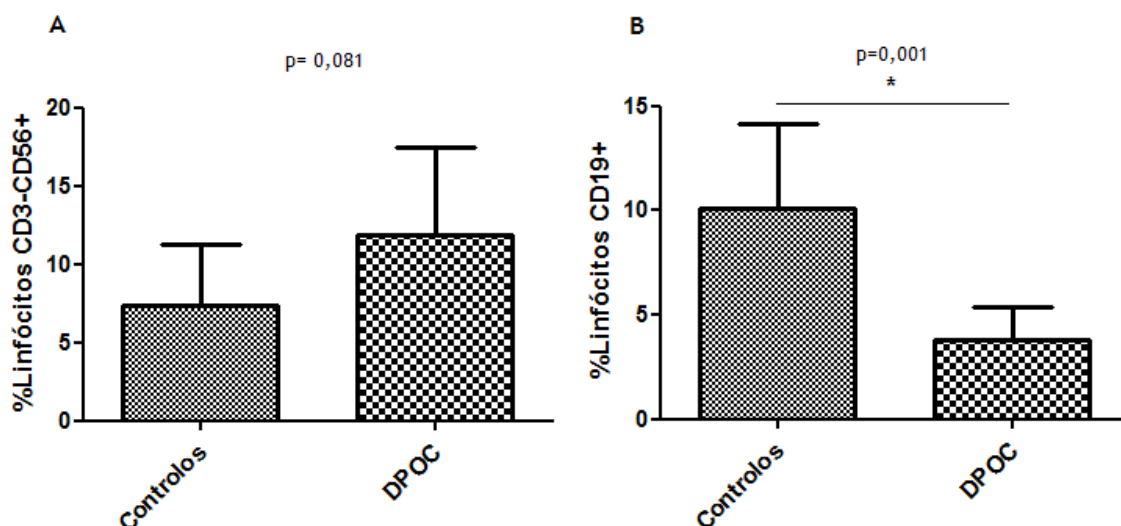


Figura 6 - Gráficos de barras de percentagem de linfócitos CD3-CD56+ e linfócitos CD19+. (A) - Ligeiro aumento de linfócitos CD3-CD56+ no sangue periférico de doentes com DPOC. (B) - Aumento significativo de linfócitos CD19+ no sangue periférico de doentes com DPOC. *Significância estatística para valores de $p<0,05$.

Para as populações onde se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre os doentes com DPOC e controlos foi feita uma análise adicional para determinar se haveria diferenças relacionadas com o grau de severidade da doença. Assim, dividiram-se os doentes com DPOC em dois grupos: DPOC moderada (GOLD II) e DPOC severa/muito severa (GOLD III-IV). Contudo não se obtiveram quaisquer diferenças significativas para estas populações (linfócitos B e linfócitos CD8highCD28-) entre estes grupos (Figura 7).

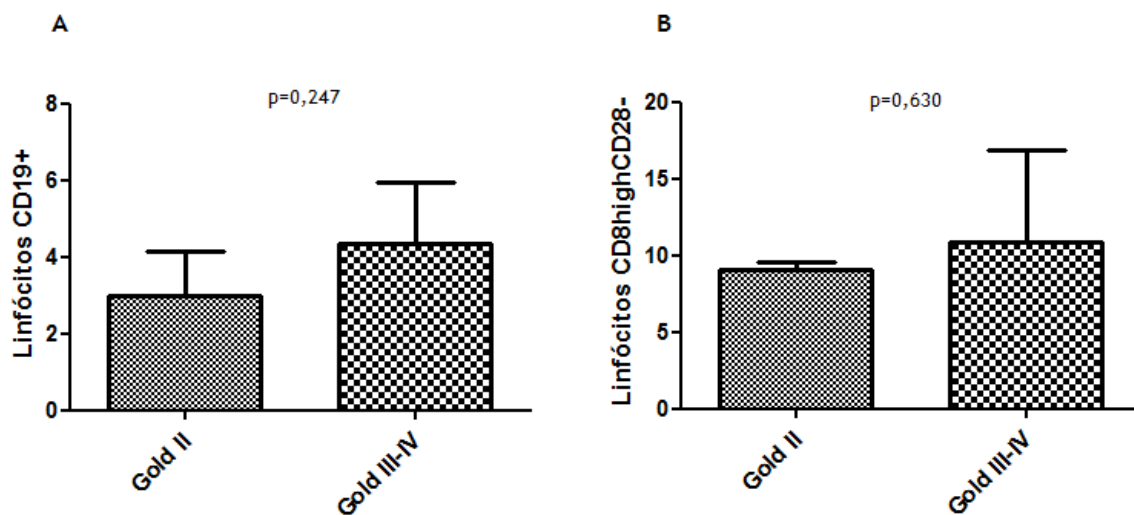


Figura 7 - Gráficos de barras de percentagem de linfócitos em doentes com DPOC agrupados de acordo com a severidade da doença. (A) - Gráfico de linfócitos CD19+; p= 0,247. (B) - Gráfico de linfócitos T CD8highCD28-; p= 0,630.

Capítulo 5

Discussão e Conclusão

Este trabalho teve por objetivo principal quantificar, por citometria de fluxo, as populações linfocitárias isoladas de amostras de sangue periférico de doentes com DPOC e comparar com amostras de sangue periférico de pessoas saudáveis.

