



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

TESI DOCTORAL

ASSOCIACIÓ D'ELEMENTS DE LA RESPOSTA IMMUNE INNATA A LES INFECCIONS BACTERIANES EN MALALTIES RESPIRATÒRIES CRÒNIQUES

AUTORA

LÍDIA PEREA SORIANO

DIRECTORS

**ORIOI SIBILA VIDAL
SILVIA VIDAL ALCORISA**

Programa de Doctorat en Immunologia

Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia

IIB Institut de Recerca Hospital de la Santa Creu i Sant Pau

Universitat Autònoma de Barcelona, 2020

RESOLUCIÓ DE PRESENTACIÓ DE LA TESI COM A COMPENDI DE PUBLICACIONS

En la reunió del dia 09 de setembre de 2020 de la Comissió Acadèmica del Programa de Doctorat en Immunologia, d'acord amb la normativa Acadèmica de la Universitat Autònoma de Barcelona aplicable als Estudis universitaris regulats de conformitat amb el RD 99/2011

Ha resultat,

- Autoritzar
- No autoritzar

la presentació de la tesi de la Sra. Lidia Perea Soriano de títol “Associació d’elements de la resposta immune innata a les infeccions bacterianes en malalties respiratòries cròniques” en forma de compendi de publicacions a la Universitat Autònoma de Barcelona.

Ignacio Álvarez Pérez
Coordinador del programa de
Doctorat en Immunologia
Avançada0

Bellaterra (Cerdanyola del Vallès), 09 de setembre de 2020

CÒPIA PER A LA PERSONA INTERESSADA

“Today is the tomorrow you worried about yesterday”

Dale Carnegie.

AGRAÏMENTS

Als Directors d'aquesta tesi; a la Silvia Vidal, per donar-me l'oportunitat d'iniciar-me en la Immunologia durant el màster, per motivar-me i creure en mi, i per no descansar fins trobar-me un projecte de doctorat per poder estar amb ella. A l'Oriol Sibila, per tota la confiança que diposita en mi, per valorar-me i guiar-me en la meva carrera i per totes les oportunitats que em continua oferint. Moltes gràcies als dos per mostrar-me també un enorme recolzament a nivell personal.

A la Bet, per la seva dedicació, per ensenyar-me a interpretar i a ser crítica amb els resultats, i per escoltar-me i recolzar-me sempre que ho he necessitat.

Al Juan i al Carlos, impossible separar-los, per la seva confiança, ajuda i per tots els riures que m'han tret al llarg de tots aquests anys.

A la M^a Àngels, per la seva predisposició a ajudar-me sempre i per preocupar-se per mi com si formés part de la seva família.

A la Maria, per convertir-se en la gran amiga que tothom voldria tenir a la *payata* del costat i a la vida en general.

A l'Eder, al Ruben, al Jose, l'Anais, la Leticia, la Laura, al Cándido i a tots els membres del Departament d'Immunologia per contribuir en la meva formació i pels bons moments que hem passat junts.

Al Servei de Pneumologia i Microbiologia, en especial a l'Ana Rodrigo, al Guillermo Suárez, al Jordi Giner, a l'Alfons Torrego i al Diego Castillo per facilitar la col·laboració i així despertar el meu interès per les malalties respiratòries.

Als meus pares i a la meva germana, per recolzar-me incondicionalment i per insistir-me en que lluités per dedicar-me només a allò que em fes feliç.

A les meves cosines, al meu cosí i als meus tiets, per alegrar-se dels meus èxits com si fossin els seus propis.

Als qui van descobrir la carrera científica amb mi ara fa 10 anys, "*los de siempre*". Sense el recolzament de la Laura, la Mireia, la Carla, el Guillem i el Marc aquests anys haurien estat més complicats.

Als qui han estat al meu costat des d'abans de saber que acabaria dedicant-me a la ciència. A la Nàdia i a la Judith, perquè les alegries i les penes compartides amb elles sempre es porten millor.

I en especial, a l'avi i al tiet que no han pogut veure fins on m'han portat els primers experiments.

A tots ells, moltes gràcies de tot cor.

LLISTAT D'ABREVIACIONS

ABPA	Aspergil·losi broncopulmonar al·lèrgica
AEC	Cèl·lules alveolars epitelials
AF	Aguditzador freqüent
BAL	Rentat broncoalveolar
BSI	<i>Bronchiectasis Severity Index</i>
CAT	<i>COPD Assessment Test</i>
CD	Clúster de diferenciació
CI	Corticoides inhalats
CXCL	<i>Chemokine (C-X-C motif) ligand</i>
CXCR	<i>CXC chemokine receptors</i>
DAMPs	<i>Damage-associated molecular patterns</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
ENA-78	<i>Epithelial neutrophil-activating protein 78</i>
FABPs	<i>Fatty-acid binding protein</i>
FEV₁	<i>Forced expiratory volume in 1 second</i>
FVC	<i>Forced vital capacity</i>
GAGs	Glicosaminoglicans
GCP-2	<i>Granulocyte chemotactic protein 2</i>
GOLD	<i>Global Obstructive Lung Diseases</i>
GRO-α	<i>Growth-regulated oncogene α</i>
Ig	Immunoglobulina
IL	Interleucina
IMC	Índex de massa corporal
LABA	<i>Long-acting beta agonists</i>
LAMA	<i>Long-acting muscarinic antagonists</i>
LAP	<i>Latency-associated peptide</i>
LPS	Lipopolisacàrid
LTB₄	Leucotriè B ₄
LTBPs	<i>Latent transforming growth factor β binding proteins</i>
M-CSF	<i>Monocyte colony stimulating factor</i>
MEC	Matriu extracel·lular
MMPs	Metal·loproteases de la matriu
mMRC	<i>Modified Medical Research Council</i>
MPO	Mieloperoxidasa
MPOC	Malaltia pulmonar obstructiva crònica
MRC	Malalties respiratòries cròniques

NADPH	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>
NAP-2	<i>Neutrophil-activating peptide 2</i>
NE	Neutròfil elastasa
NETs	<i>Neutrophil extracellular traps</i>
NF	Aguditzador no freqüent
NF-κB	<i>Nuclear factors kappa B</i>
NK	<i>Natural killer cell</i>
NTHi	<i>Hemophilus influenzae</i> no tipificable
PAMPs	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i>
PAMs	Pèptids antimicrobians
PRRs	<i>Pattern recognition receptors</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
SABA	<i>Short-acting beta agonists</i>
SAMA	<i>Short-acting muscarinic antagonists</i>
SEP	Substància extracel·lular polimèrica
SLPI	<i>Secretory leukocyte protease inhibitor</i>
SP	<i>Surfactant Protein</i>
TC	Tomografia computeritzada
TGF-β	<i>Transforming growth factor β</i>
TIMPs	<i>Tissue inhibitors of metalloproteinases</i>
TLRs	<i>Toll-like receptors</i>
TNF-α	<i>Tumour necrosis factor α</i>
UFC	Unitats formadores de colònies
VDBP	<i>Vitamin D Binding Protein</i>

ÍNDEX

1. RESUM	1
1.1. RESUM DE LA TESI I DE LES PUBLICACIONS DERIVADES	3
1.2 SUMMARY OF THESIS AND ASSOCIATED PAPERS	7
2. INTRODUCCIÓ	11
2.1 GENERALITATS DE LES MALALTIES RESPIRATÒRIES CRÒNIQUES ...13	
2.1.1 Malaltia Pulmonar Obstructiva Crònica (MPOC)	14
2.1.1.1 Diagnòstic.....	15
2.1.1.2 Tractaments	17
2.1.1.3 Pronòstic	19
2.1.2 Bronquièctasis.....	19
2.1.2.1 Diagnòstic.....	20
2.1.2.2 Tractaments	21
2.1.2.3 Pronòstic	23
2.2 INFECCIÓ RESPIRATÒRIA BACTERIANA	24
2.2.1 Infecció respiratòria en fase d'estabilitat clínica.....	24
2.2.2 Episodis d'aguditzacions.....	25
2.3 RESPOSTA IMMUNE INNATA PULMONAR EN LES INFECCIONS BACTERIANES	27
2.3.1 Alteracions en la barrera epitelial respiratòria.....	28
2.3.2 Resposta cel·lular	32
2.3.2.1 Neutròfils.....	32
2.3.2.2 Monòcits i macròfags alveolars.....	36
2.3.3 Factors solubles pulmonars involucrats en la resposta innata.....	39
2.3.3.1 Mediadors inflamatoris claus durant la infecció respiratòria.....	39
2.3.3.2 Proteïnes i pèptids antimicrobians (PAMs).....	46
2.3.3.3 Proteïnes d'unió als àcids grassos (FABPs).....	51
2.3.4 Mecanismes bacterians d'evasió del sistema immune innat.....	52
2.3.4.1. Secreció d'immunomediadors.....	53
2.3.4.2. Evasió humoral.....	54
2.3.4.3. Evasió cel·lular	54
2.3.4.4. Formació de biofilms.....	56
3. HIPÒTESI I OBJECTIUS	59
3.1. HIPÒTESI	61

3.2. OBJECTIUS.....	62
4. PUBLICACIONS.....	65
4.1 ARTICLE I.....	67
4.2 ARTICLE II.....	69
4.3. ARTICLE III.....	71
5. RESUM GLOBAL DE RESULTATS I DISCUSSIÓ.....	73
5.1. ARTICLE I.....	75
5.1.1. Resum global de resultats	75
5.1.2 Discussió i rellevància.....	77
5.2. ARTICLE II.....	79
5.2.1. Resum global de resultats.....	79
5.2.2. Discussió i rellevància	81
5.3. ARTICLE III.....	83
5.3.1. Resum global de resultats.....	83
5.3.2. Discussió i rellevància	86
6. CONCLUSIONS.....	87
7. BIBLIOGRAFIA.....	93

1. RESUM

1.1. RESUM DE LA TESI I DE LES PUBLICACIONS DERIVADES

Les infeccions bacterianes respiratòries en pacients amb Malaltia Pulmonar Obstructiva Crònica (MPOC) i amb bronquièctasis són una de les principals causes d'empitjorament del pronòstic d'aquestes malalties. Sovint aquestes infeccions causen episodis d'agudització durant les quals la simptomatologia dels pacients s'agreuja, arribant a requerir ingrés hospitalari per controlar la infecció. Es coneix que aquests pacients pateixen una inflamació pulmonar i sistèmica que apareix durant l'estabilitat clínica i s'accentua durant les aguditzacions. A més, es creu que el microambient inflamatori pulmonar d'aquestes malalties afavoreix la infecció per determinats bacteris, com la *Pseudomona aeruginosa* i l'*Hemophilus influenzae*, associats amb major severitat. Tot i així, encara es desconeixen els mecanismes immunològics pels quals hi ha pacients que aguditzen freqüentment, anomenats aguditzadors freqüents (AF) i altres pacients que no aguditzen o ho fan de manera poc freqüent (NF). Per aquestes raons, aquesta tesi pretén estudiar els diferents elements de la resposta immune innata local implicats en la defensa de les infeccions bacterianes, en dues malalties respiratòries d'elevat impacte en la salut pública com són la MPOC i les bronquièctasis. El primer objectiu ha estat associar els nivells pulmonars de *Fatty-acid binding protein 4* (FABP4) en pacients amb MPOC amb la presència d'infecció respiratòria, severitat de la malaltia i poblacions cel·lulars. El segon objectiu s'ha centrat en estudiar els nivells pulmonars dels pèptids antimicrobians (PAMs) Lactoferrina, Lisozima, LL-37 i *Secretory Leukocyte Protease Inhibitor* (SLPI) com a possibles marcadors pronòstic de futures aguditzacions en pacients amb bronquièctasis. Per últim, el tercer objectiu ha estat caracteritzar diferents perfils immunològics d'inflamació pulmonar en pacients amb bronquièctasis i associar aquests als paràmetres clínics.

A continuació, es resumeixen els resultats de cada publicació.

ARTICLE I - Reduced airway levels of fatty-acid binding protein 4 in COPD: relationship with airway infection and disease severity

Lidia Perea, Ana Rodrigo-Troyano, Elisabet Cantó, Marisol Domínguez-Álvarez, Jordi Giner, Ferran Sanchez-Reus, Judit Villar-García, Sara Quero, Marian García-Núñez, Alicia Marín, Eduard Monsó, Rosa Faner, Alvar Agustí, Silvia Vidal#, Oriol Sibila#.

Respiratory Research. 2020 Jan 13;21(1):21. **Factor d'impacte: 3.8, Primer Quartil**

#Els autors comparteixen la posició sènior de l'article.

Es van analitzar els nivells pulmonars i sistèmics de la proteïna FABP4 en mostres de sobrenedants de rentat broncoalveolar (BAL), d'esput i de plasma procedents de pacients amb MPOC ($n=52$) en fase d'estabilitat clínica. També es van comparar amb les mateixes mostres procedents de controls sense cap patologia respiratòria ($n=29$). Es va observar que els pacients amb MPOC presentaven nivells disminuïts de FABP4 en BAL comparat amb els controls sans. Aquesta diferència no es va trobar a nivell d'esput. Aquest resultat és consistent amb la dèbil correlació que es va observar entre els nivells de FABP4 en BAL i en esput ($\rho=0.31$, $p=0.01$). Dins dels pacients amb MPOC, aquells amb infecció respiratòria presentaven nivells disminuïts de FABP4 en esput comparat amb els pacients sense infecció respiratòria. En aquest estudi, no es va trobar cap relació entre els nivells de FABP4 i cap bacteri en concret causant de la infecció respiratòria. Els pacients amb un grau de severitat major, mesurat per l'índex GOLD presentaven nivells disminuïts de FABP4 tant en BAL com en esput. Els pacients amb pitjor funció pulmonar i pitjor qualitat de vida també presentaven nivells disminuïts de FABP4 tant en BAL com en esput. Els nivells de FABP4 anaven relacionats de manera directa amb la presència de macròfags alveolars, tant en percentatge ($\rho=0.54$, $p=0.0003$) com en nombre absolut ($\rho=0.52$, $p=0.0006$). Pel que fa als nivells de FABP4 en plasma, no es va trobar cap diferència significativa entre els grups de pacients segons l'anàlisi anterior. En resum, els nivells pulmonars disminuïts de FABP4 es relacionen amb presència d'infecció bacteriana, amb major severitat i amb major presència de macròfags alveolars en pacients amb MPOC.

ARTICLE II - Antimicrobial peptides, disease severity and exacerbations in bronchiectasis

Oriol Sibila*, **Lídia Perea***, Elisabet Cantó, Amelia Shoemark, Diane Cassidy, Alexandria Holly Smith, Guillermo Suarez-Cuartin, Ana Rodrigo-Troyano, Holly R Keir, Martina Oriano, Samantha Ong, Silvia Vidal, Francesco Blasi, Stefano Aliberti, James D Chalmers.

Thorax. 2019 Sep;74(9):835-842. **Factor d'impacte: 10.3, Primer Quartil**

*Els autors van contribuir de la mateixa manera en l'article.

Es van analitzar els nivells pulmonars i sistèmics dels PAMs Lactoferrina, Lisozima, LL-37 i SLPI en mostres de sobrenedants d'esput i de plasma procedents de pacients amb bronquièctasis ($n=135$) en fase d'estabilitat clínica. Es va observar que els pacients amb major severitat i activitat de la malaltia, mesurada per l'índex *Bronchiectasis Severity Index* (BSI) i FACED, presentaven nivells pulmonars elevats de LL-37 i reduïts de SLPI. No es va trobar cap diferència amb els nivells de Lactoferrina i Lisozima en aquest grup de pacients. Els pacients que tenien infecció respiratòria per *P.aeruginosa* presentaven nivells pulmonars elevats de LL-37 i Lactoferrina i nivells disminuïts de SLPI comparat amb els pacients que tenien infecció causada per altres bacteris, així com amb els pacients que no presentaven infecció respiratòria. Els nivells reduïts de SLPI no es van associar amb els nivells de neutròfil elastasa activa (NE) ni amb els de metal·loproteasa 9 (MMP-9), proteases conegudes per causar el tall i la inactivació de SLPI. Finalment, es va fer l'anàlisi comparatiu de dos grups de pacients establint com a punt de tall els valors per sobre i per sota de la mediana dels nivells de LL-37 i de SLPI. Es va observar que els pacients amb nivells pulmonars de LL-37 més alts i de SLPI més baixos, de manera independent, patien un major nombre d'aguditzacions durant 1 any de seguiment. Pel que fa als nivells de PAMs en plasma, no es va trobar cap diferència significativa entre els grups de pacients segons els anàlisis anteriors. En resum, aquest estudi demostra que els pacients amb fenotip d'AF i els pacients amb infecció respiratòria, especialment causada per *P.aeruginosa*, presenten nivells elevats de LL-37 i nivells reduïts de SLPI que prediuen el risc de patir futures aguditzacions.

ARTICLE III - A cluster analysis of bronchiectasis patients based on the airway immune profile

Lidia Perea*, Elisabet Cantó*, Guillermo Suarez-Cuartin, Stefano Aliberti, James D Chalmers, Oriol Sibila#, Silvia Vidal#.

En revisió a la revista *Chest*

*Els autors van contribuir de la mateixa manera en l'article.

#Els autors comparteixen la posició sènior de l'article.

Es van estudiar els perfils pulmonars immunològics en sobrenedants d'esput de pacients amb bronquièctasis ($n=128$) en fase d'estabilitat clínica agrupats segons els nivells pulmonars de PAMs. Per aquesta estratègia, es van generar tres clústers de pacients que presentaven diferents perfils pulmonars de PAMs. Aquests clústers també representaven grups de pacients amb diferent freqüència d'infecció respiratòria i diferents graus de severitat de la malaltia. A més, cada clúster s'associava amb diferents graus d'inflamació pulmonar, mesurada mitjançant els nivells de IL-8, TGF- β i IL-6, de remodelació tissular i de dany epitelial, mesurats de forma surrogada a partir dels nivells de Glicosaminoglicans (GAGs), MMP-9, NE i quantitat de DNA total i bacterià. Tot i que els assajos de migració neutrofílica no van revelar diferències entre els tres clústers, sí que es va associar la capacitat de l'esput d'atreure neutròfils sans amb el contingut de IL-8 i de LL-37 dels esputs dels pacients de bronquièctasis. L'estudi conjunt de les associacions entre PAMs, inflamació pulmonar, remodelació tissular i dany epitelial van evidenciar una desregulació de la resposta immune innata entre els tres clústers. Finalment, aquests tres clústers també es van associar de manera diferent amb el nombre d'aguditzacions de forma prospectiva en un any de seguiment i amb el temps que trigarien aquests pacients a patir el primer episodi d'agudització des del moment de la inclusió a l'estudi. En resum, aquest estudi evidencia l'heterogeneïtat biològica en pacients amb bronquièctasis i l'existència de tres grups de pacients que presenten diferents perfils pulmonars immunològics, diferents graus de desregulació de la resposta innata i diferents graus d'infecció respiratòria, severitat i futures aguditzacions.