Em relação ao grupo de oito doentes com DPOC estudado, três encontravam-se no estadio GOLD II e cinco no estadio GOLD III-IV.

Pode-se constatar que a percentagem de linfócitos e de monócitos obtida por citometria de fluxo foi estatisticamente inferior à percentagem obtida no hemograma. Esta baixa parece ser compensada pela população de granulócitos que estava, embora sem significância estatística, ligeiramente aumentada na citometria de fluxo. Assim, conclui-se que o tipo de técnica utilizada pode influenciar os resultados das diferentes populações de leucócitos.

No grupo de controlo não se teve acesso a dados clínicos. Porém sabe-se que foram estudadas oito pessoas saudáveis com uma média de idade de 35 anos.

Os níveis de granulócitos estão significativamente aumentados no sangue periférico de doentes com DPOC comparativamente com os controlos. Nos adultos, os neutrófilos são os granulócitos mais frequentes e em maior número (122), quando presentes na circulação sanguínea, são células que têm uma semi-vida de 6-8 horas (123). Assim, o facto da análise efetuada nas amostras de controlos ter sido realizada com buffy coats vindos do Instituto Portugues de Sangue e da Transplantação em Coimbra pode justificar a diminuição no número de granulócitos no grupo de controlo. Por se tratar de amostras que foram analisadas 2 dias depois da colheita, poderá ter favorecido a morte preferencial de granulócitos. Esta diminuição de granulócitos poderá justificar o facto da proporção relativa de linfócitos e de monócitos se encontrar aumentada nos controlos, e consequentemente o aumento significativo em relação ao sangue periférico de doentes com DPOC. De referir que as amostras de sangue total dos doentes com DPOC foram cedidas pelo Centro Hospitalar da Cova da Beira tendo-se imediatamente procedido à quantificação das populações linfocitárias.

As populações de linfócitos T CD8+ dos grupos em estudo não mostraram diferenças estatisticamente significativas, o que está de acordo com os estudos de Gupta *et al* (91), Tang *et al* (92) e Paats *et al* (94). Curiosamente, o mesmo se verificou para os linfócitos T CD4+, contrariamente ao observado por Gupta *et al* (91) e Tang *et al* (92), onde os níveis de

linfócitos T CD4+ se encontravam diminuídos em doentes com DPOC, quando comparados com os controlos. Nos linfócitos T também não se verificou qualquer diferença entre os dois grupos de estudo, ao contrário do estudo de Tang *et al* onde estes níveis, comparativamente aos controlos, se revelaram menores no sangue periférico de doentes com DPOC (92).

De acordo com o estudo de Hodge *et al* (105), também se verificou que o sangue periférico de doentes com DPOC possui níveis de linfócitos T CD8+CD28- significativamente aumentados, quando comparados com os controlos. Na revisão de Arosa (124) sugeriu-se que os linfócitos T CD8+CD28- podem desempenhar um papel regulador protetor quando os tecidos são danificados por etanol ou ferro. Contudo, em Hodge *et al* (105) mostrou-se que os linfócitos T CD8+CD28-, em doentes com DPOC, estão funcionalmente ativos e produzem grandes níveis de IFN- γ e mediadores citotóxicos de granzima B e perforina, sugerindo que podem provocar danos nos pulmões e aumentar os problemas da DPOC. Tendo em conta que estes níveis estão aumentados em doentes com DPOC, é de acreditar que estas células estão envolvidas nas respostas inflamatórias da DPOC, sendo fundamental a realização de mais estudos para se perceber o seu verdadeiro papel na DPOC (105). Ao comparar a frequência relativa, verificou-se uma diminuição na proporção da subpopulação de linfócitos CD28+ dentro da população de linfócitos T CD8high no sangue periférico de doentes com DPOC, quando comparados com os controlos. Por sua vez a percentagem relativa de linfócitos CD28- nos linfócitos T CD8high está aumentada em doentes com DPOC. Na revisão de Arosa (124) refere-se que os linfócitos T CD8+CD28- se dividem mais rapidamente e vivem mais tempo que os linfócitos T CD8+CD28+, devido, provavelmente, a um ciclo de divisão celular mais curto, alta resistência à apoptose e uma diferente resposta a citocinas regulatórias, o que pode justificar estes resultados.

Nos resultados relativos aos linfócitos T CD4+CD28-, não houve qualquer significância estatística o que está de acordo com Hodge *et al* (105). Porém no estudo de Hoetzenecker *et al* (98) e Lambers *et al* (104) são apresentados resultados com estes linfócitos aumentados no sangue periférico de doentes com DPOC quando comparados aos controlos. Sendo assim, é necessário a realização de mais estudos para se poder chegar a uma melhor conclusão. Uma das razões subjacentes a esta discordância nos resultados pode ser relativa ao uso de anticorpos diferentes no presente trabalho. No estudo de Hoetzenecker *et al* (98) foi utilizado um anticorpo anti-CD4 conjugado-FITC combinado com anti-CD28 conjugado-ECD e no estudo de Lambers *et al* (104) usaram, também, anticorpo anti-CD4 conjugado-FITC mas, combinado com o anti-CD28 conjugado PE/Cy5. Os linfócitos T CD4+CD28+ não apresentaram nenhuma diferença significativa. Além disso, também se estudou a frequência relativa percentual em função da população de linfócitos T CD4+, mas neste caso não se obtiveram quaisquer diferenças significativas.

Quanto aos linfócitos NK e NKT não houve resultados com diferença significativa, ao contrário do estudo de Tang *et al* (92), onde mostraram níveis aumentados destes linfócitos

em doentes com DPOC. Contudo, neste estudo observa-se uma tendência de aumento de linfócitos NK no sangue periférico de doentes com DPOC.

Em relação aos linfócitos B, este estudo mostra níveis diminuídos no sangue periférico de doentes com DPOC quando comparados com os controlos. Porém em Tang *et al* (92) não houve qualquer diferença significativa. Neste estudo foi utilizado um anticorpo monoclonal anti-CD19 conjugado-PE, enquanto que no nosso estudo se usou um anticorpo anti-humano CD19 conjugado-FITC, podendo ser essa a explicação pela qual não obtiveram diferenças nos níveis de linfócitos B. Por outro lado no estudo de Brandsma *et al* (117), também foi observada uma diminuição nos níveis de linfócitos B em doentes com DPOC.

Para os resultados que apresentaram diferenças estatísticas dividiram-se os doentes com DPOC em dois grupos: GOLD II e GOLD III-IV. Contudo não se obtiveram quaisquer diferenças significativas, possivelmente devido ao pequeno número de amostra em estudo.

De referir que este estudo teve algumas limitações, nomeadamente, o número reduzido de amostras utilizadas e também uma informação clínica insuficiente sobre os indivíduos saudáveis do grupo de controlo.

Concluindo e considerando apenas os resultados com significância estatística, os resultados sugerem que os níveis de linfócitos T CD8highCD28- estão aumentados no sangue periférico de doentes com DPOC quando comparados com pessoas saudáveis, e que por outro lado os linfócitos B estão diminuídos. Estes resultados encontram-se em acordo com estudos previamente realizados (105, 117). Uma vez que os linfócitos T CD8highCD28- estão funcionalmente ativos em doentes com DPOC, estes podem desempenhar um papel nas respostas inflamatórias desta doença através da produção da citocina proinflamatória IFN- γ e de mediadores citotóxicos.

Os linfócitos B ativados reconhecem os antigénios e desenvolvem-se em plasmócitos que secretam imunoglobulinas, e em células de memória (125). Embora seja apenas uma especulação, a diminuição de linfócitos B no sangue periférico dos doentes com DPOC pode ser explicada pelo recrutamento dos linfócitos B para o pulmão, talvez relacionado com o aumento de antigénios no pulmão de doentes com DPOC (118).

5.1 Perspetivas futuras

Propõe-se que no futuro a amostra de doentes com DPOC seja aumentada, para se poderem retirar conclusões mais objetivas em relação aos resultados que foram contra os estudos previamente realizados. Com um número maior de doentes estudados seria também possível uma melhor comparação das populações linfocitárias entre doentes com DPOC com estadios GOLD diferentes. Para uma melhor análise dos resultados era ainda importante ter acesso a mais dados informativos dos voluntários saudáveis.

Seria também interessante pesquisar se o uso de anticorpos diferentes utilizados para marcação pode ter influência na divergência de resultados observados nos estudos existentes.

No que diz respeito aos linfócitos B, uma futura identificação de neoantígenos ou antígenos bacterianos/virais, envolvidos na patogénese da DPOC, que têm especificidade para os linfócitos B era importante para uma melhor compreensão do papel destas células na DPOC.

Capítulo 6

Referências

1. Orozco-Levi M, Garcia-Aymerich J, Villar J, Ramirez-Sarmiento A, Anto JM, Gea J. Wood smoke exposure and risk of chronic obstructive pulmonary disease. *The European respiratory journal*. 2006;27(3):542-6.
2. Vestbo J, Hurd SS, Agusti AG, Jones PW, Vogelmeier C, Anzueto A, et al. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2013;187(4):347-65.
3. Cavailles A, Brinchault-Rabin G, Dixmier A, Goupil F, Gut-Gobert C, Marchand-Adam S, et al. Comorbidities of COPD. *European respiratory review : an official journal of the European Respiratory Society*. 2013;22(130):454-75.
4. Brusselle GG, Joos GF, Bracke KR. New insights into the immunology of chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet*. 2011;378(9795):1015-26.
5. Decramer M, Janssens W, Miravittles M. Chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet*. 2012;379(9823):1341-51.
6. Rabe KF, Hurd S, Anzueto A, Barnes PJ, Buist SA, Calverley P, et al. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2007;176(6):532-55.
7. Corhay JL, Vincken W, Schlessers M, Bossuyt P, Imschoot J. Chronic bronchitis in COPD patients is associated with increased risk of exacerbations: a cross-sectional multicentre study. *International journal of clinical practice*. 2013;67(12):1294-301.
8. de Oca MM, Halbert RJ, Lopez MV, Perez-Padilla R, Talamo C, Moreno D, et al. The chronic bronchitis phenotype in subjects with and without COPD: the PLATINO study. *The European respiratory journal*. 2012;40(1):28-36.
9. Kanner RE, Anthonisen NR, Connett JE, Lung Health Study Research G. Lower respiratory illnesses promote FEV(1) decline in current smokers but not ex-smokers with mild chronic obstructive pulmonary disease: results from the lung health study. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2001;164(3):358-64.