1.2 SUMMARY OF THESIS AND ASSOCIATED PAPERS

Respiratory bacterial infections in patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) and patients with bronchiectasis are one of the main causes of worsening the prognosis. These infections can cause exacerbations, known as episodes of acute worsening of disease symptoms which sometimes require hospitalization to stabilize the infection. These patients suffer from systemic and pulmonary inflammation during clinical stability and are elevated during exacerbations. In addition, the pulmonary inflammatory microenvironment of these diseases is thought to promote infection by certain bacteria, such as *Pseudomonas aeruginosa* and *Hemophilus influenzae*, which are associated with greater severity. However, the immunological mechanisms by which patients frequently exacerbate, called frequent exacerbators (AF), and other patients who do not exacerbate or infrequently (NF) are still unknown. For these reasons, this thesis aims to study the different elements of the local innate immune response involved in the defense of bacterial infections, in two respiratory diseases with high public health impact such as COPD and bronchiectasis. The first objective was to associate the pulmonary and systemic levels of Fatty-acid binding protein 4 (FABP4) in COPD patients with the presence of respiratory infection, disease severity, and cell populations. The second objective was to study the pulmonary and systemic levels of antimicrobial peptides (AMPs) Lactoferrin, Lysozyme, LL-37 and Secretory Leukocyte Protease Inhibitor (SLPI) as an outcome marker of future exacerbations in patients with bronchiectasis. Finally, the third objective was to characterize different profiles of pulmonary inflammation in patients with bronchiectasis

The results of each original research are summarized below.

PAPER I - Reduced airway levels of fatty-acid binding protein 4 in COPD: relationship with airway infection and disease severity.

Lidia Perea, Ana Rodrigo-Troyano, Elisabet Cantó, Marisol Domínguez-Álvarez, Jordi Giner, Ferran Sanchez-Reus, Judit Villar-García, Sara Quero, Marian García-Núñez, Alicia Marín, Eduard Monsó, Rosa Faner, Alvar Agustí, Silvia Vidal#, Oriol Sibila#.

Respiratory Research. 2020 Jan 13;21(1):21. **Impact factor: 3.8, First Quartile**

#These authors share the senior authorsip jointly.

The pulmonary and systemic levels of FABP4 protein were analyzed in samples of supernatants of bronchoalveolar lavage (BAL), sputum and plasma from patients with clinically stable COPD ($n=52$). FABP4 levels were also compared with the same samples from controls without any respiratory condition ($n=29$). It was found that COPD patients had low FABP4 levels in BAL compared to controls. This difference was not found in the sputum content, thus explaining the weak correlation between FABP4 levels in BAL and sputum ($\rho=0.31$, $p=0.01$). Among COPD patients, those with airway infection had low levels of sputum FABP4 compared with non-infected patients. In this work, no relationship was found between the pulmonary levels of FABP4 and any particular bacterium causing the respiratory infection. Patients with the highest severity, measured by the GOLD index, had low levels of FABP4 in both BAL and sputum. In addition, patients with worse lung function and worse quality of life also exhibited low levels of FABP4 in both BAL and sputum. FABP4 levels were directly related to the presence of alveolar macrophages, both in percent ($\rho=0.54$, $p=0.0003$) and in absolute number ($\rho=0.52$, $p=0.0006$). Regarding plasmatic FABP4 levels, no significant differences were found in the previous analyzes among the groups of patients. In summary, low pulmonary FABP4 levels were associated with bacterial infection, higher severity, and greater presence of alveolar macrophages in COPD patients.

PAPER II - Antimicrobial peptides, disease severity and exacerbations in bronchiectasis.

Oriol Sibila*, **Lidia Perea***, Elisabet Cantó, Amelia Shoemark, Diane Cassidy, Alexandria Holly Smith, Guillermo Suarez-Cuartin, Ana Rodrigo-Troyano, Holly R Keir, Martina Oriano, Samantha Ong, Silvia Vidal, Francesco Blasi, Stefano Aliberti, James D Chalmers.

Thorax. 2019 Sep;74(9):835-842. **Impact factor: 10.3, First Quartile**

*These authors share the first authorship jointly.

The pulmonary and systemic levels of the AMPs Lactoferrin, Lysozyme, LL-37, and SLPI were analyzed in sputum supernatants and plasma samples from patients with clinically stable bronchiectasis ($n=135$). Patients with the highest severity and activity of the disease, as measured by the Bronchiectasis Severity Index (BSI) and FACED, had high pulmonary levels of LL-37 and low pulmonary levels of SLPI. No significant differences were found regarding the pulmonary levels of Lactoferrin and Lysozyme among the groups of patients. Patients infected by *P.aeruginosa* had high pulmonary levels of LL-37 and Lactoferrin, and low levels of SLPI compared with patients infected by other bacteria and with non-infected patients. The low levels of SLPI were not associated with the levels of active neutrophil elastase (NE) or metalloprotease 9 (MMP-9), proteases that are known to cause SLPI shedding and inactivation. Finally, median values of LL-37 and SLPI levels were used as a cut-off to explore the outcomes. This analysis revealed that patients with independently high pulmonary LL-37 levels and low SLPI levels suffered more exacerbations during 1 year of follow-up. Regarding the plasmatic levels of AMPs, no significant differences were found in the previous analyzes. In summary, this study demonstrates that patients with the phenotype of frequent exacerbator and patients with respiratory infection, specially by *P.aeruginosa*, had high pulmonary levels of LL-37 and low levels of SLPI, which independently predict the risk of future exacerbations.

PAPER III - A cluster analysis of bronchiectasis patients based on the airway immune profile

Lidia Perea*, Elisabet Cantó*, Guillermo Suarez-Cuartin, Stefano Aliberti, James D Chalmers, Oriol Sibila#, Silvia Vidal#.

Under review in the journal *Chest*.

*These authors share the first authorship jointly.

#These authors share the senior authorship jointly.

Immunological pulmonary profiles were studied in sputum supernatants from patients with clinically stable bronchiectasis ($n=128$) based on pulmonary levels of AMPs. This analysis generated three clusters of patients who presented significantly different pulmonary levels of Lactoferrin, Lysozyme, LL-37 and SLPI. These immunological clusters also represented groups of patients with varying degrees of respiratory infection frequency and varying degrees of disease severity. In addition, each cluster was associated with varying degrees of pulmonary inflammation, measured by levels of IL-8, TGF- β , and IL-6, tissue remodeling, and epithelial damage, measured by levels of Glycosaminoglycans (GAGs), MMP-9, NE and amount of total and bacterial DNA. Although neutrophilic migration assays did not reveal differences between these three clusters, they did associate the sputum ability to attract neutrophils with the total IL-8 and LL-37 content in sputum. The study of the relationships between AMPs, pulmonary inflammation, tissue remodeling, and epithelial damage revealed a dysregulation of the innate immune response between the three clusters. Finally, these three clusters were also associated distinctly with the number of future exacerbations during 1 year of follow-up and with the time of the next exacerbation from the inclusion at the study. In summary, this study demonstrates biological heterogeneity in patients with bronchiectasis with the existence of three groups of patients with distinct immunological pulmonary profiles, distinct degrees of innate response deregulation, and distinct degrees of respiratory infection, severity, and risk of exacerbation.

2. INTRODUCCIÓ

2.1 GENERALITATS DE LES MALALTIES RESPIRATÒRIES CRÒNIQUES

Les malalties respiratòries cròniques (MRC) són un grup de malalties pulmonars que afecten les vies aèries i, que a dia d'avui, no tenen cura. El tractament del qual es disposa és un tractament simptomàtic que està orientat a dilatar les vies aèries i millorar la sensació d'ofec, per tal de controlar la resta de símptomes (tos crònica, expectoració i recurrents infeccions respiratòries) i millorar la qualitat de vida del pacient¹.

La seva prevalença està augmentant a nivell mundial, constituint un problema important de salut pública en tots els països. S'estima que 1 bilió de persones al món pateixen alguna MRC².

Tot i que les MRC amb més prevalença són la malaltia pulmonar obstructiva crònica (MPOC)³ i l'asma⁴, també s'inclouen dins d'aquest grup les bronquièctasis, les malalties pulmonars ocupacionals, les malalties intersticials pulmonars, els trastorns de la son i la hipertensió pulmonar². En aquesta tesi, les dues MRC que s'estudiaran seran la MPOC i les bronquièctasis (**Figura 1**).

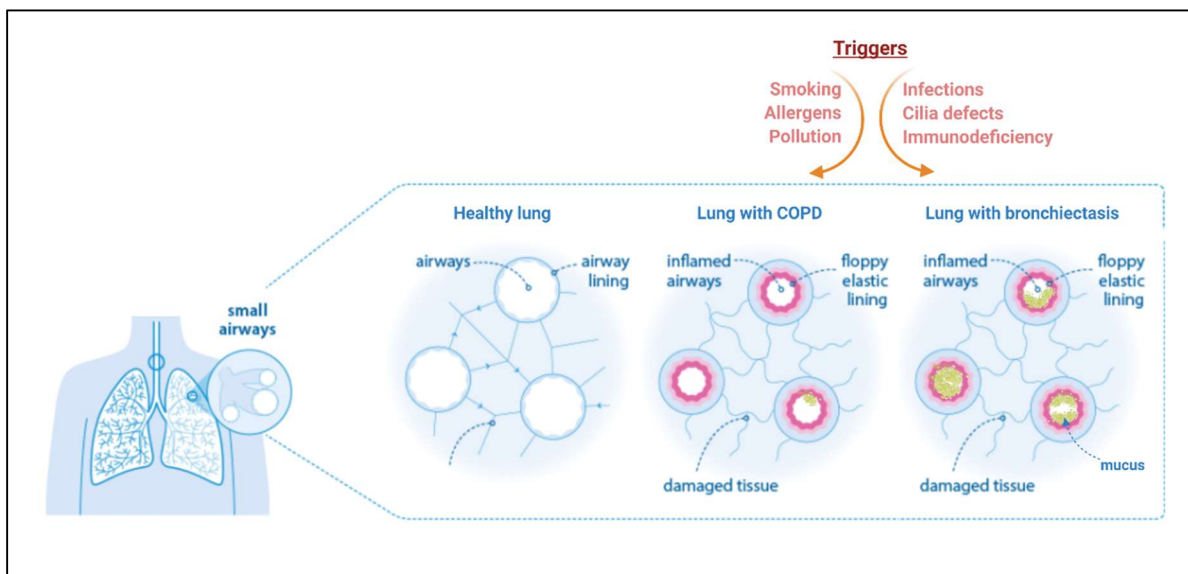


Figura 1. Comparativa de les vies aèries sanes, amb MPOC i amb bronquièctasis (Adaptat de *British Lung Foundation* <https://www.blf.org.uk>)

Els principals factors de risc, amb diferent impacte segons la MRC que s'estudiï, són: el tabac (incloent els fumadors passius), la pol·lució, l'exposició a substàncies contaminants laborals, les recurrents infeccions de les vies aèries inferiors durant la infantesa i la falta d'activitat física^{1,5}.

El desenvolupament de les MRC és lent i empitjora al llarg del temps. El seu impacte en la qualitat de vida dels pacients és significatiu degut a la sensació d'ofec, la tos productiva i la reducció de l'activitat física.

El maneig de les MRC no és fàcil degut a què es caracteritzen per ser malalties complexes, multifactorials i heterogènies clínicament⁶⁻⁸. A més, entre elles també poden compartir característiques clíniques, funcionals, d'imatge i/o biològiques que pot arribar a dificultar el seu diagnòstic⁹.

2.1.1 Malaltia Pulmonar Obstructiva Crònica (MPOC)

La MPOC és una malaltia respiratòria d'elevada freqüència i morbimortalitat a nivell mundial, que suposa un problema de salut pública i econòmic de primera magnitud¹⁰. És la tercera causa de mort a nivell mundial¹¹. Tot i així, es considera una malaltia evitable i tractable¹².

Es dona principalment en adults fumadors o ex-fumadors que presenten o havien presentat un consum de tabac de més de 10 paquets/any i que presenten símptomes respiratoris persistents com són l'obstrucció pulmonar, l'expectoració de mucositat i la tos crònica. Tot i que la causa primària és el tabac, també són grups de risc aquelles persones que viuen en àrees exposades a elevats nivells de pol·lució o treballadors exposats a la inhalació de substàncies i gasos nocius¹².

Tots els fumadors tenen uns nivells d'inflamació pulmonar superiors als de les persones no fumadores. La MPOC, però, comprèn un grup d'anomalies pulmonars relacionades amb una resposta inflamatòria exagerada en els alvèols, en les vies

respiratòries i en els vasos pulmonars, enfront l'exposició a determinats agents nocius. Dins de la MPOC s'inclou l'emfisema pulmonar, la bronquitis crònica i les malalties de les vies aèries petites¹³.

La resposta inflamatòria anòmala produeix l'estretament de les vies aèries i la destrucció del teixit pulmonar, concretament de les parets alveolars. Els canvis estructurals produïts disminueixen la capacitat de les vies aèries de romandre obertes durant la inspiració, fet que es coneix com a atrapament aeri. Com a conseqüència, es produeix la hiperinflació pulmonar, que redueix la capacitat inspiratòria, de manera que augmenta la capacitat residual funcional i aplatina el diafragma, fent que les pressions generades per expulsar l'aire siguin menors¹⁴.

Degut a la obstrucció i a la hiperinflació pulmonar, els pacients amb MPOC poden desenvolupar comorbiditats relacionades amb afectacions de la funció del miocardi i de l'intercanvi de gasos, com la cardiopatia isquèmica, la insuficiència cardíaca i la hipertensió. Altres comorbiditats associades són la osteoporosi, l'anèmia normocítica, la diabetis, el síndrome metabòlic i la depressió¹².

2.1.1.1 Diagnòstic

El diagnòstic de la MPOC s'ha de considerar en aquells pacients que presenten dispnea, expectoració, tos crònica i/o història d'exposició als factors de risc de la malaltia.

Per confirmar la obstrucció respiratòria, es realitza una espirometria que demostra que el coeficient entre el volum expiratori màxim durant el primer segon (FEV₁) i la capacitat vital forçada (FVC) després de la prova broncodilatadora és inferior a 0.7 (**Figura 2**). Moltes vegades, és una malaltia que es diagnostica tard, ja que els pacients poden no tenir símptomes en les fases inicials¹².

L'índex *Global Obstructive Lung Disease* (GOLD) determina la severitat del pacient amb MPOC. Aquest índex consta de dues modalitats. Per una banda, la modalitat numèrica

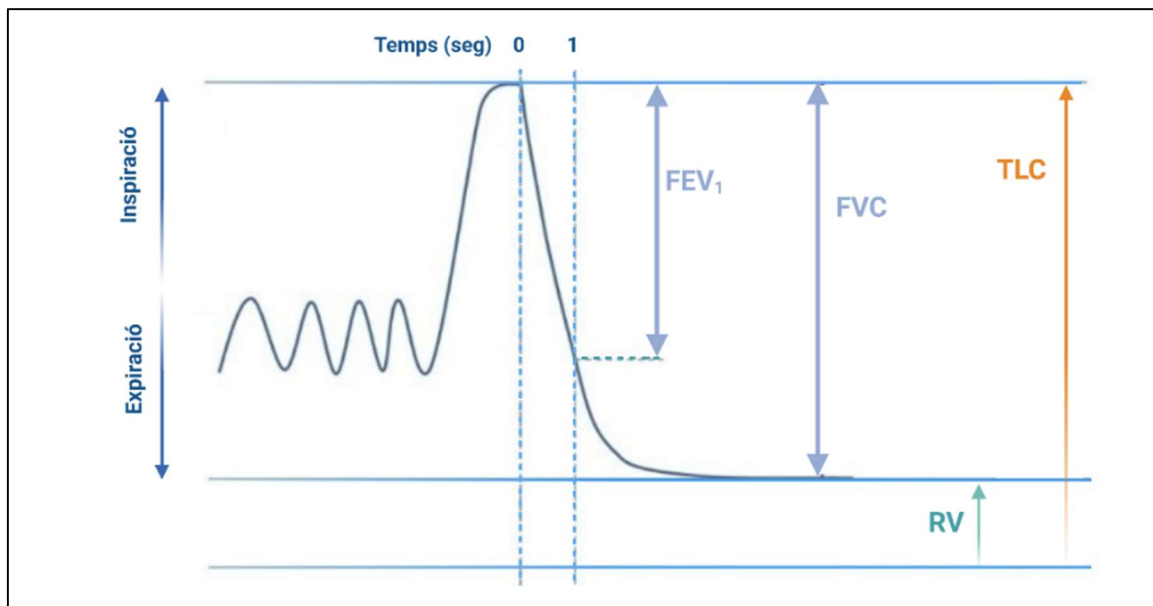


Figura 2. Paràmetres mesurats durant l'espirometria. FEV₁, forced expiratory volume in 1 sec; FVC, forced vital capacity; TLC, total lung capacity; RV, residual volume.

(GOLD 1, 2, 3, 4) es basa en el grau d'obstrucció respiratòria, sent el grup GOLD 4 aquell amb major obstrucció (<30%). Per l'altra banda, la modalitat alfabètica (GOLD A, B, C, D) té en compte el grau de dispnea mesurat per l'índex *modified Medical Research Council* (mMRC), els símptomes respiratoris avaluats mitjançant el *COPD Assessment Test* (CAT) i l'història d'aguditzacions. Es considera el grup GOLD D com aquell grup amb un major grau de severitat de la malaltia en quant a la càrrega simptomàtica i el risc d'aguditzacions¹² (**Figura 3**).

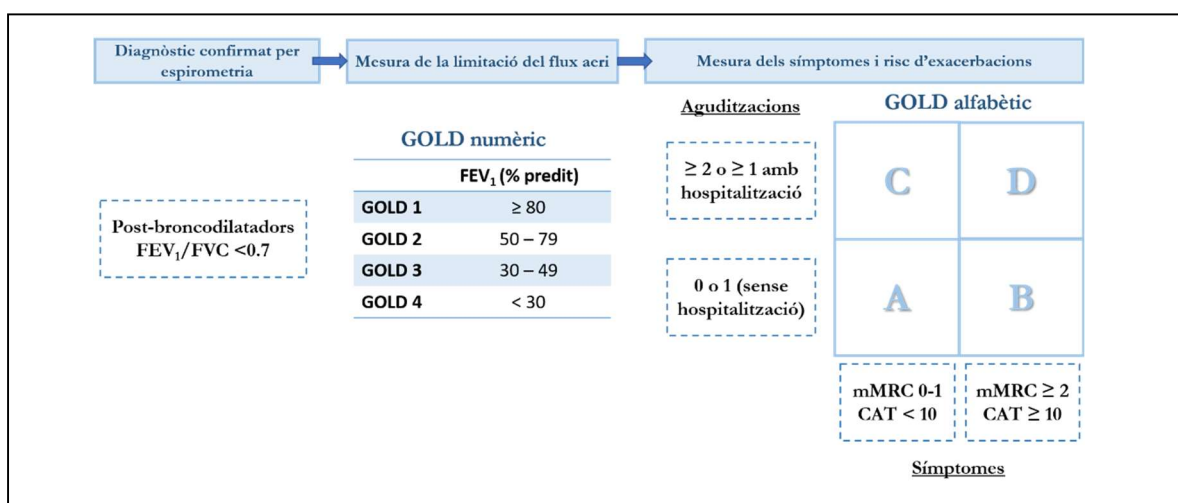


Figura 3. Actual definició de l'índex GOLD (Vogelmeier CF. *AJRCCM*, 2017).