10. Ekberg-Aronsson M, Pehrsson K, Nilsson JA, Nilsson PM, Lofdahl CG. Mortality in GOLD stages of COPD and its dependence on symptoms of chronic bronchitis. *Respiratory research*. 2005;6:98.
11. Rodriguez E, Ferrer J, Zock JP, Serra I, Anto JM, de Batlle J, et al. Lifetime Occupational Exposure to Dusts, Gases and Fumes Is Associated with Bronchitis Symptoms and Higher Diffusion Capacity in COPD Patients. *PloS one*. 2014;9(2):e88426.
12. Ghorbani A, Feizpour A, Hashemzahi M, Gholami L, Hosseini M, Soukhtanloo M, et al. The effect of adipose derived stromal cells on oxidative stress level, lung emphysema and white blood cells of guinea pigs model of chronic obstructive pulmonary disease. *Daru : journal of Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences*. 2014;22(1):26.
13. Jeffery PK. Structural and inflammatory changes in COPD: a comparison with asthma. *Thorax*. 1998;53(2):129-36.
14. Agusti A. Systemic effects of chronic obstructive pulmonary disease: what we know and what we don't know (but should). *Proceedings of the American Thoracic Society*. 2007;4(7):522-5.
15. Briggs DD, Jr. Chronic obstructive pulmonary disease overview: prevalence, pathogenesis, and treatment. *Journal of managed care pharmacy : JMCP*. 2004;10(4 Suppl):S3-10.
16. 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 the global burden of chronic obstructive pulmonary disease. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2010;182(5):693-718.
17. Celli BR, Halbert RJ, Nordyke RJ, Schau B. Airway obstruction in never smokers: results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *The American journal of medicine*. 2005;118(12):1364-72.
18. Pena VS, Miravitlles M, Gabriel R, Jimenez-Ruiz CA, Villasante C, Masa JF, et al. Geographic variations in prevalence and underdiagnosis of COPD: results of the IBERPOC multicentre epidemiological study. *Chest*. 2000;118(4):981-9.
19. Jensen HH, Godtfredsen NS, Lange P, Vestbo J. Potential misclassification of causes of death from COPD. *The European respiratory journal*. 2006;28(4):781-5.
20. Bateman ED, Hurd SS, Barnes PJ, Bousquet J, Drazen JM, FitzGerald M, et al. Global strategy for asthma management and prevention: GINA executive summary. *The European respiratory journal*. 2008;31(1):143-78.
21. Tinkelman DG, Price DB, Nordyke RJ, Halbert RJ, Isonaka S, Nonikov D, et al. Symptom-based questionnaire for differentiating COPD and asthma. *Respiration; international review of thoracic diseases*. 2006;73(3):296-305.

22. Mathur SK. Allergy and asthma in the elderly. *Seminars in respiratory and critical care medicine*. 2010;31(5):587-95.
23. Grumelli S, Corry DB, Song LZ, Song L, Green L, Huh J, et al. An immune basis for lung parenchymal destruction in chronic obstructive pulmonary disease and emphysema. *PLoS medicine*. 2004;1(1):e8.
24. Fabbri LM, Romagnoli M, Corbetta L, Casoni G, Busljetic K, Turato G, et al. Differences in airway inflammation in patients with fixed airflow obstruction due to asthma or chronic obstructive pulmonary disease. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2003;167(3):418-24.
25. Pauwels RA, Buist AS, Calverley PM, Jenkins CR, Hurd SS, Committee GS. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. NHLBI/WHO Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) Workshop summary. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2001;163(5):1256-76.
26. Takahashi T, Kobayashi S, Fujino N, Suzuki T, Ota C, Tando Y, et al. Annual FEV1 changes and numbers of circulating endothelial microparticles in patients with COPD: a prospective study. *BMJ open*. 2014;4(3):e004571.
27. Hurst JR, Vestbo J, Anzueto A, Locantore N, Mullerova H, Tal-Singer R, et al. Susceptibility to exacerbation in chronic obstructive pulmonary disease. *The New England journal of medicine*. 2010;363(12):1128-38.
28. Agustí AG, Noguera A, Saucedo J, Sala E, Pons J, Busquets X. Systemic effects of chronic obstructive pulmonary disease. *The European respiratory journal*. 2003;21(2):347-60.
29. Sala E, Roca J, Marrades RM, Alonso J, Gonzalez De Suso JM, Moreno A, et al. Effects of endurance training on skeletal muscle bioenergetics in chronic obstructive pulmonary disease. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1999;159(6):1726-34.
30. Gosker HR, Wouters EF, van der Vusse GJ, Schols AM. Skeletal muscle dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease and chronic heart failure: underlying mechanisms and therapy perspectives. *The American journal of clinical nutrition*. 2000;71(5):1033-47.
31. Griffiths TL, Burr ML, Campbell IA, Lewis-Jenkins V, Mullins J, Shiels K, et al. Results at 1 year of outpatient multidisciplinary pulmonary rehabilitation: a randomised controlled trial. *Lancet*. 2000;355(9201):362-8.
32. Lacasse Y, Martin S, Lasserson TJ, Goldstein RS. Meta-analysis of respiratory rehabilitation in chronic obstructive pulmonary disease. *A Cochrane systematic review*. *Europa medicophysica*. 2007;43(4):475-85.
33. Schols AMWJ, Slangen J, Volovics L, Wouters EFM. Weight loss is a reversible factor in the prognosis of chronic obstructive pulmonary disease. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1998;157(6):1791-7.

34. Wouters EF. Nutrition and metabolism in COPD. *Chest*. 2000;117(5 Suppl 1):2745-80S.
35. Farmer RP, Herbert B, Cuellar DO, Hao J, Stahel PF, Yasui R, et al. Osteoporosis and the orthopaedic surgeon: basic concepts for successful co-management of patients' bone health. *International orthopaedics*. 2014.
36. Goldstein MF, Fallon JJ, Jr., Harning R. Chronic glucocorticoid therapy-induced osteoporosis in patients with obstructive lung disease. *Chest*. 1999;116(6):1733-49.
37. Hugli O, Schutz Y, Fitting JW. The daily energy expenditure in stable chronic obstructive pulmonary disease. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1996;153(1):294-300.
38. Aalbers R, Ayres J, Backer V, Decramer M, Lier PA, Magyar P, et al. Formoterol in patients with chronic obstructive pulmonary disease: a randomized, controlled, 3-month trial. *The European respiratory journal*. 2002;19(5):936-43.
39. Tashkin DP, Fabbri LM. Long-acting beta-agonists in the management of chronic obstructive pulmonary disease: current and future agents. *Respiratory research*. 2010;11:149.
40. Roux E, Molimard M, Savineau JP, Marthan R. Muscarinic stimulation of airway smooth muscle cells. *General pharmacology*. 1998;31(3):349-56.
41. In chronic obstructive pulmonary disease, a combination of ipratropium and albuterol is more effective than either agent alone. An 85-day multicenter trial. COMBIVENT Inhalation Aerosol Study Group. *Chest*. 1994;105(5):1411-9.
42. van Noord JA, de Munck DR, Bantje TA, Hop WC, Akveld ML, Bommer AM. Long-term treatment of chronic obstructive pulmonary disease with salmeterol and the additive effect of ipratropium. *The European respiratory journal*. 2000;15(5):878-85.
43. Davies L, Angus RM, Calverley PM. Oral corticosteroids in patients admitted to hospital with exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease: a prospective randomised controlled trial. *Lancet*. 1999;354(9177):456-60.
44. Calverley P, Pauwels R, Vestbo J, Jones P, Pride N, Gulsvik A, et al. Combined salmeterol and fluticasone in the treatment of chronic obstructive pulmonary disease: a randomised controlled trial. *Lancet*. 2003;361(9356):449-56.
45. Singh S, Amin AV, Loke YK. Long-term use of inhaled corticosteroids and the risk of pneumonia in chronic obstructive pulmonary disease: a meta-analysis. *Archives of internal medicine*. 2009;169(3):219-29.
46. Stockley RA, O'Brien C, Pye A, Hill SL. Relationship of sputum color to nature and outpatient management of acute exacerbations of COPD. *Chest*. 2000;117(6):1638-45.
47. Bestall JC, Paul EA, Garrod R, Garnham R, Jones PW, Wedzicha JA. Usefulness of the Medical Research Council (MRC) dyspnoea scale as a measure of disability in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax*. 1999;54(7):581-6.

48. Magda S. Susceptibility to exacerbation in chronic obstructive pulmonary disease - Data from the ECLIPSE study. *Maedica*. 2010;5(3):223-4.
49. Vijayan VK. Chronic obstructive pulmonary disease. *The Indian journal of medical research*. 2013;137(2):251-69.
50. Barr RG, Bourbeau J, Camargo CA, Ram FS. Inhaled tiotropium for stable chronic obstructive pulmonary disease. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2005(2):CD002876.
51. ZuWallack RL, Mahler DA, Reilly D, Church N, Emmett A, Rickard K, et al. Salmeterol plus theophylline combination therapy in the treatment of COPD. *Chest*. 2001;119(6):1661-70.
52. Pisano M, Mazzola N. Aclidinium bromide inhalation powder (tudorza): a long-acting anticholinergic for the management of chronic obstructive pulmonary disease. *P & T : a peer-reviewed journal for formulary management*. 2013;38(7):393-6.
53. Di Marco F, Verga M, Santus P, Morelli N, Cazzola M, Centanni S. Effect of formoterol, tiotropium, and their combination in patients with acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease: a pilot study. *Respiratory medicine*. 2006;100(11):1925-32.
54. Wedzicha JA, Calverley PM, Seemungal TA, Hagan G, Ansari Z, Stockley RA, et al. The prevention of chronic obstructive pulmonary disease exacerbations by salmeterol/fluticasone propionate or tiotropium bromide. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2008;177(1):19-26.
55. Calverley PM, Boonsawat W, Cseke Z, Zhong N, Peterson S, Olsson H. Maintenance therapy with budesonide and formoterol in chronic obstructive pulmonary disease. *The European respiratory journal*. 2003;22(6):912-9.
56. Calverley PM, Rabe KF, Goehring UM, Kristiansen S, Fabbri LM, Martinez FJ, et al. Roflumilast in symptomatic chronic obstructive pulmonary disease: two randomised clinical trials. *Lancet*. 2009;374(9691):685-94.
57. Welte T, Miravittles M, Hernandez P, Eriksson G, Peterson S, Polanowski T, et al. Efficacy and tolerability of budesonide/formoterol added to tiotropium in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2009;180(8):741-50.
58. Zheng JP, Kang J, Huang SG, Chen P, Yao WZ, Yang L, et al. Effect of carbocysteine on acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease (PEACE Study): a randomised placebo-controlled study. *Lancet*. 2008;371(9629):2013-8.
59. Rovina N, Koutsoukou A, Koulouris NG. Inflammation and immune response in COPD: where do we stand? *Mediators of inflammation*. 2013;2013:413735.
60. Barton GM. A calculated response: control of inflammation by the innate immune system. *The Journal of clinical investigation*. 2008;118(2):413-20.