2.1.1.2 Tractaments

L'educació del pacient amb MPOC és una de les principals estratègies a seguir per evitar l'impacte dels factors de risc. Dins d'aquesta educació es trobaria: la interrupció de l'hàbit tabàquic, amb o sense ajuda de la farmacoteràpia, la disminució de l'exposició laboral a contaminants, l'aplicació de les vacunes antigripals i antipneumocòcciques, la suplementació nutricional, la rehabilitació pulmonar, la correcta higiene bucal, la teràpia amb oxigen i l'ajuda psicològica, en cas que fossin necessàries¹⁵.

Pel que fa als fàrmacs, tenen com a objectiu reduir la simptomatologia, la freqüència i la severitat de les aguditzacions, així com millorar la tolerància a l'exercici i l'estat de salut. A dia d'avui, però, encara no existeix cap fàrmac que modifiqui el deteriorament pulmonar que pateixen al llarg del temps ni que millori la supervivència dels pacients¹⁶.

Broncodilatadors inhalats

Els broncodilatadors inhalats són la medicació clau en els pacients amb MPOC ja que alleugeren l'obstrucció bronquial gràcies a la relaxació del múscul llis respiratori¹⁶. Es classifiquen en dos grups segons el seu mecanisme d'acció:

- **Acció curta:** Tot i que no s'utilitzen en monoteràpia, aquests fàrmacs milloren FEV₁ i la simptomatologia en pacients amb diferents graus de severitat¹⁷.
 - Agonistes dels receptors β_2 (*Short-acting beta agonists*; **SABA**): L'activació dels receptors β_2 de les cèl·lules bronquials musculars llises es produeix al cap de 5-10 minuts des de la inhalació fins a unes 4-6 hores (albuterol, levalbuterol). Promouen la broncodilatació a través de l'augment dels nivells d'adenosina cíclica monofosfat (cAMP)¹⁸.
 - Antagonistes dels receptors muscarínics (*Short-acting muscarinic antagonists*; **SAMA**): El bloqueig dels receptors muscarínics M1, M2 i M3 es manté fins a 8 hores (ipatropi) a través de la inhibició de la constricció del múscul llis bronquial per l'acetilcolina¹⁸.

- **Acció llarga:** Són fàrmacs recomanats com a primera línia de teràpia per pacients amb una càrrega simptomàtica important, freqüents aguditzacions i severa limitació bronquial^{15,19}.
 - Agonistes dels receptors β_2 (*Long-acting beta agonists*; **LABA**): Els seus efectes broncodilatadors duren entre 12 (formoterol, salmeterol) i 24 hores (indacaterol, olodaterol, vilanterol)¹⁵.
 - Antagonistes dels receptors muscarínics (*Long-acting muscarinic antagonists*; **LAMA**): Els seus efectes broncodilatadors duren entre 12 (aclidini) i 24 hores (glicopirroni, tiotropi, umeclidini)¹⁵.

Combinació de les teràpies inhalades

Es recomana la teràpia combinada LABA/LAMA per augmentar l'eficàcia en la millora de la funció pulmonar, la càrrega simptomàtica, la qualitat de vida i, fins i tot, en alguns estudis, el risc de patir aguditzacions severes²⁰.

A més, degut a què la monoteràpia amb corticoesteroides inhalats (CI) no està recomanada²¹, també es dona la combinació CI/LABA i la triple CI/LABA/LAMA²².

Altres teràpies antiinflamatòries

L'inhibidor de la fosfodiesterasa 4 (PDE4; Roflumilast) és un inhibidor selectiu que augmenta els nivells intracel·lulars de cAMP per relaxar el múscul llis respiratori i exercir un efecte antiinflamatori en pacients amb MPOC de grau moderat i sever^{11,23}. El seu ús redueix la producció de leucotriè B4 (LTB4), de proteases i d'espècies reactives d'oxigen (ROS) per part dels neutròfils^{20,23}.

Els macròlids com l'azitromicina, tot i tenir activitats antibacterianes, també han demostrat que el seu ús de manera crònica exerceix un efecte antiinflamatori i immunomodulador que redueix la freqüència de les aguditzacions²⁴.

2.1.1.3 Pronòstic

L'edat i el valor de FEV₁ són els millors paràmetres per predir la supervivència del pacient amb MPOC. El ritme de disminució del FEV₁ anualment sembla que és l'índex que millor es relaciona amb la mortalitat. Quan el FEV₁ és menor a 0.5, el risc de mortalitat augmenta respecte al de la població general. A més, l'Índex de Massa Corporal (IMC) menor a 21 kg/m² també s'associa amb un augment de la mortalitat^{25,26}.

Altres factors que prediuen el pronòstic dels pacients amb MPOC són l'edat avançada, la gravetat de la hipoxèmia, la magnitud de la hipertensió pulmonar, la hipercàpnia i les comorbiditats. Finalment, cal destacar que el factor que més incideix en l'evolució del pacient és la persistència del consum de tabac²⁵.

2.1.2 Bronquièctasis

Les bronquièctasis no associades a fibrosi quística, d'aquí en endavant anomenades bronquièctasis, són una de les malalties més oblidades en la medicina respiratòria. Això és degut a què és una malaltia molt heterogènia sense estudis epidemiològics representatius a gran escala²⁷. Es coneix que la seva prevalença ha anat en augment a nivell mundial degut a la millora en el diagnòstic i a la creació de registres nacionals i internacionals²⁸⁻³⁰.

A diferència del que succeeix a la MPOC, el tabac no suposa un factor de risc per si sol, ja que les bronquièctasis són majoritàriament causades per infeccions severes prèvies (tuberculosi o pneumònia), aspergil·losi broncopulmonar al·lèrgica (ABPA), deteriorament de la funció ciliar (discinèsia ciliar primària) i immunodeficiències primàries o secundàries. Tot i així, en un 40% dels casos l'etiologia és desconeguda³¹.

Es caracteritzen per una anòmala i irreversible dilatació bronquial degut a la destrucció dels components elàstics i musculars de la paret bronquial per l'ambient inflamatori. Les conseqüències d'aquesta dilatació són tos productiva crònica, expectoració i

recurrents infeccions respiratòries, així com cansament, molèsties al pit, hemoptisi i pèrdua de pes³². Tot i que les bronquièctasis poden afectar a persones de qualsevol edat i sexe, la prevalença global augmenta amb l'edat i en les dones³¹.

2.1.2.1 Diagnòstic

El diagnòstic es basa en l'estudi radiològic del tòrax mitjançant tomografia computeritzada (TC) toràcica. En aquesta, es poden detectar les dilatacions bronquials junt amb l'historial mèdic i l'avaluació dels símptomes respiratoris. El problema és que en una gran majoria de casos, el diagnòstic es produeix en estadis avançats de la malaltia³⁰.

Per tal d'avaluar el grau de severitat dels pacients amb bronquièctasis, es van introduir en la pràctica clínica dos índexs àmpliament estudiats: el *Bronchiectasis Severity Index* (BSI) i el FACED.

Per una banda, el BSI va ser específicament dissenyat per predir risc d'aguditzacions que requerissin ingrés hospitalari, per detectar aquells pacients amb pitjor qualitat de vida i, finalment, per predir la mortalitat. Aquest índex inclou 9 paràmetres clínics: l'edat, l'IMC, el percentatge predit FEV₁, el nombre d'ingressos hospitalaris en els últims dos anys, el nombre d'aguditzacions l'any anterior, l'índex de dispnea mMRC, la infecció crònica per *P.aeruginosa* i la severitat radiològica^{33,34} (**Taula 1**).

Per l'altra banda, l'índex FACED és un acrònim que inclou els paràmetres FEV₁, edat, infecció crònica per *P.aeruginosa*, extensió radiològica de les bronquièctasis i dispnea. La diferència amb el BSI és que atorga més puntuació al paràmetre de l'edat i no inclou el nombre d'aguditzacions que ha patit el pacient l'any previ. La finalitat de l'índex FACED és predir la mortalitat³⁴ (**Taula 2**).

Taula 1. Definició de l'índex BSI (*bronchiectasis.com.au*)

Críteris de severitat	0 punts	1 punt	2 punts	3 punts	4 punts	5 punts	6 punts
Edat	<50		50-69		70-79		≥80
IMC kg/m ²	≥18.5		<18.5				
FEV ₁ % predit	>80%	50-80%	30-49%	<30%			
Hospitalització en els últims 2 anys	No					Si	
Freqüència d'aguditzacions l'últim any	0-2		≥ 3				
Índex de dispnea MRC	1-3		4	5			
Colonització	No	Crònica		<i>P.aeruginosa</i>			
Severitat radiològica	<3 lòbuls afectats	≥ 3 lòbuls o canvis cístics					
Puntuació							
0-4 punts	<ul style="list-style-type: none"> • Pronòstic 1 any: 0-2.8% mortalitat, 0-3.4% hospitalització • Pronòstic 4 anys: 0-5.3% mortalitat, 0-9.2% hospitalització 						
5-8 punts	<ul style="list-style-type: none"> • Pronòstic 1 any: 0.9-4.8% mortalitat, 1-7.2% hospitalització • Pronòstic 4 anys: 4-11.3% mortalitat, 9.9-19.4% hospitalització 						
≥9 punts	<ul style="list-style-type: none"> • Pronòstic 1 any: 7.6-10.5% mortalitat, 16.7-52.6% hospitalització • Pronòstic 4 anys: 9.9-29.2% mortalitat, 41.2-80.4% hospitalització 						

Taula 2. Definició de l'índex FACED (*Martinez-Garcia MA. ERJ. 2014*).

Críteris de severitat	0 punts	1 punt	2 punts	Puntuació	Diagnòstic
FEV ₁ % predit	≥50%		<50%	0-2 punts	Bronquièctasis lleus
Age	<70		≥70	3-4 punts	Bronquièctasis moderades
Colonització crònica per <i>P.aeruginosa</i>	No	Si		5-7 punts	Bronquièctasis severes
Extensió radiològica	1-2 lòbuls afectats	≥ 2 lòbuls afectats			
Dispnea MRC	0-2	3-4			

2.1.2.2 Tractaments

Tot i que els factors de risc evitables com el tabac o la pol·lució no són els principals causants de les bronquièctasis, també es pot fer una educació del pacient per prevenir les infeccions respiratòries. Aquestes accions inclouen: interrompre l'hàbit tabàquic, en cas de que existeixi, administrar vacunes antigripals i antipneumocòcciques, incorporar una nutrició saludable amb suplementació de vitamina D³⁵ i mantenir una higiene bucal correcta³⁶.

El tractament amb farmacoteràpia té com a objectiu principal aturar els mecanismes patogenètics auto-perpetuants. Degut a què no existeix cap tractament específic, les principals estratègies són: augmentar l'eliminació de la mucositat, disminuir la inflamació pulmonar i erradicar les infeccions bacterianes³⁷.

Estratègies per l'eliminació de la mucositat

La fisioteràpia ha resultat ser efectiva en l'eliminació de l'acumulació de mucositat als pulmons, reduint així la inflamació pulmonar i disminuint els símptomes de la producció i acumulació diària d'esput³⁸⁻⁴⁰.

L'ús de fàrmacs mucolítics inhalats i d'agents hiperosmòtics permet fluidificar el moc i augmentar la hidratació pulmonar, respectivament, per tal de facilitar l'eliminació de la mucositat durant la fisioteràpia³⁰.

Fàrmacs antiinflamatoris

Tot i que l'ús de corticoesteroides i broncodilatadors inhalats està molt ben establert en altres patologies com la MPOC i l'asma⁴¹, en les bronquièctasis la seva aplicació és controvertida. Les guies clíniques només recomanen el seu ús quan el pacient pateix ofecs o comorbiditats amb la MPOC i l'asma^{37,42}. Tot i així, els corticoesteroides inhalats són molt utilitzats en la pràctica clínica.

El tractament amb atorvastatin no ha donat resultats consistents en diferents assajos clínics^{43,44}. Aquesta controvèrsia evidencia que encara no es coneix bé quin paper té la inflamació en el desenvolupament de les bronquièctasis. Com que la inflamació en aquests pacients és principalment d'origen neutrofilic, diversos assajos clínics es van centrar en reduir la quantitat de neutròfils pulmonars. Aquests estudis, però, no van obtenir una millora clínica significativa dels pacients infectats atès que reduint els neutròfils es pot suprimir la resposta inflamatòria durant un procés d'infecció bacteriana i augmentar la severitat de les infeccions^{45,46}. Per això, es creu que es necessiten teràpies que modulin la inflamació enlloc d'inhibir-la. Aquest és el cas de l'ús

d'un inhibidor de la neutròfil elastasa (NE), que ha donat bons resultats en un assaig clínic de fase II recentment publicat⁴⁷.

Antibiòtics

Els **macròlids** són els antibiòtics orals més utilitzats en les bronquièctasis per les seves propietats antibacterianes i antiinflamatòries⁴⁸. Són efectius contra un ampli espectre de bacteris Gram-positius, com els estreptococs i estafilococs, i tenen un cert grau d'activitat contra bacteris Gram-negatius, com l'*H.influenzae*. Sorprenentment, tot i que no tenen activitat bactericida contra *P.aeruginosa*, sí que poden modificar la seva virulència⁴⁹. Pel que fa als resultats, diversos estudis han demostrat que l'administració a baixes dosis de macròlids redueixen la freqüència de les aguditzacions en els pacients amb bronquièctasis⁵⁰⁻⁵³.

Els **antibiòtics inhalats**, com la tobramicina, la colistina i la gentamicina, disminueixen la càrrega bacteriana en els pacients amb infecció respiratòria, especialment causada per *P.aeruginosa*^{30,54}. Després d'obtenir resultats conflictius en quant a l'eficàcia del seu ús⁵⁵⁻⁵⁹, es va publicar un estudi que suggeria que l'efectivitat dels antibiòtics inhalats depenia de la presència d'una alta càrrega bacteriana⁶⁰.

2.1.2.3 Pronòstic

El pronòstic és molt variable atès que hi ha pacients que es mantenen amb unes bronquièctasis lleus durant molts anys i d'altres, que progressen molt ràpid, patint aguditzacions freqüents i un declivi accelerat de la funció pulmonar^{61,62}.

El risc de mortalitat en les bronquièctasis ve determinat per la relació entre l'edat, el dany pulmonar, la infecció respiratòria, l'activitat de la malaltia i les comorbiditats³⁰. Tenint en compte aquests factors, els pacients amb aguditzacions freqüents, amb alta càrrega simptomàtica, d'avançada edat, amb una gran extensió radiològica de les bronquièctasis i amb una infecció crònica, especialment causada per *P.aeruginosa*, són els pacients amb més probabilitats de progressar més ràpidament^{30,61}.

2.2 INFECCIÓ RESPIRATÒRIA BACTERIANA

Segons el moment i la simptomatologia que acompanya a les infeccions respiratòries bacterianes en els pacients amb MPOC i amb bronquièctasis, podem distingir dos episodis molt diferents entre ells però estretament relacionats: les infeccions respiratòries en fase d'estabilitat clínica i les aguditzacions.

2.2.1 Infecció respiratòria en fase d'estabilitat clínica

Una proporció significativa de pacients amb MPOC i amb bronquièctasis en fase d'estabilitat clínica presenten infecció respiratòria sense aguditzar la seva simptomatologia basal. Aquest episodi també es coneix com a colonització bronquial. Entre els factors de risc de patir infecció respiratòria es troben, principalment, un elevat grau d'obstrucció respiratòria i el manteniment de l'hàbit tabàquic⁶³.

En el cas dels pacients amb bronquièctasis, un dels factors que afavoreix la presència d'infecció respiratòria són les característiques de la seva mucositat. Es coneix que presenten un moc més dens que no s'elimina eficientment degut a la disfunció dels cilis de l'epiteli respiratori. Aquestes dues característiques, junt amb una resposta immune desregulada, afavoreixen la persistència de bacteris, produint així episodis d'infecció bacteriana que no impliquen canvis en la simptomatologia basal⁵⁴.

El diagnòstic d'infecció respiratòria en ambdues malalties es determina amb el resultat positiu del cultiu microbiològic convencional de mostres respiratòries pels següents bacteris: *Haemophilus influenzae* no tipificable (NTHi), *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus viridans*, *Moraxella catarrhalis* i *Staphylococcus aureus* a una concentració de més de 10^3 unitats formadores de colònies (ufc) per mil·lilitre^{37,64-66}. Dins d'aquest llistat de bacteris, l'aïllament d'algun d'ells en l'esput dels pacients s'associa amb una pitjor clínica.

En pacients amb MPOC, l'aïllament d'*H.influenzae* en l'esput s'associa a un major nombre de símptomes respiratoris i a major producció d'esput purulent durant els episodis d'aguditzacions⁶⁷. L'*H.influenzae* és un cocobacil Gram negatiu que colonitza

de manera no patogènica la nasofaringe però produeix una forta resposta inflamatòria quan es troba a les vies aèries baixes. Es classifica segons si presenta una càpsula polisacàrida, que pot ser de 6 tipus diferents (a-f) o si no té càpsula, com la NTHi¹³.

En pacients amb bronquièctasis, la presència de *P.aeruginosa* en l'esput s'associa amb una forta disminució de la funció pulmonar i amb un augment del risc de patir aguditzacions amb ingrés hospitalari i de la mortalitat. La *P.aeruginosa* és un bacteri Gram-negatiu que rarament causa infecció en individus immunocompetents però és considerat un dels principals patògens oportunistes en pacients que presenten alteracions en la resposta immune pulmonar. Es caracteritza per presentar flagel i pili, dos apèndixs mòbils que li confereixen motilitat per progressar cap a l'epiteli respiratori i disseminar-se a través d'aquest⁶⁸. La forta resposta inflamatòria que genera i la gran capacitat d'adaptar-se a tot tipus d'ambients, fa que sigui d'especial rellevància erradicar aquest tipus d'infecció en els pacients amb bronquièctasis^{69,70}.

La importància d'estudiar la infecció respiratòria en fase d'estabilitat clínica recau en l'associació que existeix entre la presència de patògens, el risc de desenvolupar aguditzacions posteriors i el pitjor pronòstic a curt i llarg termini^{71,72}.

2.2.2 Episodis d'aguditzacions

Les aguditzacions en la MPOC i en les bronquièctasis es defineixen com un empitjorament agut dels símptomes respiratoris (expectoració purulenta, dispnea, tos, mucositat i febre) que requereix medicació addicional i, fins i tot, ingrés hospitalari¹². Són una de les causes més importants de comorbiditats i mortalitat^{73,74}.

Es coneix que, sobretot les aguditzacions severes que requereixen ingrés hospitalari, són episodis de gran importància en la progressió de la malaltia, ja que s'associen amb un major deteriorament clínic, una qualitat pobre de vida i una major mortalitat^{75,76}. Per això, és d'elevada importància la seva predicció i prevenció. A més, també cal destacar l'elevat impacte econòmic que suposen les aguditzacions severes, així com les re-admissions a curt termini⁷⁷.

Els bacteris que s'aïllen més freqüentment durant les aguditzacions són *P.aeruginosa*, *H.influenzae*, *S.pneumoniae* i *M.catharralis*⁷⁸. Alguns d'aquest bacteris són comensals quan es troben a la nasofaringe o a la gola, però es converteixen en patogènics quan infecten les vies aèries baixes⁷⁹. L'aïllament de *P.aeruginosa* durant un episodi d'agudització, és d'especial rellevància ja que s'observa en un subgrup de pacients especialment sever. La seva presència empitjora de manera dramàtica el pronòstic del pacient^{80,81}.