61. Davodeau F, Peyrat MA, Gaschet J, Hallet MM, Triebel F, Vie H, et al. Surface expression of functional T cell receptor chains formed by interlocus recombination on human T lymphocytes. *The Journal of experimental medicine*. 1994;180(5):1685-91.
62. Hassett DJ, Borchers MT, Panos RJ. Chronic obstructive pulmonary disease (COPD): evaluation from clinical, immunological and bacterial pathogenesis perspectives. *Journal of microbiology*. 2014;52(3):211-26.
63. Shaykhiev R, Crystal RG. Innate immunity and chronic obstructive pulmonary disease: a mini-review. *Gerontology*. 2013;59(6):481-9.
64. Shaykhiev R, Otaki F, Bonsu P, Dang DT, Teater M, Strulovici-Barel Y, et al. Cigarette smoking reprograms apical junctional complex molecular architecture in the human airway epithelium in vivo. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2011;68(5):877-92.
65. Manzel LJ, Shi L, O'Shaughnessy PT, Thorne PS, Look DC. Inhibition by cigarette smoke of nuclear factor-kappaB-dependent response to bacteria in the airway. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2011;44(2):155-65.
66. Shaykhiev R, Krause A, Salit J, Strulovici-Barel Y, Harvey BG, O'Connor TP, et al. Smoking-dependent reprogramming of alveolar macrophage polarization: implication for pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Journal of immunology*. 2009;183(4):2867-83.
67. Suzuki M, Betsuyaku T, Ito Y, Nagai K, Nasuhara Y, Kaga K, et al. Down-regulated NF-E2-related factor 2 in pulmonary macrophages of aged smokers and patients with chronic obstructive pulmonary disease. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2008;39(6):673-82.
68. Van Pottelberge GR, Bracke KR, Demedts IK, De Rijck K, Reinartz SM, van Drunen CM, et al. Selective accumulation of langerhans-type dendritic cells in small airways of patients with COPD. *Respiratory research*. 2010;11:35.
69. Robbins CS, Dawe DE, Goncharova SI, Pouladi MA, Drannik AG, Swirski FK, et al. Cigarette smoke decreases pulmonary dendritic cells and impacts antiviral immune responsiveness. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2004;30(2):202-11.
70. Blidberg K, Palmberg L, Dahlen B, Lantz AS, Larsson K. Increased neutrophil migration in smokers with or without chronic obstructive pulmonary disease. *Respirology*. 2012;17(5):854-60.
71. Hoenderdos K, Condliffe A. The neutrophil in chronic obstructive pulmonary disease. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2013;48(5):531-9.

72. Mian MF, Lauzon NM, Stampfli MR, Mossman KL, Ashkar AA. Impairment of human NK cell cytotoxic activity and cytokine release by cigarette smoke. *Journal of leukocyte biology*. 2008;83(3):774-84.
73. Prieto A, Reyes E, Bernstein ED, Martinez B, Monserrat J, Izquierdo JL, et al. Defective natural killer and phagocytic activities in chronic obstructive pulmonary disease are restored by glycoposphopeptical (inmunoferon). *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2001;163(7):1578-83.
74. Sethi S, Murphy TF. Infection in the pathogenesis and course of chronic obstructive pulmonary disease. *The New England journal of medicine*. 2008;359(22):2355-65.
75. Weldon S, McNally P, McElvaney NG, Elborn JS, McAuley DF, Wartelle J, et al. Decreased levels of secretory leucoprotease inhibitor in the Pseudomonas-infected cystic fibrosis lung are due to neutrophil elastase degradation. *Journal of immunology*. 2009;183(12):8148-56.
76. Mallia P, Footitt J, Sotero R, Jepson A, Contoli M, Trujillo-Torralbo MB, et al. Rhinovirus infection induces degradation of antimicrobial peptides and secondary bacterial infection in chronic obstructive pulmonary disease. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2012;186(11):1117-24.
77. Heijink IH, Brandenburg SM, Postma DS, van Oosterhout AJ. Cigarette smoke impairs airway epithelial barrier function and cell-cell contact recovery. *The European respiratory journal*. 2012;39(2):419-28.
78. Monaco C, Andreakos E, Kiriakidis S, Feldmann M, Paleolog E. T-cell-mediated signalling in immune, inflammatory and angiogenic processes: the cascade of events leading to inflammatory diseases. *Current drug targets Inflammation and allergy*. 2004;3(1):35-42.
79. Gadgil A, Duncan SR. Role of T-lymphocytes and pro-inflammatory mediators in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *International journal of chronic obstructive pulmonary disease*. 2008;3(4):531-41.
80. Hogg JC, Chu F, Utokaparch S, Woods R, Elliott WM, Buzatu L, et al. The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *The New England journal of medicine*. 2004;350(26):2645-53.
81. Majo J, Ghezzi H, Cosio MG. Lymphocyte population and apoptosis in the lungs of smokers and their relation to emphysema. *The European respiratory journal*. 2001;17(5):946-53.
82. Maeno T, Houghton AM, Quintero PA, Grumelli S, Owen CA, Shapiro SD. CD8+ T Cells are required for inflammation and destruction in cigarette smoke-induced emphysema in mice. *Journal of immunology*. 2007;178(12):8090-6.