Tot i que el principal agent causant de les aguditzacions són les infeccions bacterianes, també es poden produir per infeccions víriques i per agents del medi ambient com la pol·lució que provoquen una resposta immunològica desmesurada en el pacient⁷⁵. A més, està demostrat que, especialment a l'hivern, les aguditzacions són més severes ja que les infeccions víriques respiratòries estacionals agreugen el quadre clínic⁸².

Arrel de què en la pràctica clínica es troben pacients que aguditzen de manera freqüent i altres pacients que no aguditzen o almenys no ho fan de manera freqüent, van sorgir diversos estudis per conèixer l'impacte del nombre d'aguditzacions. Aquests van evidenciar que els pacients que l'any anterior havien patit 2 o més aguditzacions, anomenats aguditzadors freqüents (AF), tenien un empitjorament clínic i de la seva qualitat de vida. En canvi, aquells pacients que havien patit menys de 2 aguditzacions l'any anterior, anomenats aguditzadors no freqüents (NF), es comportaven de manera més favorable clínicament⁸³⁻⁸⁶. A més, s'ha demostrat que el pacient AF es caracteritza per una càrrega simptomàtica important, edat avançada, àmplia extensió radiològica de la malaltia i infecció crònica principalment per *P.aeruginosa*. Entre aquests factors de risc, sembla que el nombre d'aguditzacions freqüents seria el factor potencialment modificable per evitar l'empitjorament del pacient⁶¹. Per això, una de les principals línies de recerca en MPOC i bronquièctasis és la predicció i prevenció de les aguditzacions.

2.3 RESPOSTA IMMUNE INNATA PULMONAR EN LES INFECCIONS BACTERIANES

Els pulmons es troben contínuament exposats a la inhalació de microorganismes i contaminants potencialment patogènics. Per això, és essencial una correcta resposta immunitària, tant innata com adquirida. Quan aquesta resposta es desregula, provocant un context inflamatori exagerat, hi ha el risc de que es perpetui i produeixi dany al teixit pulmonar, deteriorament de les defenses de l'hoste i, conseqüentment, un augment de la susceptibilitat dels pulmons a patir infeccions bacterianes. Aquests no són esdeveniments aïllats sinó que formen part d'un cercle viciós, tal i com es descriu en la teoria de Cole, que dificulta la resolució de la infecció en un context d'inflamació crònica⁸⁷.

A continuació, es descriuran els mecanismes que formen part d'aquest cercle viciós en la MPOC i en les bronquièctasis, representats de manera general en la **Figura 4**.

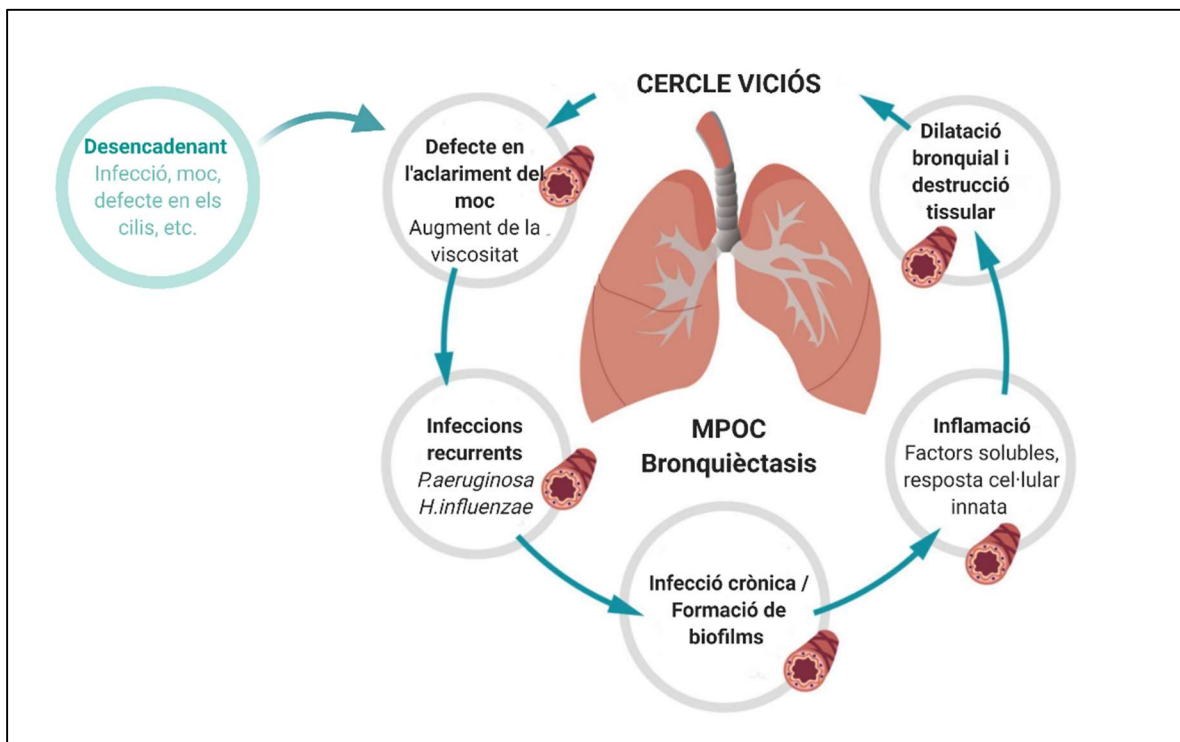


Figura 4. Teoria del cercle viciós de Cole en les malalties respiratòries cròniques (Adaptada de Synspira.com/therapeutic-areas/progressive-pulmonary-disease).

2.3.1 Alteracions en la barrera epitelial respiratòria

La barrera epitelial respiratòria es considera la primera línia de defensa immune innata pulmonar contra l'entrada de patògens. Està formada per la matriu extracel·lular (MEC) i per les cèl·lules epitelials respiratòries. A més, per reforçar el seu mecanisme protector, està recoberta per una capa mucosa fina i mòbil que contribueix a l'adhesió dels patògens i dels agents nocius.

Pel que fa a la MEC, aquesta és la xarxa de proteïnes amb característiques dinàmiques que envolta a les cèl·lules epitelials de tots els teixits humans. La seva composició canvia segons els factors externs o el dany epitelial. En el pulmó, durant condicions homeostàtiques, els principals components són els proteoglicans (heparan sulfat, perlecan i agrina), les glicoproteïnes solubles (vitronectina i fibronectina) i les proteïnes fibroses (col·lagen, elastina i laminina). Aquests components s'entrellacen entre ells per formar una xarxa robusta que doni suport a les cèl·lules epitelials⁸⁸. En les MRC, la composició de la MEC varia i es produeixen depòsits bronquials fibròtics, així com la pèrdua d'estructura epitelial. A més, quan es produeix dany tissular al pulmó, les proteïnes de la matriu extracel·lular de l'epiteli queden exposades als patògens i interaccionen amb elles per augmentar la seva adhesió i establir la infecció respiratòria⁸⁸ (**Figura 5**).

A nivell cel·lular, l'epiteli respiratori el formen les cèl·lules epitelials, els fibroblasts i les cèl·lules musculars llises. La seva composició cel·lular, però, varia al llarg de les vies aèries. Comença amb una organització pseudoestratificada en la tràquea, que és substituïda gradualment per un epiteli bronquial a mida que s'aproxima a les vies aèries baixes, i acaba en els bronquíols terminals amb la morfologia característica de sac dels alvèols, que contenen l'aire⁸⁹. En el cas de l'MPOC i les bronquièctasis, la bronquitis crònica característica d'aquests pacients afecta sobretot l'epiteli respiratori de les vies aèries petites, amb menys de 2 mm de diàmetre¹². En aquest tram, es distingeixen tres tipus principals: les cèl·lules basals, les cèl·lules secretores i les cèl·lules ciliades⁹⁰.

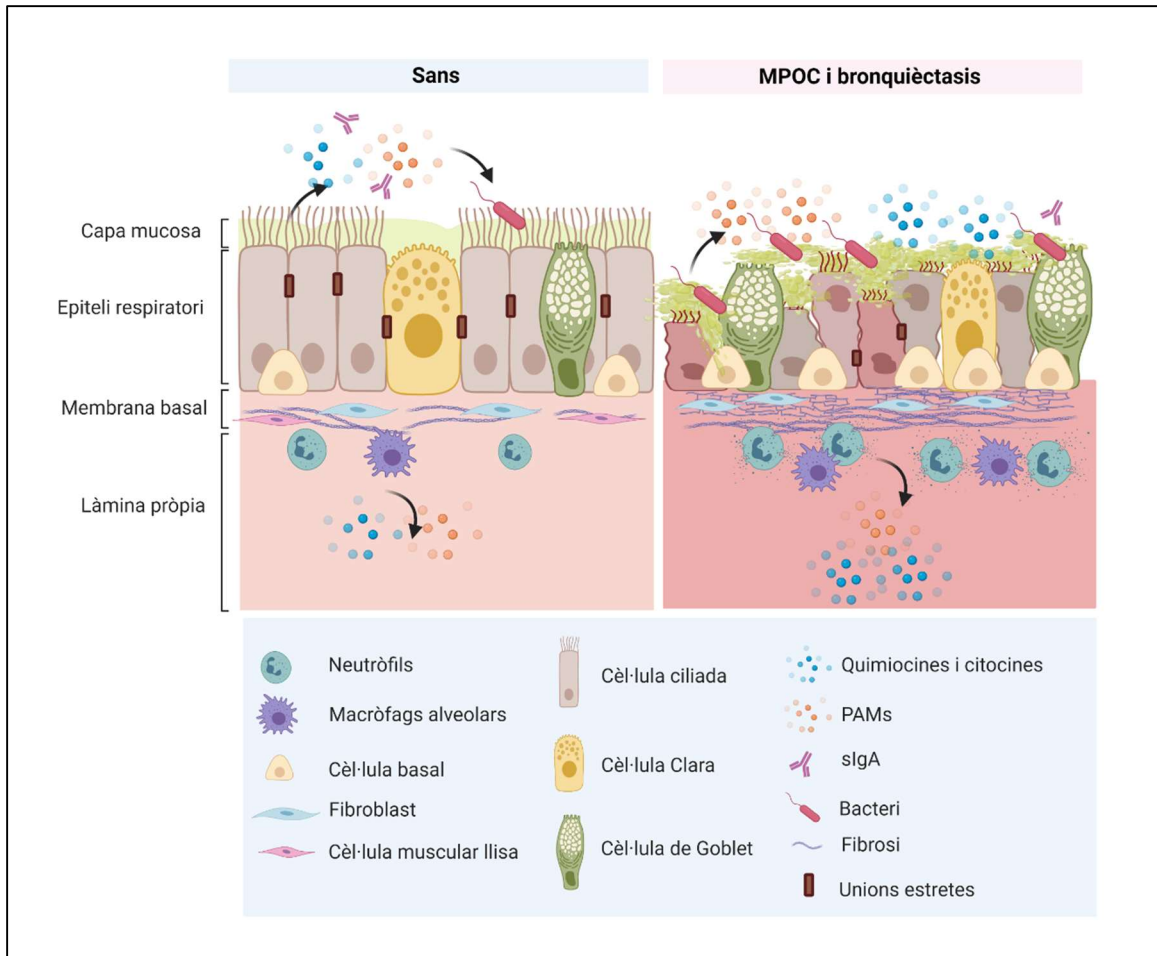


Figura 5. Comparativa de la composició de l'epiteli respiratori en persones sanes i en persones amb MPOC i bronquièctasis. La pèrdua d'estructura de l'epiteli respiratori i l'ambient inflamatori que es produeix durant la infecció bacteriana afavoreix la persistència dels bacteris i l'adhesió a les cèl·lules epitelials, donant lloc a infeccions cròniques i aguditzacions (Creatada amb *Biorender.com*).

Les cèl·lules basals són les cèl·lules que es troben adherides a la làmina basal de l'epíteli. No tenen contacte directe amb el lumen i són les progenitores de la resta de tipus cel·lulars epitelials. Es troben localitzades al llarg de tot l'epíteli, des de la tràquea fins als bronquíols terminals. En condicions patològiques, la hiperplàsia de les cèl·lules basals resulta en un augment de mida de l'epíteli bronquial⁹¹.

Les cèl·lules secretores i les ciliades són les que tenen contacte amb el lumen respiratori i, per tant, són les que reconeixen la presència de patògens. Es troben connectades entre elles per unions estretes per assegurar la permeabilitat selectiva de l'epíteli^{89,92}. Per un costat, les cèl·lules secretores es divideixen en diferents subtipus com les cèl·lules de Clara, de Goblet i les seroses. Aquestes són les encarregades de secretar tant de manera constitutiva com induïda mucines, molècules antimicrobianes, com els

PAMs i la immunoglobulina A (IgA), i molècules immunomoduladores, com les citocines i les secretoglobines. Totes aquestes molècules formen part de la composició del moc^{93,94}. S'ha de tenir en compte, que en pacients amb patologia respiratòria, el nombre de cèl·lules de Globet augmenta de manera significativa, i aquestes són les responsables de la hipersecreció de moc⁹⁵. Per l'altre, es troben les cèl·lules ciliades que són les encarregades de contribuir a la mobilització del moc. El moviment dels cilis està perfectament orquestrat per assegurar també que els patògens que entren a les vies aèries siguin transportats cap a la faringe per ser eliminats amb la tos. El dany ciliar i l'acumulació de moc són dues característiques que propicien l'aparició d'infeccions respiratòries en els pacients amb MPOC i amb bronquièctasis⁹⁶. S'han descrit múltiples factors que poden contribuir al dany dels cilis, com són els factors genètics⁹⁷, l'ambient inflamatori⁹⁸ i els factors de virulència d'alguns bacteris⁹⁹.

En la part terminal dels bronquíols es troben els alvèols, constituïts per les cèl·lules alveolars epitelials (AEC) que posseeixen característiques úniques degut a la seva localització. D'una banda, les AEC de tipus I són les encarregades de l'intercanvi gasós. Aquestes cèl·lules es disposen en una fina capa al voltant dels capil·lars pulmonars per crear una barrera de difusió dels gasos. De l'altra, les AEC de tipus II són les que serveixen com a progenitores de les AEC de tipus I i produeixen el surfactant pulmonar¹⁰⁰. Aquest surfactant serveix principalment per mantenir la tensió superficial alveolar entre la interfase aire-líquid. A més, dins del 10% de la seva composició proteica, es troben proteïnes de la família de les col·lectines, com les proteïnes del surfactant A (SP-A) i SP-D, amb un paper clau en la opsonització bacteriana i en la regulació de la producció de citocines, ROS i quimiocines^{101,102}. En la MPOC i en les bronquièctasis, es produeix l'apoptosi i la senescència de les AEC de tipus II, de manera que es produeixen alteracions en la reparació tissular i en les funcions immunes innates associades a SP-A i SP-D¹⁰³.

En condicions d'homeòstasi, la capa de moc que recobreix l'epiteli respiratori està formada pel 97% d'aigua i el 3% de sòlids com les mucines, els lípids, les sals i les restes cel·lulars. Això resulta en un moc poc viscos i poc elàstic fàcilment mobilitzable

pels cilis respiratoris. En condicions inflamatòries, la hipersecreció de mucines i la desregulació del volum de líquid de la superfície de l'epiteli fa que la concentració de sòlids incrementi fins al 15%, produint un moc molt viscos i elàstic que beneficia la persistència dels patògens sobre l'epiteli respiratori^{104,105}.

La infecció respiratòria s'inicia amb l'adhesió dels patògens als sucres microbians que es troben a la superfície de l'epiteli respiratori. En les persones sanes amb un correcte funcionament dels cilis i de l'eliminació del moc, aquests patògens adherits al moc serien expulsats ràpidament a l'exterior. En el cas dels pacients amb MPOC i amb bronquièctasis, diversos factors intervenen perquè es perpetui la infecció. En primer lloc, la deshidratació del moc proporciona unes propietats viscoses i elàstiques que causen una major adherència del moc a l'epiteli i, per tant, dels patògens que han quedat adherits al moc^{106,107}. L'increment de l'adherència junt amb els defectes en la motilitat dels cilis, dificulten la seva eliminació^{104,105}. En segon lloc, l'epiteli respiratori exposat al tabac i als productes bacterians presenta disruptcions en les unions estretes i alteracions en la reparació del dany epitelial^{108,109}. I per últim, aquests pacients presenten alteracions en la diferenciació de les cèl·lules basals i en la composició de la MEC. Això causa una excessiva remodelació tissular, que inclou la hiperplàsia de les cèl·lules de Goblet i la metaplàsia de les cèl·lules escamoses petites. El resultat final d'aquestes alteracions són la hipersecreció de moc, la deficiència de l'eliminació mucociliar i la obstrucció pulmonar que acaben afavorint l'establiment de la infecció respiratòria^{110,111}.

Durant la infecció respiratòria, el moc presenta un augment de cèl·lules inflamatòries infiltrants. Per tant, l'epiteli respiratori no es considera només una barrera mecànica sinó que també participa activament en el reclutament de neutròfils i monòcits cap al lloc de la infecció respiratòria, mitjançant la secreció de quimiocines i citocines pro-inflamatòries¹¹². En resposta a la presència de patògens, les cèl·lules epitelials també afavoreixen l'arribada cel·lular augmentant l'expressió de la integrina ICAM-1 per permetre l'adhesió i la transmigració dels leucòcits¹¹³.

L'arribada massiva de cèl·lules de la immunitat innata condueix a una activació descontrolada i a la secreció de mediadors inflamatoris que contribueixen a la destrucció epitelial. Entre els mediadors inflamatoris destaquen les metal·loproteases i les elastases, secretades principalment pels neutròfils, amb una acció directa en la destrucció i en l'acumulació de fibrosi en la barrera epitelial respiratòria^{114,115}. A la vegada, l'ambient inflamatori que es produeix durant el dany pulmonar provoca l'apoptosi de les cèl·lules epitelials a través de les proteases i de l'acció citotòxica directa de les cèl·lules *natural killer* (NK)¹¹⁶. Altres mecanismes de mort cel·lular que s'han descrit en les patologies respiratòries són la necroptosi¹¹⁷ i la ferroptosi induïda per l'exposició de les cèl·lules respiratòries al fum de tabac¹¹⁸. Aquests processos de mort es consideren altament inflamatòries degut a què alliberen una gran quantitat de *damage-associated molecular patterns* (DAMPs)¹¹⁹.

2.3.2 Resposta cel·lular

L'inici de la resposta efectora cel·lular es produeix amb el reconeixement de patògens en les vies aèries baixes, a través de l'expressió dels receptors de reconeixement de patrons (*Pattern recognition receptors*; PRRs) en les cèl·lules epitelials, en les endotelials i en les del sistema immune innat¹²⁰⁻¹²². Els *Toll-like receptors* (TLRs) són PRRs que s'activen en presència de patrons moleculars associats a patògens (*Pathogen-associated molecular patterns*; PAMPs) procedents dels patògens. Aquests són els responsables d'iniciar la senyalització intracel·lular a través de l'activació de la via *Nuclear factor kappa B* (NF- κ B)¹²⁰.

En la MPOC i en les bronquièctasis, es produeix una acumulació pulmonar de les cèl·lules de la resposta immune innata com són els neutròfils, els macròfags i els monòcits.

2.3.2.1 Neutròfils

Els neutròfils són els leucòcits més abundants en sang perifèrica, constituint fins al 70% del total. Tenen una vida mitja curta, aproximadament al voltant de 8 hores. En

condicions fisiològiques, es produeixen $1-2 \times 10^{11}$ neutròfils/dia, però en condicions d'infecció, es poden arribar a produir fins a 10^{12} ¹²³.

Es caracteritzen per tenir un nucli multilobular i un citoplasma granular, degut a la presència dels grànuls azurofílics (primaris), dels específics (secundaris) i dels que contenen la proteasa gelatinasa (terciaris), així com de les vesícules secretores. Aquests grànuls contenen múltiples proteïnes que faciliten la comunicació intercel·lular, la migració neutrofilica, l'activitat bactericida i la remodelació, reparació i degradació tissular. L'alliberació d'aquestes proteïnes està molt ben regulada per evitar la toxicitat i depèn dels estímuls inflamatoris de l'ambient en el qual es trobi el neutròfil¹²⁴.

La inflamació neutrofilica en les vies aèries és molt característica dels pacients amb MPOC¹²⁵ i amb bronquièctasis¹²⁶. S'observa tant en la fase estable dels pacients com en les infeccions respiratòries i aguditzacions, durant les quals augmenta de manera significativa la seva presència^{61,127}.

Durant la infecció respiratòria, els neutròfils circulants són reclutats als pulmons gràcies a la presència de factors quimiotàctics com el LTB₄, les quimiocines CXCL1, CXCL5, la interleucina-8 (IL-8) i el factor de necrosi tumoral alpha (TNF- α)¹²⁸. La migració neutrofilica és un procés regulat per esdeveniments interrelacionats i organitzats, que inclou canvis en l'expressió dels receptors de superfície, increment de la senyalització cel·lular i canvis en el citoesquelet dels propis neutròfils, de l'endoteli i de la matriu extracel·lular¹²⁹.

En condicions normals, una vegada arriben els neutròfils als pulmons, els patògens i mediadors inflamatoris els activen i els neutròfils exerceixen les seves funcions d'eliminació de patògens: la desgranulació, la fagocitosi i la producció d'espècies reactives d'oxigen i de trampes extracel·lulars (*Neutrophil extracellular traps*; NETs)¹¹³ (**Figura 6**).

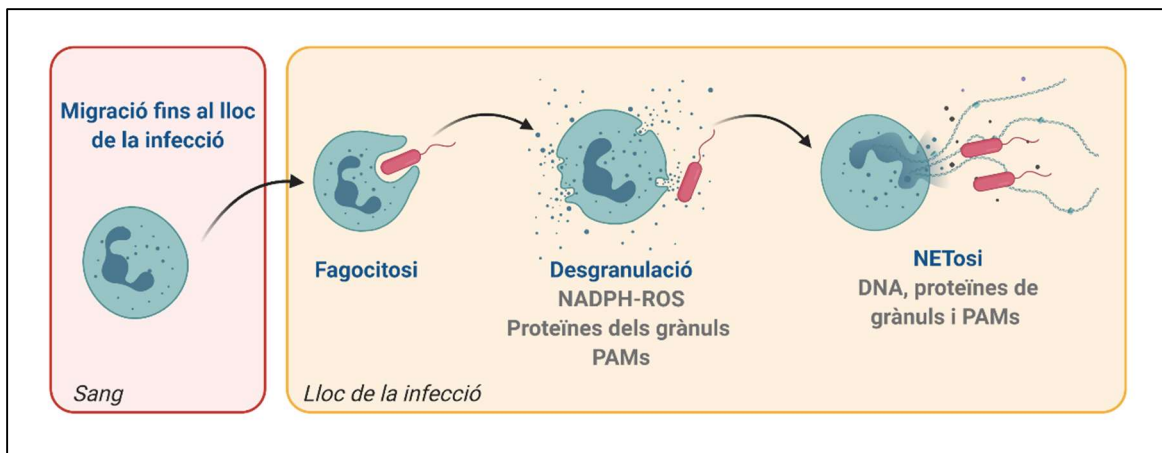


Figura 6. Funcions dels neutròfils durant les infeccions bacterianes. El primer pas en una infecció bacteriana és la migració de neutròfils circulants des de la sang fins al lloc de la infecció. Un cop allà, els neutròfils són capaços d'eliminar els bacteris a través dels processos de fagocitosis, desgranulació i NETosi (Creatada amb Biorender.com).

En el cas de les bronquièctasis i de la MPOC, l'arribada massiva de neutròfils ve seguida d'una activació descontrolada. A més, en les vies aèries d'aquests pacients existeixen factors que afavoreixen la supervivència dels neutròfils i allarguen la seva vida mitja i mantenen més temps les seves funcions. D'aquesta manera, però, també es manté el dany que produeix la seva activació^{126,130}.

Durant la desgranulació, els neutròfils continuen produint IL-8, de manera que més neutròfils continuaran migrant al lloc de la infecció i s'amplificarà la resposta inflamatòria¹³¹. També contribueixen a la destrucció del teixit pulmonar amb la secreció de proteases com la NE, la catepsina G, la proteïnasa-3, la MMP-8 i la MMP-9. Una altra funció que se'ls ha atribuït a les proteases, en concret a la NE, la catepsina G i la proteïnasa-3, és l'estimulació de les glàndules submucoses i les cèl·lules de Goblet per contribuir en la hipersecreció de moc i, consegüentment, en la obstrucció pulmonar⁹⁰. Tot i que el sistema immune també compta amb la presència d'inhibidors de proteases per limitar l'activitat d'aquestes, en la MPOC i en les bronquièctasis es produeix un desequilibri de l'activitat proteasa. L'excés de proteases i la inactivació dels seus inhibidors afavoreix el dany de l'epiteli respiratori, alenteix el moviment dels cilis i promou la secreció de moc^{61,132,133}.

Una de les característiques més importants en la MPOC i en les bronquièctasis és que, tot i l'abundància de neutròfils en les vies aèries, aquestes cèl·lules són incapaces

d'eliminar la infecció respiratòria¹²⁴. Aquest fet s'explica per la disfunció que presenten aquests neutròfils i s'ha demostrat que pot estar produïda per diferents mecanismes. Es coneix que la NE i les defensines alliberades pel neutròfil durant la desgranulació, poden inhibir la fagocitosi a través del tall dels receptors de superfície necessaris per detectar la presència dels bacteris. Aquests receptors són els Fcγ i els receptors del sistema del complement, en concret el Fcγ RIIB (CD16), Fcγ RIIA (CD32), el receptor del complement 1 (CD35) i el receptor del complement 3 (CD11b/CD18). Els receptors Fcγ reconeixen els microorganismes que han de fagocitar perquè estan opsonitzats per IgG. En canvi, els receptors del complement 1 reconeixen els components del sistema del complement C3b/C4b dipositats sobre la superfície dels microorganismes, mentre que els receptors del complement 3 reconeixen el component iC3b¹¹³. En aquests pacients, la NE pot tallar aquests components del sistema del complement, de manera que no es produeix la opsonització dels bacteris i, conseqüentment, no s'activa el sistema del complement correctament^{134,135}. L'ambient inflamatori també produeix una disfunció de la senyalització intracel·lular durant la fagocitosi^{134,136}.

Un cop els patògens han estat fagocitats pels neutròfils, es produeix la desgranulació i l'alliberació de ROS en l'interior dels fagolisosomes per contribuir en l'activitat bactericida. En aquest procés, el sistema *Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate* (NADPH) oxidasa actua com a un canal que permet el pas d'electrons des del citosol fins el fagolisosoma, estimulando la reducció de O₂ en l'anió superòxid O₂⁻¹³⁷. Quan es produeix una resposta inflamatòria exagerada, l'estrès oxidatiu causat pels neutròfils en les vies aèries es converteix en un dels principals causants del dany epitelial^{138,139}.

La última funció que pot exercir el neutròfil en un context d'infecció respiratòria és la NETosi¹⁴⁰. Els neutròfils són capaços de generar NETs per atrapar diversos microorganismes com bacteris Gram-negatius¹⁴¹, bacteris Gram-positius¹⁴² i fongs¹⁴³. Les NETs són estructures de cromatina descondensada amb productes bactericides units com mieloperoxidasa (MPO), catepsines i histones nuclears¹⁴¹. En els pacients amb MPOC i amb bronquièctasis, s'ha observat un augment de NETosi a nivell

pulmonar, que s'incrementa encara més durant les infeccions respiratòries i les aguditzacions^{116,144}. Aquesta disfunció també contribueix al dany epitelial que presenten aquests pacients.

2.3.2.2 Monòcits i macròfags alveolars

Els monòcits són cèl·lules circulants en la sang perifèrica, en la medul·la òssia i en la melsa, que constitueixen el 10% del total dels leucòcits. La seva vida mitja en sang és entre 1 i 2 dies. Si en aquest temps no són reclutats a l'interior d'algun teixit per convertir-se en macròfags, moren i són eliminats de la sang. Es caracteritzen per tenir un nucli ovalat i vesícules i grànuls citoplasmàtics que contenen lisosomes, vacuoles fagocítiques i filaments esquelètics¹⁴⁵.

L'àmplia expressió de receptors, tant en la seva superfície com intracel·lularment, converteix als monòcits en cèl·lules clau durant l'activació de la resposta immune innata¹⁴⁶. El factor *macrophage colony-stimulating factor* (M-CSF) és clau per la supervivència dels monòcits circulants, ja que potencia la seva capacitat fagocítica i la secreció de citocines. Per això, els monòcits madurs expressen en la seva superfície el receptor del *macrophage colony-stimulating factor* (M-CSFR).

En condicions d'homeòstasi, el M-CSF produït per les cèl·lules de l'estroma i dels teixits indueix la diferenciació de monòcit a macròfag¹⁴⁷. En canvi, en un context inflamatori, aquesta diferenciació està controlada pel factor *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF), que genera macròfags de tipus inflamatori¹⁴⁸. En els pacients amb malalties respiratòries, algunes de les alteracions en les funcions dels macròfags alveolars, com la fagocitosi, també s'han observat en els monòcits circulants. Aquestes troballes evidencien que, en alguns casos, els defectes funcionals cel·lulars no són només deguts a l'exposició dels macròfags alveolars, a les toxines i a l'ambient inflamatori del pulmó, sinó que ja hi són de base a les cèl·lules d'aquests pacients¹⁴⁹.

Els macròfags són les cèl·lules que resideixen en els teixits humans, on poden representar fins al 10-15% del total de cèl·lules en condicions de quiescència¹⁴⁵. En

canvi, en patologies respiratòries com la MPOC i les bronquièctasis, el nombre de macròfags s'incrementa respecte al total de cèl·lules^{150,151}.

En el pulmó es diferencien dos tipus de poblacions de macròfags. Per una banda, els macròfags alveolars són els que resideixen a les vies aèries del pulmó. Per l'altra banda, els macròfags intersticials són els que es troben en l'espai intersticial entre els alvèols i els vasos sanguinis (**Figura 7**).

En quant a les característiques morfològiques, els macròfags alveolars són més grans que els intersticials¹⁵². A nivell fenotípic també són diferents: els macròfags alveolars es descriuen com a CD45⁺CD206⁺CD14^{lo}CD71⁺CD169⁺, mentre que els intersticials són CD45⁺CD206⁺CD14^{hi}CD71⁻CD169⁻¹⁵³. Dins dels macròfags alveolars, però, també podem trobar diverses poblacions en funció, per exemple, de l'expressió del receptor *scavenger* del complex hemoglobina-haptoglobina CD163¹⁵⁴.

Funcionalment, els macròfags intersticials es consideren els moduladors de la resposta adaptativa¹⁵⁵. En canvi, els macròfags alveolars són els que eliminen les restes cel·lulars i bacterianes¹⁵⁶, supprimeixen la resposta adaptativa¹⁵⁷ i regulen el reclutament de neutròfils i de monòcits cap al pulmó¹⁵⁸. Tot i que les dues poblacions presenten capacitat fagocítica, els macròfags alveolars són els fagòcits més potents¹⁵⁹. A més, són els macròfags més sensibles per les senyals als PRRs¹⁵². Però, de la mateixa manera que succeeix en els neutròfils dels pacients amb MPOC i amb bronquièctasis, els seus macròfags alveolars també són menys eficients en la fagocitosi dels patògens^{149,160}.

Una de les funcions claus dels macròfags alveolars és l'esferocitosi. Mitjançant aquest mecanisme, els macròfags alveolars eliminen les cèl·lules apoptòtiques, sobretot els neutròfils i les cèl·lules epitelials, de l'entorn respiratori, per tal de resoldre el procés inflamatori. Però, quan més temps aquestes cèl·lules mortes romanguin a les vies aèries, major serà la inflamació causada per la contínua alliberació de productes de la desgranulació i per l'evolució cap a processos de necrosi secundària. Això és el que succeeix en les vies aèries dels pacients amb MPOC i bronquièctasis, ja que presenten una esferocitosi deficient^{161,160}. Es coneix que la NE està implicada en aquesta alteració

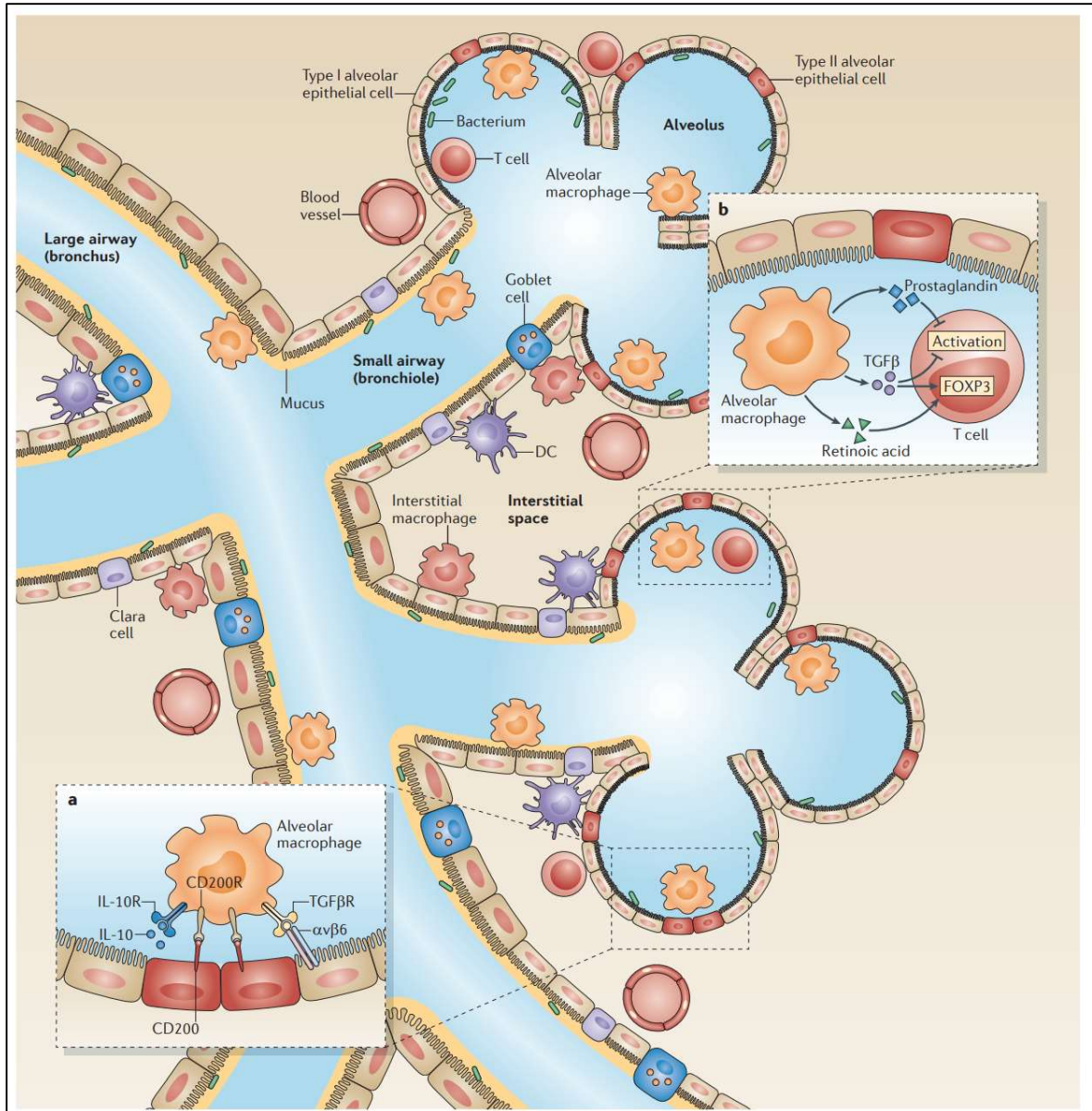


Figura 7. Interacció dels macròfags alveolars i intersticials en els pulmònics sans. Els macròfags alveolars es troben als espais aeris juxtaposats amb les cèl·lules epitelials alveolars de tipus I i tipus II. Els macròfags intersticials es troben a l'espai intersticial entre l'alveol i els vasos sanguinis, on també es troben les cèl·lules T, les cèl·lules dendrítiques i una escassa població de cèl·lules B. **(a)** L'epiteli respiratori regula als macròfags alveolars a través de la interacció amb CD200, amb TGF- β i amb IL-10. **(b)** La secreció de TGF- β i àcid retinoic pels macròfags alveolars pot induir l'expressió de FoxP3 en les cèl·lules T presents al lumen de les vies respiratòries (Hussell T. *Nat Rev Immunol.* 2014).

funcional, ja que elimina els receptors de fosfatidilserina necessaris per reconèixer a les cèl·lules apoptòtiques de la superfície dels macròfags¹⁶². Com a teràpia, sembla que, en concret en els pacients amb bronquièctasis, la proteïna d'unió a la vitamina D (VDBP) ajudaria a restablir la funció de l'eferocitosi¹⁶³. També s'han publicat estudis en els quals el tractament amb macròlids millora la fagocitosi de les cèl·lules apoptòtiques a través de l'increment de l'expressió dels receptors de manosa¹⁶⁴.

Tant els monòcits com els macròfags alveolars són grans productors de les MMP-1, -2, -7, -9 i -12, així com de les catepsines K, L, B i S^{165,166}. Aquestes proteases també tenen la particularitat de tallar les proteïnes petites i exposar els fragments quimiotàctics, o actuar elles mateixes com a quimioattractants per tal de perpetuar l'acumulació de macròfags al pulmó^{167,168}. En la MPOC i les bronquièctasis, aquests tipus cel·lulars també participen en el desequilibri de l'activitat proteasa. En concret en la MPOC, la progressió de la malaltia es correlaciona amb l'activació persistent dels macròfags alveolars i amb els canvis en l'equilibri entre les proteases secretades i els seus inhibidors¹⁶⁹.

2.3.3 Factors solubles pulmonars involucrats en la resposta innata

Com a conseqüència dels infiltrats cel·lulars al lumen i a la paret de les vies aèries del parènquima pulmonar, es produeix un increment de factors solubles involucrats en el reclutament cel·lular, en la resposta inflamatòria i en la remodelació tissular.