83. Saetta M, Di Stefano A, Turato G, Facchini FM, Corbino L, Mapp CE, et al. CD8+ T-lymphocytes in peripheral airways of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1998;157(3 Pt 1):822-6.
84. Proklou A, Soultzis N, Neofytou E, Rovina N, Zervas E, Gaga M, et al. Granule cytotoxic activity and oxidative DNA damage in smoking and nonsmoking patients with asthma. *Chest*. 2013;144(4):1230-7.
85. Di Stefano A, Caramori G, Gnemmi I, Contoli M, Vicari C, Capelli A, et al. T helper type 17-related cytokine expression is increased in the bronchial mucosa of stable chronic obstructive pulmonary disease patients. *Clinical and experimental immunology*. 2009;157(2):316-24.
86. Urbanowicz RA, Lamb JR, Todd I, Corne JM, Fairclough LC. Enhanced effector function of cytotoxic cells in the induced sputum of COPD patients. *Respiratory research*. 2010;11:76.
87. Miossec P, Korn T, Kuchroo VK. Interleukin-17 and type 17 helper T cells. *The New England journal of medicine*. 2009;361(9):888-98.
88. Guglani L, Khader SA. Th17 cytokines in mucosal immunity and inflammation. *Current opinion in HIV and AIDS*. 2010;5(2):120-7.
89. Greene CM, Low TB, O'Neill SJ, McElvaney NG. Anti-proline-glycine-proline or antielastin autoantibodies are not evident in chronic inflammatory lung disease. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2010;181(1):31-5.
90. Lee SH, Goswami S, Grudo A, Song LZ, Bandi V, Goodnight-White S, et al. Antielastin autoimmunity in tobacco smoking-induced emphysema. *Nature medicine*. 2007;13(5):567-9.
91. Gupta J, Chattopadhyaya D, Bhadoria DP, Qadar Pasha MA, Gupta VK, Kumar M, et al. T lymphocyte subset profile and serum alpha-1-antitrypsin in pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Clinical and experimental immunology*. 2007;149(3):463-9.
92. Tang Y, Li X, Wang M, Zou Q, Zhao S, Sun B, et al. Increased numbers of NK cells, NKT-like cells, and NK inhibitory receptors in peripheral blood of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Clinical & developmental immunology*. 2013;2013:721782.
93. Di Stefano A, Capelli A, Lusuardi M, Caramori G, Balbo P, Ioli F, et al. Decreased T lymphocyte infiltration in bronchial biopsies of subjects with severe chronic obstructive pulmonary disease. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 2001;31(6):893-902.
94. Paats MS, Bergen IM, Hoogsteden HC, van der Eerden MM, Hendriks RW. Systemic CD4+ and CD8+ T-cell cytokine profiles correlate with GOLD stage in stable COPD. *The European respiratory journal*. 2012;40(2):330-7.

95. Hodge G, Nairn J, Holmes M, Reynolds PN, Hodge S. Increased intracellular T helper 1 proinflammatory cytokine production in peripheral blood, bronchoalveolar lavage and intraepithelial T cells of COPD subjects. *Clinical and experimental immunology*. 2007;150(1):22-9.
96. Heron M, Claessen AM, Grutters JC, van den Bosch JM. T-cell activation profiles in different granulomatous interstitial lung diseases--a role for CD8+CD28(null) cells? *Clinical and experimental immunology*. 2010;160(2):256-65.
97. Thewissen M, Somers V, Venken K, Linsen L, van Paassen P, Geusens P, et al. Analyses of immunosenescent markers in patients with autoimmune disease. *Clinical immunology*. 2007;123(2):209-18.
98. Hoetzenecker K, Mitterbauer A, Guenova E, Schweiger T, Altmann P, Zimmermann M, et al. High levels of lung resident CD4+CD28null cells in COPD: implications of autoimmunity. *Wiener klinische Wochenschrift*. 2013;125(5-6):150-5.
99. Park W, Weyand CM, Schmidt D, Goronzy JJ. Co-stimulatory pathways controlling activation and peripheral tolerance of human CD4+CD28- T cells. *European journal of immunology*. 1997;27(5):1082-90.
100. Antoniou KM, Ferdoutsis E, Bouros D. Interferons and their application in the diseases of the lung. *Chest*. 2003;123(1):209-16.
101. Griffiths GM, Alpert S, Lambert E, McGuire J, Weissman IL. Perforin and granzyme A expression identifying cytolytic lymphocytes in rheumatoid arthritis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1992;89(2):549-53.
102. Nakajima T, Schulte S, Warrington KJ, Kopecky SL, Frye RL, Goronzy JJ, et al. T-cell-mediated lysis of endothelial cells in acute coronary syndromes. *Circulation*. 2002;105(5):570-5.
103. Schirmer M, Vallejo AN, Weyand CM, Goronzy JJ. Resistance to apoptosis and elevated expression of Bcl-2 in clonally expanded CD4+CD28- T cells from rheumatoid arthritis patients. *Journal of immunology*. 1998;161(2):1018-25.
104. Lambers C, Hacker S, Posch M, Hoetzenecker K, Pollreis A, Lichtenauer M, et al. T cell senescence and contraction of T cell repertoire diversity in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Clinical and experimental immunology*. 2009;155(3):466-75.
105. Hodge G, Mukaro V, Reynolds PN, Hodge S. Role of increased CD8/CD28(null) T cells and alternative co-stimulatory molecules in chronic obstructive pulmonary disease. *Clinical and experimental immunology*. 2011;166(1):94-102.
106. Orange JS. Formation and function of the lytic NK-cell immunological synapse. *Nature reviews Immunology*. 2008;8(9):713-25.