2.3.3.1 Mediadors inflamatoris claus durant la infecció respiratòria

Diversos mediadors inflamatoris, incloent les quimiocines, les citocines i les proteases d'origen leucocitari, es troben presents a nivell pulmonar durant la infecció respiratòria causada per *H.influenzae* i per *P.aeruginosa* (**Figura 8**). Encara que aquests mediadors actuen en xarxes interactives complexes, en les MRC destaquen principalment la quimiocina IL-8, pel seu efecte atraient sobre els neutròfils; la citocina TGF- β , pel seu paper en la inflamació generada a partir de processos de fibrosi pulmonar; i les proteases leucocitàries, per la seva contribució a la pèrdua d'estructura de l'epiteli respiratori.

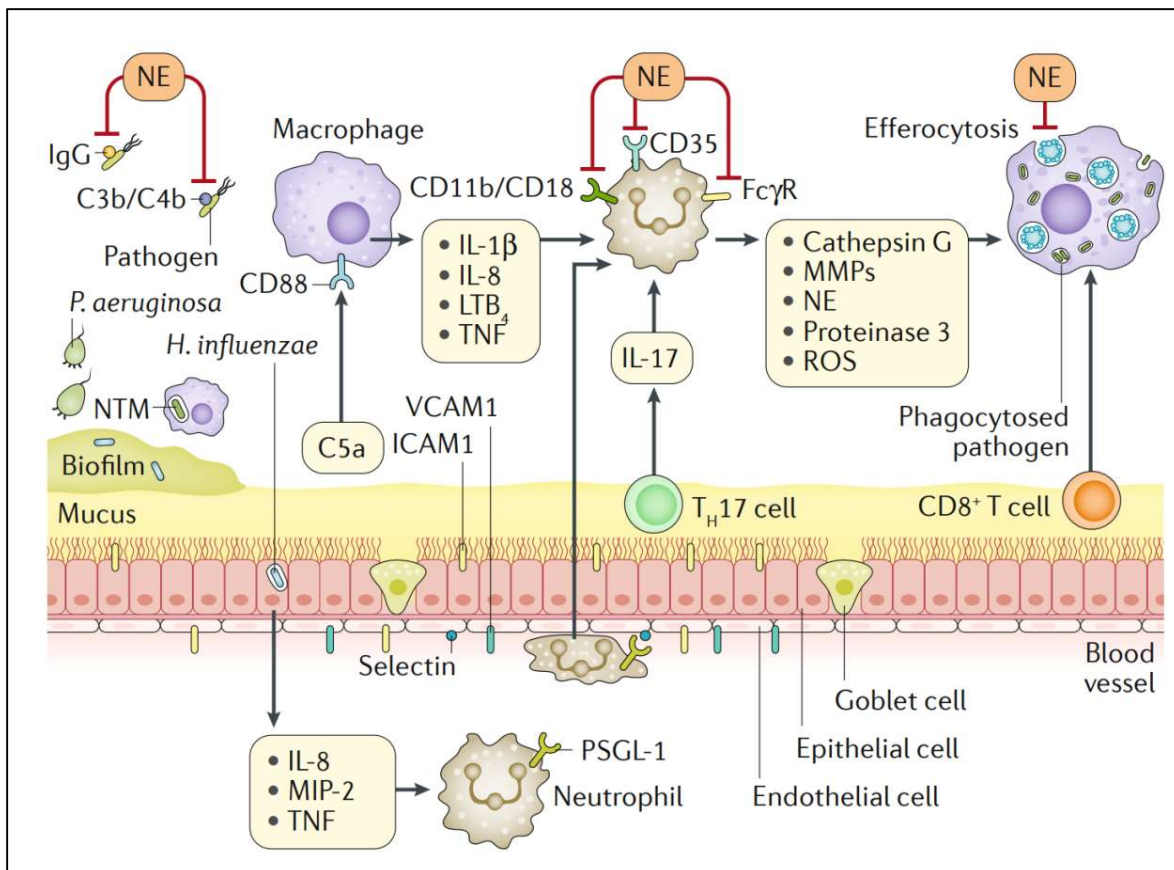


Figura 8. Mediadors inflamatoris produïts durant la infecció bacteriana. L'epiteli respiratori recluta els neutròfils a través de la secreció de senyals pro-inflamatòries (IL-8, proteïna 2 inflamatori del macròfag (MIP-2) i TNF- α) i augmenta l'expressió de les molècules d'adhesió (ICAM1) i (VCAM1). La molècula del complement C5a estimula l'alliberació de IL-8, TNF- α , IL-1b i LTB₄, que produeixen el reclutament de neutròfils. Un cop arriben al pulmó, els neutròfils desgranularan alliberant proteases i ROS, que contribuiran a la inflamació pulmonar i destrucció epitelial (Chalmers JD. *Nat Rev Dis Primers.* 2018).

2.3.3.1.1 IL-8

La quimiocina IL-8, o també denominada CXCL8, és d'especial rellevància en la MPOC i en les bronquièctasis per l'efecte d'atracció i activació dels neutròfils al lloc de la infecció respiratòria¹⁷⁰.

La IL-8 és produïda per una varietat de cèl·lules, incloent els mateixos neutròfils, monòcits, eosinòfils, basòfil, fibroblasts, macròfags alveolars, cèl·lules epitelials bronquials, cèl·lules endotelials de la microvasculatura pulmonar i cèl·lules del múscul llis respiratori¹⁷⁰. La seva secreció es produeix davant de citocines pro-inflamatòries, com TNF- α i IL-1 β , de bacteris, de virus i dels productes bacterians i vírics¹⁷¹. La presència d'aquests estímuls incrementa els nivells de IL-8 en els BALs i en els esputs

dels pacients amb MPOC i bronquièctasis amb infecció respiratòria¹⁷¹. A més, els factors ambientals, com condicions hipòxiques i la presència de ROS també poden induir la producció de IL-8 per part de diversos tipus cel·lulars¹⁷¹.

L'efecte l'exerceix gràcies als seus principals receptors de la superfície dels neutròfils: CXCR1 i CXCR2¹⁷². Aquests receptors són molècules unides a la membrana cel·lular formades per set dominis transmembrana i acoblades a proteïnes G en la porció COOH-terminal¹⁷¹. Tot i que els dos receptors poden unir la IL-8 amb una gran afinitat, també són receptors per altres quimiocines. Mentre el CXCR1 només interacciona amb la proteïna quimiotàctica del granulòcit (*Granulocyte chemotactic protein 2*; GCP-2), el CXCR2 pot unir l'oncogen α relacionat amb creixement (*Growth-regulated oncogene α* ; GRO- α), el pèptid-2 activador de neutròfil (*Neutrophil-activating peptide 2*; NAP-2), el pèptid-78 activador de neutròfil derivat de les cèl·lules epitelials (*Epithelial neutrophil-activating protein 78*; ENA-78) i la GCP-2¹⁷⁰. Una altra diferència entre els dos receptors és la seva sensibilitat a les concentracions de IL-8. El CXCR2 respon a concentracions de picomolars de IL-8, per tal d'atreure els neutròfils que es troben més allunyats del lloc de la infecció. En canvi, el CXCR1 detecta altes concentracions de IL-8 com les que es troben en el lloc de la infecció, per tal de contribuir en l'activació del neutròfil¹⁷⁰.

Un cop la IL-8 interactua amb un dels seus receptors, s'inicia el flux de calci intracel·lular i l'activació de la cinasa fosfatidilinositol-3¹⁷⁰. Els receptors s'internalitzaran i es reciclaran per reparèixer en la membrana cel·lular ràpidament, aproximadament als 60 minuts des de la interacció amb el lligand¹⁷¹. A través de la cascada de senyalització intracel·lular, la IL-8 activarà el neutròfil per exercir alguna de les seves funcions, com la desgranulació i l'esclat oxidatiu¹⁷³.

En pacients amb MPOC i bronquièctasis, els nivells pulmonars de IL-8 correlacionen amb la presència de neutròfils i amb els marcadors de la seva activació, com la MPO i l'elastasa^{174,175}. En quant a la clínica, nivells elevats de IL-8 s'associen amb menor FEV₁, infeccions respiratòries i aguditzacions¹⁷¹.

En resum, degut a què els bacteris indueixen la producció de IL-8, durant les infeccions respiratòries en els pacients amb MPOC i bronquièctasis, es produeix un increment dels nivells de IL-8 que contribueixen en la migració i activació de neutròfils en el lloc de la infecció.

2.3.3.1.2 TGF- β

La família del factor de creixement transformant β (TGF- β) regula processos claus en la patogènesi de la MPOC i de les bronquièctasis, com són el desenvolupament pulmonar, la inflamació, el dany i la reparació tissular¹⁷⁶. L'increment dels nivells pulmonars de TGF- β és el responsable de l'acumulació de fibrosi al voltant de les vies aèries petites d'aquests pacients, contribuint així a l'obstrucció de manera progressiva i irreversible¹⁷⁷.

Existeixen tres isoformes del TGF- β (TGF- β 1, 2 i 3) amb funcions similars però amb característiques úniques i receptors específics¹⁷⁶. Mentre que el TGF- β 1 està implicat en el desenvolupament pulmonar, el TGF- β 2 i 3 s'expressen a l'epiteli bronquial i la seva presència és clau per mantenir la correcta estructura de l'epiteli i la transició epiteli-mesènquima¹⁷⁸⁻¹⁸⁰. La major part del TGF- β secretat forma part d'un gran complex latent (LLC) format pel pèptid associat a latència (*Latency-associated peptide; LAP*) i les proteïnes d'unió al TGF- β latent (*Latent transforming growth factor β binding proteins; LTBPs*). Per alliberar la forma activa de TGF- β , és necessària la interacció de la LTBP-1 amb les integrines de la MEC. Aquesta interacció produeix una deformació en LAP i aconsegueix alliberar la forma activa de TGF- β ^{181,182}.

Les tres isoformes de TGF- β es continuen expressant a nivell pulmonar en els adults sans en les cèl·lules epitelials, en els macròfags alveolars, en els fibroblasts i en les cèl·lules del múscul llis respiratori¹⁸³. En les malalties pulmonars, es produeix un augment de l'expressió de TGF- β degut a l'increment dels tipus cel·lulars mencionats prèviament. El TGF- β produeix canvis patològics en els pulmons d'aquests pacients promovent la hiperplàsia de les cèl·lules de Goblet, la fibrosi subepitelial, el dany epitelial i la hipertròfia del múscul llis respiratori¹⁸³.

L'expressió de TGF- β està involucrada en la resposta inflamatòria pulmonar que augmenta enfront diversos estímuls inflamatoris. La NE induïx la secreció i l'activació del TGF- β 1 i aquest, a la vegada, inhibeix l'expressió de IL-10 en les cèl·lules immunitàries per tal de mantenir la resposta pro-inflamatòria¹⁸⁴. Tot i que els neutròfils no tenen la capacitat de secretar TGF- β , aquest sí que participa en el seu reclutament cap als pulmons, contribuint d'aquesta manera a la inflamació neutrofilica que pateixen aquests pacients. D'aquesta manera, es creu que el TGF- β interfereix en la resposta innata durant les infeccions respiratòries augmentant la inflamació pulmonar i reduint l'eliminació bacteriana¹⁸⁵.

2.3.3.1.3 Proteases

Quan els neutròfils s'activen en el lloc de la infecció respiratòria, secreten una gran quantitat de proteases, com són la NE, la catepsina G i la proteïnasa-3¹⁸⁶. Després d'una estimulació, principalment per TNF- α i IL-1 β , els neutròfils també secreten metal·loproteases de la matriu (MMPs).

Pel que fa a la NE, és un dels enzims proteolítics fisiològics, de la família de les serin proteases, necessari pel correcte funcionament dels neutròfils i involucrat en la resposta inflamatòria¹⁸⁷. La NE és una proteasa que destrueix la matriu extracel·lular i modula la inflamació i la remodelació tissular. El seu efecte inflamatori pot ser directe, a través del dany tissular, o indirecte, mitjançant la inducció de citocines pro-inflamatòries com la IL-6, la IL-8 i el GM-CSF^{162,187,188}.

La NE talla directament diversos receptors cel·lulars implicats en la iniciació de respostes innates claus durant la infecció respiratòria. En primer lloc, inhibeix directament la fagocitosi a través del tall dels receptors fagocítics Fc γ (CD16 i CD32)¹⁸⁹. En segon lloc, talla alguns dels components de superfície del sistema del complement (CD35 i CD11b/CD18) per evitar la opsonització i l'activació del complement¹⁸⁹. A més, actua contra els components del complement (C3b/C4b i iC3b) i contra la IgG units a patògens¹⁹⁰. Per últim, també talla els receptors de fosfatidilserina dels macròfags, que són claus pel reconeixement de les cèl·lules

apoptòtiques, principalment els neutròfils pulmonars. Quan aquest procés d'eliminació dels neutròfils morts, anomenat esferocitosi, no es produeix correctament, resulta en un augment de la inflamació i del dany a través de l'alliberació desregulada de productes dels grànuls neutrofilics i de la conversió de les cèl·lules apoptòtiques cap a la necrosi secundària¹⁶².

En condicions normals, l'acció de la NE és inhibida per les antiproteases endògenes, com l' α 1-antitripsina i la *Secretory Leukocyte Protease Inhibitor* (SLPI), per mantenir un correcte equilibri de l'activitat proteasa (**Figura 9**). En canvi, en un context d'inflamació crònica, com en la MPOC i en les bronquièctasis, la gran activitat proteasa que es produeix per l'arribada i activació contínua de neutròfils al pulmó, indueix la degradació dels inhibidors de proteases⁶². El desequilibri que es produeix entre la quantitat de proteases i d'inhibidors contribueix en el dany tissular, en l'alentiment de la mobilitat dels cilis i en la producció de moc¹⁹¹.

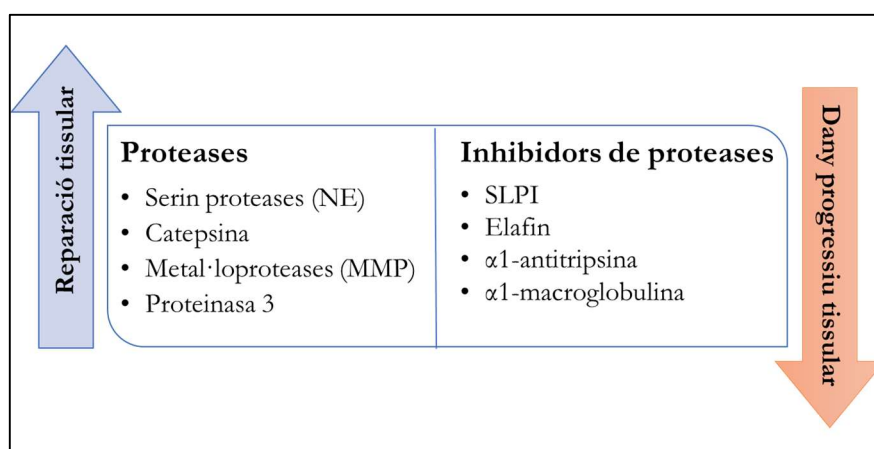


Figura 9. Equilibri de l'activitat proteasa. Entre les proteases més abundants al teixit pulmonar es troben les de la família de les serin proteases, com la NE, les catepsines, les MMP i la proteïnasa 3. L'excés d'aquestes produeix reparació tissular. Per controlar l'equilibri, són essencials els inhibidors de proteases, entre els quals destaquen l'SLPI, l'elafin, l' α 1-antitripsina i l' α 1-macroglobulina. La seva presència evita el dany progressiu tissular produït per elevats nivells de proteases.

Els nivells pulmonars de NE correlacionen amb la presència de neutròfils en mostres respiratòries, amb els nivells de citocines pro-inflamatòries (IL-8 i TNF- α) i amb marcadors d'activitat de la malaltia com és el volum d'esput que expectora un pacient al llarg de 24 hores¹⁹². En les bronquièctasis, s'ha arribat a plantejar la concentració de la NE com a marcador pronòstic d'aguditzacions^{54,62}.

Respecte a les **MMPs**, aquestes són les proteases que s'encarreguen de degradar la MEC per mantenir una correcta remodelació epitelial. En humans existeixen 24 MMPs diferenciades segons l'especificitat pel tipus de substrat¹⁹³. A part de la MEC, altres dianes de les MMPs al pulmó són els factors de creixement, quimiocines, proteases i proteïnes de la superfície cel·lular, com les molècules d'adhesió¹⁹³.

De la mateixa manera que en la resta de proteases, l'expressió de les MMPs en el pulmó està altament regulada per evitar danys colaterals del teixit. En la MPOC i en les bronquièctasis, també es produeix un desequilibri entre la quantitat de MMPs i els seus inhibidors (*Tissue inhibitors of metalloproteinases*; TIMPs). Aquest desequilibri és el responsable de la destrucció pulmonar i dels canvis fibròtics que caracteritzen a aquestes malalties¹⁹³.

Tant les MMPs com els TIMPs són produïts per una gran varietat de tipus cel·lulars com són els neutròfils, les cèl·lules epitelials, els fibroblasts i els macròfags alveolars¹⁹⁴. A més, també hi ha molècules que poden regular l'activitat de les MMPs, com són les proteïnes presents en el surfactant pulmonar¹⁹³. En concret, la SP-D incrementa la secreció de MMP-1, MMP-3, i MMP-12 en els macròfag alveolars. S'ha vist que aquest increment és independent de la presència de IL-1 β i TNF- α , que també actuen com a dos potents inductors de les MMPs¹⁹⁵.

En condicions normals, els nivells pulmonars de MMPs són baixos. En canvi, durant un context inflamatori, els nivells pulmonars incrementen, sobretot dels tipus MMP-7, MMP-8, MMP-9 i MMP-12¹⁹³. Alguns dels estímuls que indueixen aquest increment són la presència de bacteris, el context d'estrès oxidatiu produït per l'alliberació massiva de ROS i agents externs nocius com el tabac¹⁹³. La presència de MMPs es troba estretament relacionada amb la fibrosi pulmonar que presenten els pacients amb MPOC i amb bronquièctasis, degut al dany tissular. De la mateixa manera que en el cas de la NE, els nivells pulmonars de MMPs van associats a la presència de neutròfils en aquestes malalties, en concret, les MMP-8 i MMP-9¹⁹⁵. A més, les concentracions de MMP-12 es relacionen amb els macròfags alveolars durant el seu reclutament cap al pulmó¹⁹³.

2.3.3.2 Proteïnes i pèptids antimicrobians (PAMs)

El fluid que recobreix l'epiteli conté una gran varietat de proteïnes i PAMs, que actuen com a antibiòtics naturals i formen part de la primera línia de defensa pulmonar. Estan produïts per les glàndules submucoses, les cèl·lules epitelials, els neutròfils i els macròfags¹⁹⁵.

Aquestes no només tenen activitat bactericida sinó que també presenten propietats inflamatòries i de regeneració tissular (**Figura 10** i **Taula 3**). És per aquest motiu que s'ha associat l'alteració dels nivells de PAMs amb la patogènesi de diverses malalties respiratòries¹⁹⁶.