107. Mallevaey T, Clarke AJ, Scott-Browne JP, Young MH, Roisman LC, Pellicci DG, et al. A molecular basis for NKT cell recognition of CD1d-self-antigen. *Immunity*. 2011;34(3):315-26.
108. Urbanowicz RA, Lamb JR, Todd I, Corne JM, Fairclough LC. Altered effector function of peripheral cytotoxic cells in COPD. *Respiratory research*. 2009;10:53.
109. Vivier E, Raulet DH, Moretta A, Caligiuri MA, Zitvogel L, Lanier LL, et al. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science*. 2011;331(6013):44-9.
110. Tanaka J, Tutumi Y, Mori A, Ohta S, Kobayashi S, Asaka M, et al. Sequential analysis of HLA-C-specific killer cell inhibitory receptor (CD158b) expressing peripheral blood mononuclear cells during chronic graft-versus-host disease. *Bone marrow transplantation*. 2000;26(3):287-90.
111. Guerra N, Guillard M, Angevin E, Echchakir H, Escudier B, Moretta A, et al. Killer inhibitory receptor (CD158b) modulates the lytic activity of tumor-specific T lymphocytes infiltrating renal cell carcinomas. *Blood*. 2000;95(9):2883-9.
112. Velardi A. Role of KIRs and KIR ligands in hematopoietic transplantation. *Current opinion in immunology*. 2008;20(5):581-7.
113. Wang J, Urbanowicz RA, Tighe PJ, Todd I, Corne JM, Fairclough LC. Differential activation of killer cells in the circulation and the lung: a study of current smoking status and chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *PloS one*. 2013;8(3):e58556.
114. Barnes PJ. Mediators of chronic obstructive pulmonary disease. *Pharmacological reviews*. 2004;56(4):515-48.
115. Parham P. MHC class I molecules and KIRs in human history, health and survival. *Nature reviews Immunology*. 2005;5(3):201-14.
116. 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? *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2006;173(7):751-8.
117. Brandsma CA, Hylkema MN, Geerlings M, van Geffen WH, Postma DS, Timens W, et al. Increased levels of (class switched) memory B cells in peripheral blood of current smokers. *Respiratory research*. 2009;10:108.
118. Gosman MM, Willemsse BW, Jansen DF, Lapperre TS, van Schadewijk A, Hiemstra PS, et al. Increased number of B-cells in bronchial biopsies in COPD. *The European respiratory journal*. 2006;27(1):60-4.
119. Brandsma CA, Kerstjens HA, van Geffen WH, Geerlings M, Postma DS, Hylkema MN, et al. Differential switching to IgG and IgA in active smoking COPD patients and healthy controls. *The European respiratory journal*. 2012;40(2):313-21.
120. Kirkham PA, Caramori G, Casolari P, Papi AA, Edwards M, Shamji B, et al. Oxidative stress-induced antibodies to carbonyl-modified protein correlate with severity of chronic

obstructive pulmonary disease. American journal of respiratory and critical care medicine. 2011;184(7):796-802.

121. Arosa FA, Cardoso EM. Técnicas de imunologia. In: Arosa FA, Cardoso EM, Pacheco FC, editors. Fundamentos de imunologia. 2 ed: LIDEL; 2012. p. 565-97.

122. De Kleer I, Willems F, Lambrecht B, Goriely S. Ontogeny of myeloid cells. Frontiers in immunology. 2014;5:423.

123. van den Berg JM, Kuijpers TW. Educational paper: Defects in number and function of neutrophilic granulocytes causing primary immunodeficiency. European journal of pediatrics. 2011;170(11):1369-76.

124. Arosa FA. CD8+CD28- T cells: certainties and uncertainties of a prevalent human T-cell subset. Immunology and cell biology. 2002;80(1):1-13.

125. Herrmann M, Voll RE, Kalden JR. Etiopathogenesis of systemic lupus erythematosus. Immunology today. 2000;21(9):424-6.