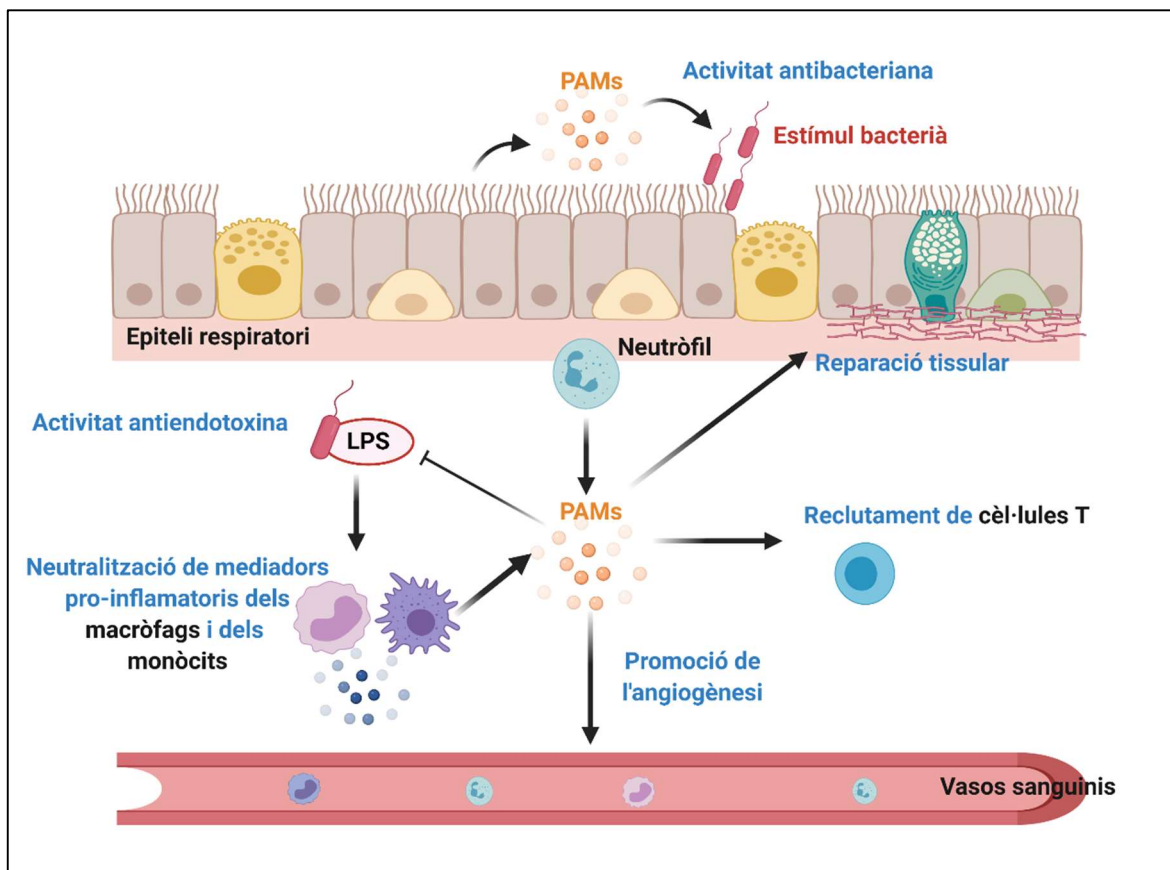


Figura 10. Múltiples funcions dels PAMs en la defensa de l'hoste. Els PAMs poden induir una varietat de respostes en les cèl·lules immunes innates. La immunomodulació dels PAMs resulta en la protecció contra la infecció, el control de la inflamació, l'estimulació de la reparació tissular i la iniciació de la resposta immune adaptativa. (Adaptada de Lai Y. *Trends in Immunology*. 2009. Creada amb Biorender.com).

La seva producció pulmonar està altament regulada pel que fa al tipus cel·lular que els secreta i al moment en el qual s'alliberen. Poden produir-se de manera constitutiva i

incrementar els seus nivells amb l'exposició a patògens, el dany epitelial, les citocines, els factors de creixement produïts durant la reparació tissular o els nutrients com la vitamina D. Tot i que poden compartir l'activitat bactericida, sovint els PAMs són actius per diferents patògens en diferents localitzacions del cos humà i amb diferents mecanismes d'acció¹⁹⁷. Degut a la gran varietat de PAMs, no existeix encara cap classificació acceptada però s'agrupen segons la mida, l'estructura conformacional o els aminoàcids predominants¹⁹⁶. Segons les seves característiques estructurals i biològiques, es distingeixen dues famílies principals detectades en les secrecions respiratòries: les defensines i les catelicidines.

Dins de les defensines, es troben les α - i les β -defensines. Les α -defensines inclouen els pèptids que es troben als grànuls azurofílics dels neutròfils (HNP 1-4). Un cop el neutròfil fagocita el microorganisme, les α -defensines contribueixen a la seva eliminació a través de mecanismes independents d'oxigen¹⁹⁸. Pel que fa a les β -defensines, la β -defensina 1 i 2 són les que s'expressen de manera constitutiva a les cèl·lules epitelials del tracte respiratori^{199,200}. També poden ser produïdes pels monòcits, pels macròfags i per les cèl·lules dendrítiques²⁰¹.

Pel que fa a la família de les catelicidines, la LL-37/hCAP-18 és la única catelicidina humana localitzada als grànuls específics dels neutròfils, a les cèl·lules epitelials i als macròfags presents a les vies aèries^{202,203}. En els neutròfils, el pèptid s'emmagatzema en forma de pro-pèptid (hCAP-18) i un cop és secretat, la proteïnasa-3 el talla per generar la forma processada LL-37²⁰⁴.

Altres PAMs molt abundants en les secrecions respiratòries i, que actualment no pertanyen a cap classificació, són la Lactoferrina, la Lisozima, el *Secretory Leukocyte Protease Inhibitor* (SLPI), l'elafina i la RNase 7^{197,205}.

Els microorganismes susceptibles a l'activitat antimicrobiana dels PAMs són els bacteris Gram-positius i Gram-negatius, els fongs i els virus encapsulats. Els mecanismes que utilitzen per eliminar aquests microorganismes són la disrupció de la integritat de la membrana microbiana, la quelació del ferro i la disrupció enzimàtica

d'estructures microbianes essencials²⁰⁶. En els bacteris Gram-negatius, el principal component de la paret bacteriana és el lipopolisacàrid (LPS). Moltes vegades, l'acció dels PAMs va dirigida a neutralitzar aquest component per finalitzar la resposta inflamatòria, com és el cas de la catelicidina LL-37. De vegades, els PAMs no només actuen intracel·lularment en el fagolisosoma sinó que també poden ser secretats pels neutròfils per adherir-se al DNA de les NETs i augmentar la seva capacitat bactericida²⁰⁷. Aquesta funció l'exerceix principalment la LL-37, que estimula la formació de NETs i les estabilitza oferint protecció contra la degradació produïda per les nucleases^{207,208}.

Durant el dany epitelial, els nivells de PAMs s'incrementen per protegir el teixit pulmonar destruït de les infeccions bacterianes. Aquesta protecció la duen a terme gràcies a la seva activitat bactericida i a la seva capacitat per reclutar cèl·lules inflamatòries. Diversos PAMs, com l' α -defensina, la β -defensina i la LL-37, poden actuar com a quimioattractants de monòcits, neutròfils, cèl·lules dendrítiques immadures, cèl·lules T CD4⁺ en repòs i cèl·lules T CD8⁺ ²⁰⁹. En concret, les α -defensines indueixen la producció de IL-8 per part de les cèl·lules pulmonars. Tot i que alguns dels receptors no són ben coneguts, s'ha demostrat que la β -defensina recluta cèl·lules dendrítiques immadures i cèl·lules memòria a través del receptor CCR6 ²¹⁰. En canvi, la LL-37 recluta neutròfils, monòcits i cèl·lules T a través del receptor del pèptid formil de tipus I (FPRL1). Segons l'activitat de la seva membrana, els PAMs també tenen una citotoxicitat dosi-dependent cap a les cèl·lules eucariotes. Les α -defensines, per exemple, indueixen la mort de les cèl·lules epitelials i són capaces d'unir-se als inhibidors de proteases com l' α -1-antitripsina per promoure el dany cel·lular²¹¹.

Altres activitats inflamatòries que els PAMs duen a terme, a part de la quimiotaxi i la neutralització de l'efecte de LPS, són l'increment de la fagocitosi, l'estimulació de la producció de prostaglandina, l'augment de l'angiogènesi i la inducció de la reparació tissular. Alguns membres de la família de les defensines i de les catelicidines, així com la Lactoferrina, estimulen la proliferació dels fibroblasts i de les cèl·lules epitelials per tal de restablir la integritat epitelial²⁰⁶.

En diverses patologies respiratòries, no només s'ha observat que la producció dels PAMs està disminuïda sinó que la seva activitat està inhibida per diferents mecanismes, afavorint l'establiment de la infecció respiratòria²¹²⁻²¹⁴. En la fibrosi quística, s'ha observat que el baix pH del fluid que recobreix l'epiteli redueix l'activitat dels PAMs^{215,216}. En el microambient pulmonar també poden existir factors que condicionin l'activitat dels PAMs, com són la seva degradació produïda per proteases d'origen bacterià^{217,218} i la seva inhibició per la concentració de sals, pels polisacàrids microbians, per l'F-actina, i pel DNA de les cèl·lules mortes i el moc²¹⁹.

En els pacients amb MPOC, degut a la inflamació neutrofílica, els nivells de PAMs estan incrementats i s'associen amb les exacerbacions^{218,220}. El mateix s'ha observat en malalties com la asma neutrofílica, la síndrome de la bronquiolitis obliterans i les malalties pulmonars intersticials²²¹⁻²²³. En aquestes patologies, els PAMs participarien en el dany pulmonar i en la inflamació degut a les seves propietats pro-inflamatòries i citotòxiques a elevades concentracions. Per això, tant les concentracions insuficients de PAMs com les excessives, contribueixen al desenvolupament i progressió de les malalties pulmonars¹⁹⁷. Per una banda, les baixes concentracions de PAMs s'associen amb major susceptibilitat a la infecció, alteracions del microbioma i dèficit en la reparació tissular i inflamació. Però, per l'altra banda, les concentracions elevades de PAMs contribueixen en la inflamació, en el reclutament descontrolat de cèl·lules inflamatòries al lloc de la infecció, al dany pulmonar i també a alteracions del microbioma. Aquests fets evidencien la importància de mantenir l'homeòstasi dels PAMs a nivell pulmonar.

Taula 3. Estructura, producció i activitat antimicrobiana de PAMs amb activitat immunomoduladora (Adaptada de Rogan P. *Resp Res.* 2006).

PAM	Estructura	Cèl·lula productora	Activitat antimicrobiana	Activitat immunomoduladora
LL-37	Pèptid que requereix el processament de la proteïnasa 3 per alliberar la LL-37 funcional	Grànuls secundaris dels neutròfils i cèl·lules epitelials	Bactericida, antifúngica bacteriostàtica i antiviral	Migració de neutròfils i monòcits Neutralització de LPS
SLPI	Proteïna no-glicosilada d'11.7 kDa	Macròfags, neutròfils, cèl·lules epitelials	Bactericida i antiviral bacteriostàtic	Inhibidor de proteases Inhibeix l'activació de NF-kB
Lactoferrina	Glicoproteïna d'unió de ferro 80kDa	Grànuls secundaris dels neutròfils i cèl·lules epitelials	Bactericida, bacteriostàtica, inhibeix la formació de biofilms, antifúngica, antiviral	Antioxidant S'uneix a motius CPG Neutralització de LPS
Lisozima	Enzim de 14 kDa	Grànuls primaris i secundaris dels neutròfils, macròfags i cèl·lules epitelials	Bactericida, bacteriostàtica	Actua de manera sinèrgica amb la lactoferrina
Defensines	Pèptids de 3 a 5 kDa	Grànuls primaris dels neutròfils	Bactericida, bacteriostàtica, antifúngica, antiviral i antiparasitària	Mitogènica i quimiotàctica Contribueix a la proliferació epitelial pulmonar
BPI	Proteïna de 55 kDa	Grànuls primaris dels neutròfils	Bactericida, bacteriostàtica, opsonització	Neutralització de LPS
SP-A i SP-D	Complex de lipoproteïnes	Cèl·lules Clara i pneumòcits de tipus II	Bactericida, bacteriostàtic, antifúngic, antiviral i opsonització	Modulen múltiples funcions leucocitàries
CCL20	Quimiocina d'estructura similar a les defensines	Epiteli respiratori	Bactericida contra bacteris Gram-negatius	Estimula la migració de cèl·lules B, cèl·lules dendrítiques i cèl·lules memòria T

2.3.3.3 Proteïnes d'unió als àcids grassos (FABPs)

Les proteïnes d'unió als àcids grassos (*Fatty-acid binding protein*; FABPs) són un grup de proteïnes de baix pes molecular (14-15 kDa) membres de la superfamília de proteïnes d'unió a lípids. Són les encarregades de la regulació de la resposta dels lípids en les cèl·lules i s'associen amb vies inflammatòries i metabòliques²²⁴.

Existeixen diferents FABPs que presenten característiques úniques del teixit en el qual s'expressen. Tot i així, no són específics de teixit ni de cèl·lula productora²²⁵. S'expressen de manera més abundant en els teixits implicats en el metabolisme dels lípids com el fetge, l'intestí, el cor, els adipòcits, l'epidermis, l'ili, el cervell, la mielina i els testicles. Per les malalties respiratòries, les FABPs d'especial rellevància són la FABP4 i la FABP5, ja que s'expressen al pulmó i als macròfags²²⁴.

Per una banda, la FABP4, anomenada també FABP dels adipòcits (A-FABP o aP2), s'expressa principalment en aquestes cèl·lules però també ho fa en els macròfags i en les cèl·lules dendrítiques²²⁴. La FABP4 actua com a una adipocina secretada que presenta funcions de la immunitat innata. En models experimentals, s'ha demostrat el paper protector de la FABP4 enfront la infecció respiratòria per *P.aeruginosa*. La FABP4 exerceix aquesta protecció regulant els nivells de la quimiocina CXCL1, també produïda pels macròfags alveolars per tal de reclutar neutròfils al lloc de la infecció respiratòria^{226,227}. Tot i que no hi ha dades sobre el paper de la FABP4 pulmonar en pacients amb MPOC i amb bronquièctasis, sí que ha estat estudiada en models experimentals d'asma. En aquests, també s'ha observat que la FABP4 participa en el reclutament i en l'activació dels eosinòfils fins als pulmons. Fora del pulmó, la FABP4 juga un paper important en el desenvolupament de resistència a la insulina i de l'arterioesclerosi²²⁸.

Per l'altra banda, la FABP5, anomenada també FABP epidèrmica (E-FABP), s'expressa en una gran varietat de teixits i cèl·lules entre els quals es troben el pulmó i els macròfags. La FABP5 exerceix funcions immunomoduladores en l'epiteli respiratori exposat al fum del tabac i a infeccions bacterianes. Aquestes funcions les porta a terme

a través de la modulació de l'activitat del receptor nuclear gamma activat pel proliferador de peroxisomes (PPAR- γ)²²⁹. Aquest receptor té un paper anti-inflamatori en la resposta immune, de manera que quan es redueixen els nivells de FABP5, es redueix l'activitat de PPAR- γ , i es potencia la resposta pro-inflamatòria²³⁰. Els pacients amb MPOC presenten una reducció de l'expressió de FABP5 en el seu epiteli respiratori²³¹. A més, les cèl·lules epitelials modificades *in vitro* perquè no expressin FABP5 i exposades posteriorment al fum del tabac, secreten una major quantitat de citocines pro-inflamatòries²²⁹. També s'ha demostrat el paper protector de FABP5 enfront infeccions respiratòries causades per *P.aeruginosa*²³⁰.

2.3.4 Mecanismes bacterians d'evasió del sistema immune innat

Durant la infecció respiratòria, els bacteris com l'*H.influenzae* i la *P.aeruginosa* han de fer front a múltiples estrès ambientals: la competició intra i interespecíes pels nutrients i l'espai, l'ambient anaeròbic causat per l'acumulació de la mucositat, les altes concentracions d'antibiòtics utilitzades per tractar la infecció i l'abundància cel·lular i dels seus mediadors solubles (PAMs, ROS i citocines)²³². Aquestes pressions produeixen evolucions en els bacteris mitjançant l'adquisició de mutacions espontànies. Les soques que colonitzaran les vies respiratòries durant períodes perllongats de temps seran aquelles que hagin estat seleccionades genotípicament i fenotípicament gràcies a aquestes modificacions adquirides²³³.

Les adaptacions genètiques que adquireixen els bacteris durant aquest procés d'evolució estan involucrades, principalment, en la síntesi de noves proteïnes de superfície, en la captació de ferro, en l'expressió de proteïnes antioxidants, en l'adhesió tissular i en la evasió del sistema immune²³⁴ (**Figura 11**).

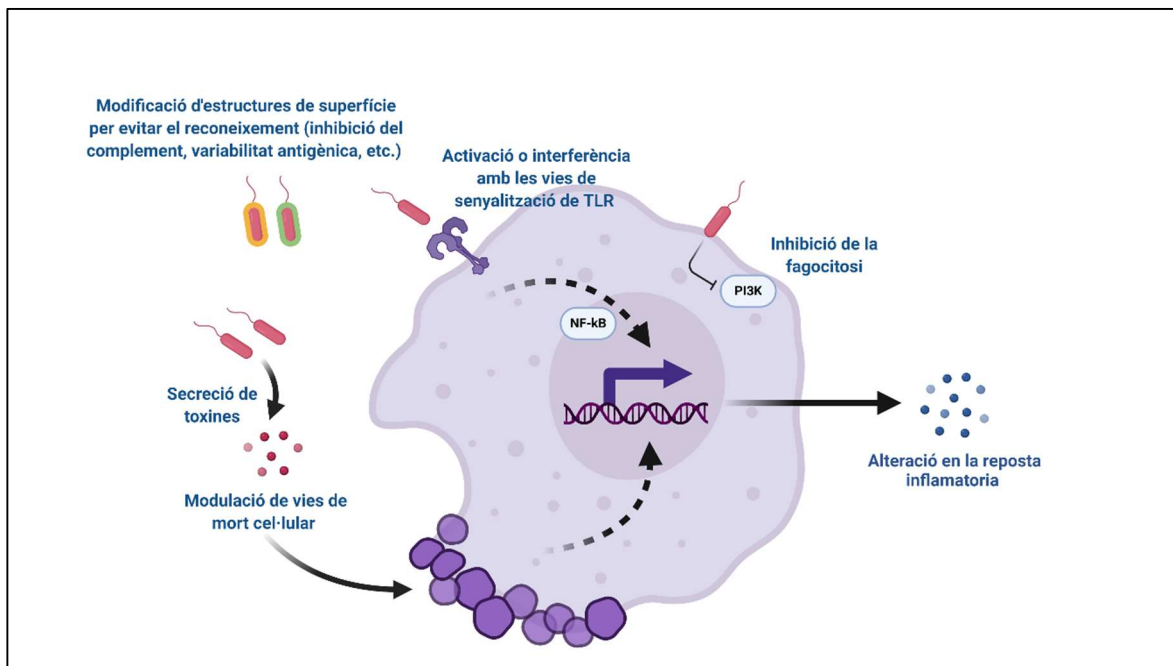


Figura 11. Esquema general de diferents mecanismes que utilitzen els bacteris per evadir la resposta immune innata (Creada amb Biorender.com).

2.3.4.1. Secreció d'immunomediadors

Especialment els bacteris Gram-negatius han desenvolupat mecanismes de secreció de factors de virulència com les toxines i les proteases. Durant les infeccions respiratòries, s'ha descrit que la *P.aeruginosa* és capaç d'alliberar quatre toxines diferents, anomenades toxines de tipus III, amb l'objectiu d'eliminar les cèl·lules epitelials i afavorir la capacitat invasiva de la soca^{235,236}.

Pel que fa a les proteases bacterianes, una de les seves finalitats és degradar els components que formen la MEC per tal de beneficiar-se del dany tissular i afavorir la infecció respiratòria⁸⁸. Diverses proteases secretades per la *P.aeruginosa*, com la proteasa IV i la elastasa B (LasB), degraden proteïnes del surfactant pulmonar per tal d'inhibir la seva funció de defensa de l'hoste^{237,238}. En concret, la elastasa LasB degrada la col·lectina SP-A per evitar la opsonització i la fagocitosis de la *P.aeruginosa* pels neutròfils i monòcits. La LasB també degrada la Lisozima i la LL-37, evitant que puguin dur a terme la seva activitat antimicrobiana^{238,239}. En resum, les proteases bacterianes són un factor de virulència especialment rellevant ja que permet als bacteris produir dany

tissular, disrupcions en les unions estretes de l'epiteli pulmonar i degradació de components de la immunitat innata incloent proteïnes del surfactant, PAMs, quimiocines i citocines²⁴⁰. A més, algunes d'aquestes proteases també van dirigides contra els anticossos que es troben en la mucosa respiratòria.

2.3.4.2. Evasió humoral

La unió d'IgA als patògens evita l'adhesió bacteriana a les cèl·lules epitelials, inactiva les toxines i inhibeix l'aglutinació²⁴¹. L'*H.influenzae* és un dels pocs patògens que alliberen proteases contra la IgA, concretament contra la subclasse IgA1 que és la predominant en la mucosa respiratòria²⁴². Durant la infecció respiratòria, aquests enzims hidrolítics degraden la IgA pulmonar per tal d'evitar que la IgA secretora (sIgA) dugui a terme el mecanisme d'exclusió immune, mitjançant el qual s'evita la interacció dels patògens amb l'epiteli respiratori^{243,244}.

Amb la producció de proteases bacterianes, els patògens aconseguen reduir la presència d'anticossos en la mucosa respiratòria i inactivar el sistema del complement per evitar la seva eliminació. Però, aquestes proteases també intervenen en la supervivència intracel·lular dels patògens alterant l'acidificació dels lisosomes²⁴⁵.

2.3.4.3. Evasió cel·lular

El primer mecanisme bacterià per evadir-se de les cèl·lules immunitàries innates recau en evitar ser reconegut pel sistema immune. Per aconseguir-ho, els bacteris modifiquen la seva estructura d'oligosacàrids per tal d'atenuar el reclutament cel·lular i regular els mediadors inflamatoris en el lloc de la infecció²⁴⁶. També són capaços d'atenuar les respostes dels PRRs de l'hoste. En el cas de l'*H.influenzae*, per iniciar la resposta inflamatòria, cal que el sistema immune el reconegui a través de la senyalització per TLR2 i TLR4 presents en les cèl·lules efectores. Però, quan la soca adquireix determinats factors de virulència, el patògen fa servir la senyalització a través del receptor de factor de creixement epidèrmic (*Epidermal growth factor receptor*, EGFR), ja

que aquest inhibeix la senyalització a través del TLR2, de manera que aconseguix atenuar la resposta dels PRRs de l'hoste i facilita la infecció respiratòria¹³.

Per evitar ser fagocitats, adopten modificacions en les seves proteïnes de superfície més immunogèniques. En el cas de la *P.aeruginosa*, la flagel·lina és un dels components principals del flagel que la caracteritza. És un potent activador del TLR5 i indueix una forta resposta pro-inflamatòria. Durant la infecció respiratòria, la *P.aeruginosa* s'adapta per persistir i perd l'expressió del seu flagel o altera la seva composició per no ser reconeguda pels receptors fagocítics. Amb aquesta modificació també aconseguix disminuir l'activació immune a través del TLR5 ⁶⁸.

Una altra estratègia bacteriana per evadir-se del sistema immune és induir la mort dels neutròfils, ja que és la cèl·lula que es troba en major proporció als pulmons durant una infecció respiratòria²⁴⁷. La *P.aeruginosa* és capaç de secretar unes substàncies, els ramnolípid, que actuen com a potents detergents i causen la necrosi dels neutròfils²⁴⁸.

Tot i caracteritzar-se per ser bacteris extracel·lulars, l'*H.influenzae* i la *P.aeruginosa* també posseeixen la capacitat d'expressar certes proteïnes de superfície que els hi permeten l'adhesió als macròfags, la invasió i la persistència intracel·lular, enlloc de ser eliminades per fagocitosi²⁴⁹. A més, especialment la NTHi, té la capacitat de penetrar entre les cèl·lules epitelials i residir en l'espai intercel·lular del teixit pulmonar. Aquesta localització li proporciona un reservori temporal o de llarg termini durant el qual pot establir la infecció respiratòria crònica i a la vegada estar protegida de la resposta immune²⁴⁵.

Degut a què la des-estructuració de l'epiteli respiratori és beneficiosa per la colonització bacteriana, un dels mecanismes d'evasió que utilitzen els bacteris és la reducció, de manera selectiva, de l'expressió de les proteïnes que mantenen la integritat de l'epiteli respiratori. L'*H.influenzae* redueix l'expressió de la proteïna d'unió estreta E-caderina²⁵⁰, mentre que la *P.aeruginosa* actua sobre les proteïnes transmembranes claudines 1 i 4, ocludina i tricelulina²⁵¹.

2.3.4.4. Formació de biofilms

Un dels factors de virulència associats amb l'*H.influenzae* i amb la *P.aeruginosa* és la formació de biofilms, tot i que no totes les soques tenen la mateixa capacitat²⁵².

Els biofilms són comunitats multi-microbianes dinàmiques on els bacteris mantenen una baixa taxa de replicació i un metabolisme quiescent per sobreviure en una estructura formada per DNA extracel·lular, exopolisacàrids i proteïnes, donant lloc a la substància extracel·lular polimèrica (SEP)²⁵³. El creixement del biofilm consta de quatre fases, durant les quals va adquirint l'estructura necessària per protegir-se del sistema immune innat i del tractament antibiòtic (**Figura 12**).

Els exopolisacàrids, o polisacàrids extracel·lulars, són produïts pels bacteris per conferir una major adhesió del biofilm a l'epiteli i promoure l'evasió del sistema immune. En concret, els exopolisacàrids aporten resistència contra els PAMs, la fagocitosi per part dels neutròfils i dels macròfags, i a les ROS alliberades pels neutròfils²⁵⁴.

La resposta immune innata és menys efectiva davant els biofilms que no pas davant el propi bacteri. Això és degut a que els biofilms funcionen com a estructures protectores resistents a les cèl·lules efectores. A més, la resposta generada davant els biofilms és menor degut a que les proteïnes bacterianes més immunogèniques es troben emmascarades per la matriu del biofilm i no són tant accessibles per les cèl·lules efectores²⁵⁵. Tot i així, es continua produint una resposta immune innata enfront la presència de biofilms.

Els biofilms poden activar de manera massiva als neutròfils per produir l'esclat oxidatiu i la desgranulació, induint així una forta inflamació neutrofílica. A més, també poden provocar la necrosi dels neutròfils, donant lloc a més inflamació, reclutant més neutròfils i generant de manera colateral més dany tissular. Aquesta necrosi, a la vegada, contribueix a alliberar DNA extracel·lular que s'unirà a l'estructura del biofilm per aportar-li encara més estabilitat²⁵⁶. Tot i que els biofilms també són resistents a les

NETs alliberades pels neutròfils, el DNA extracel·lular que s'allibera després de la seva activació, també passarà a formar part de l'estructura dels biofilms²⁵⁷.

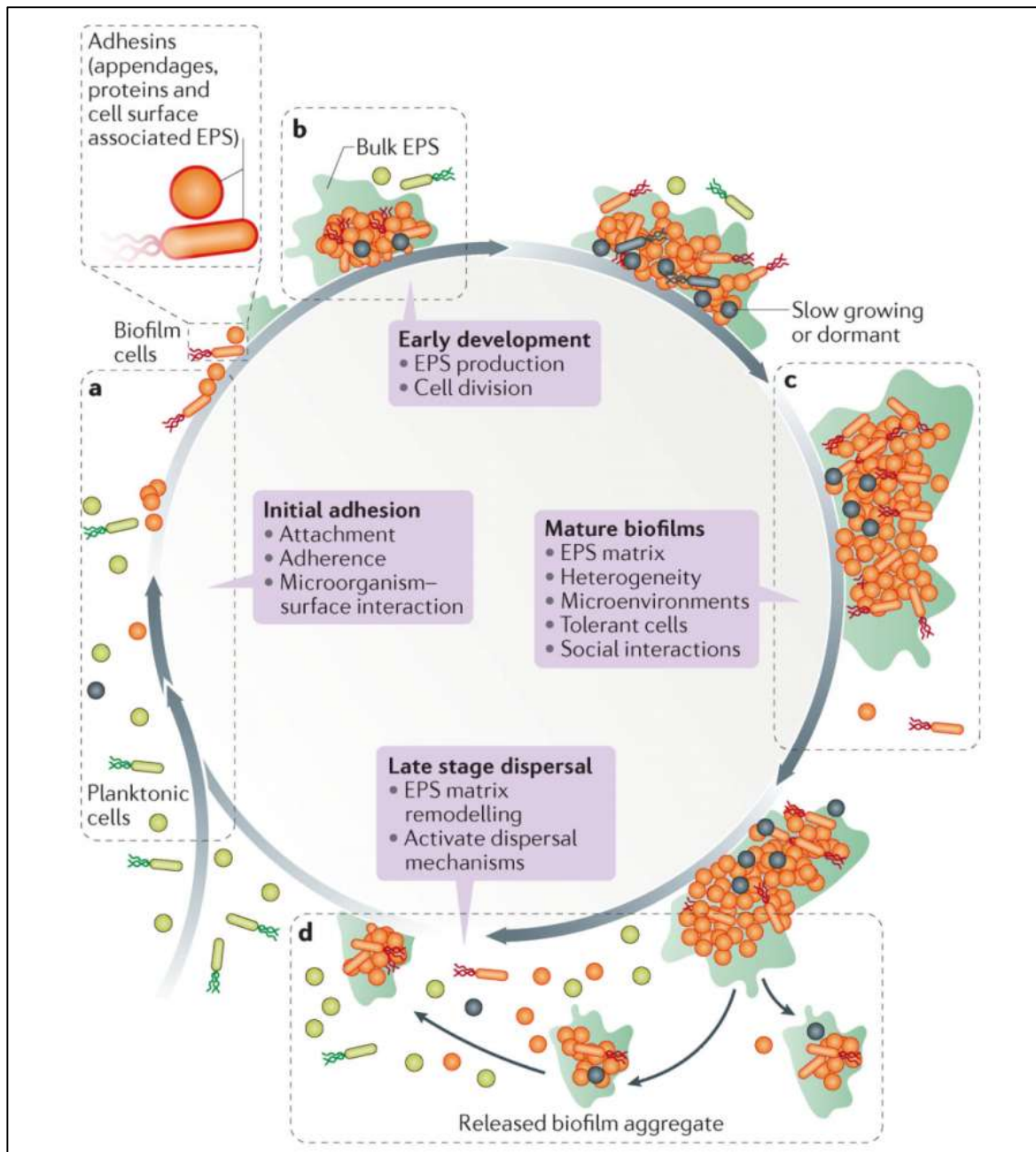


Figura 12. Fases durant la formació dels biofilms. (a) Durant la fase inicial d'iniciació del biofilm, els bacteris s'uneixen a la superfície de l'hoste gràcies a les adhesines. (b) En la fase primerenca, els bacteris comencen a dividir-se i a produir la SEP, que millora l'adhesió i forma la matriu on s'immobilitzaran els bacteris. (c) Seguidament, ve la fase de maduració del biofilm durant la qual la matriu d'SEP proporciona una estructura protectora i multi-funcional que permet la interacció polimicrobiana per coexistir dins del microambient creat en el biofilm. (d) Finalment, durant la fase de dispersió els bacteris abandonen el biofilm i tornen a adquirir la seva capacitat infectiva, així com la susceptibilitat als antibiòtics. (Koo. *Nat Rev Microb.* 2018).

Per últim, un altre benefici dels biofilms pels bacteris és la resistència que els ofereix enfront els anticossos per evitar ser reconeguts i eliminats²⁵⁷. En el cas dels biofilms formats per NTHi, a la superfície apical del biofilm es troben proteases que tallen la IgA de l'hoste per reforçar la protecció dels bacteris²⁴².

En resum, les infeccions respiratòries amb presència de biofilms es caracteritzen per una resposta immune innata hiperactivada però ineficaç en l'eliminació bacteriana. Conseqüentment, aquesta hiperactivació és la responsable del dany tissular perllongat²⁵⁴.

3. HIPÒTESI I OBJECTIUS

3.1. HIPÒTESI

La **inflamació crònica pulmonar** que presenten els pacients amb MPOC i bronquièctasis afavoreix la presència **d'infeccions bacterianes**. Aquestes infeccions, consegüentment, incrementen la severitat clínica de la malaltia i el risc de patir episodis d'agudització, durant els quals pot ser necessària l'hospitalització del pacient.

El sistema immune d'aquests pacients no sembla capaç de controlar la infecció respiratòria i contribueix a la perpetuació de la inflamació. Aquest context inflamatori, a la seva vegada, produeix danys a l'epiteli respiratori, que fan al pacient més susceptible a la invasió per part de bacteris com la *P.aeruginosa* i l'*H.influenzae*. Per tant, la hipòtesi principal d'aquesta tesi és que els pacients amb MPOC i bronquièctasis que tenen infecció respiratòria clínicament estable, presenten alteracions pulmonars en els nivells de **PAMs** i **FABP4**, de quimiocines i citocines **inflamatòries**, així com **dany** a l'epiteli respiratori. Aquestes alteracions també augmentarien la severitat clínica i el risc de futures aguditzacions. A més, és possible que la resposta immune pulmonar difereixi segons quin sigui el bacteri causant de la infecció respiratòria. A diferència dels estudis basats en l'anàlisi individual de paràmetres immunològics sobre la clínica, també creiem que la complexitat d'aquestes malalties és deguda a la relació entre diferents factors. Aquest estudi, basat en una eina estadística anomenada anàlisi de conglomerats o clústers, ens permetria identificar de manera més acurada **perfils immunològics** de pacients que es podrien associar a diferents graus de severitat clínica i risc d'aguditzacions.

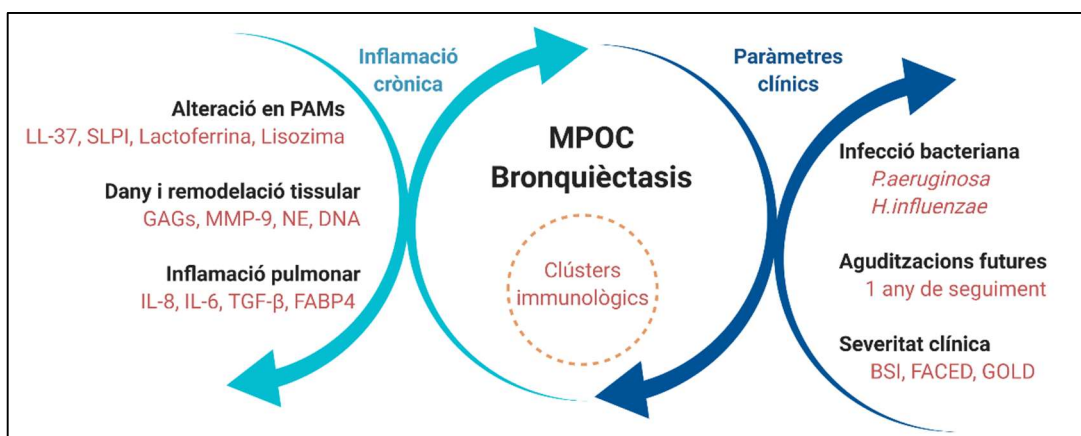


Figura 13. Esquema de la hipòtesi. Marcat en vermell les mesures valorades als objectius de la tesi.

3.2. OBJECTIUS

GENERAL:

Estudiar els diferents elements de la resposta immune innata en la MPOC i les bronquièctasis, incloent la producció pulmonar i sistèmica de mediadors solubles, el dany i remodelació tissular, i la presència de poblacions cel·lulars, per tal d'associar aquesta resposta inflamatòria amb paràmetres d'infecció respiratòria, severitat i pronòstic de la malaltia.

ESPECÍFICS:

En pacients amb **MPOC** en fase d'estabilitat clínica:

1. Determinar els nivells pulmonars i sistèmics de FABP4 en cohorts de controls sense patologia respiratòria i de pacients amb MPOC.
2. Relacionar els nivells pulmonars i sistèmics de FABP4 amb la presència d'infecció respiratòria, amb la presència d'*H.influenza* com a bacteri causant de la infecció i amb la severitat clínica.
3. Associar els nivells pulmonars de FABP4 amb les poblacions cel·lulars presents en les mostres de BAL.

En pacients amb **bronquièctasis** en fase d'estabilitat clínica:

1. Determinar els nivells pulmonars i sistèmics dels PAMs Lactoferrina, Lisozima, LL-37 i SLPI.
2. Relacionar els nivells pulmonars i sistèmics dels PAMs amb la presència d'infecció respiratòria, amb la presència de *P.areuginosa* com a bacteri causant de la infecció i amb la severitat clínica.
3. Estudiar els nivells pulmonars i sistèmics dels PAMs com a marcadors pronòstic de futures aguditzacions durant un any de seguiment.

4. Aplicar l'anàlisi de clústers per abordar l'heterogeneïtat biològica i determinar diferents perfils de PAMs, inflamació pulmonar i dany i remodelació tissular en pacients amb bronquièctasis.
5. Associar els clústers immunològics identificats en els pacients amb bronquièctasis amb la presència d'infecció respiratòria i, concretament, de *P. aeruginosa*.
6. Estudiar la validesa clínica dels clústers immunològics identificats en els pacients amb bronquièctasis.

4. PUBLICACIONES

4.1 ARTICLE I

Reduced airway levels of fatty-acid binding protein 4 in COPD: relationship with airway infection and disease severity.

Lídia Perea, Ana Rodrigo-Troyano, Elisabet Cantó, Marisol Domínguez-Álvarez, Jordi Giner, Ferran Sanchez-Reus, Judit Villar-García, Sara Quero, Marian García-Núñez, Alicia Marín, Eduard Monsó, Rosa Faner, Alvar Agustí, Silvia Vidal#, Oriol Sibila#.

Respiratory Research. 2020 Jan 13;21(1):21.

Factor d'impacte: 3.8, Primer Quartil


#Els autors comparteixen la posició sènior de l'article.

RESEARCH

Open Access



Reduced airway levels of fatty-acid binding protein 4 in COPD: relationship with airway infection and disease severity

Lidia Perea¹, Ana Rodrigo-Troyano², Elisabet Cantó¹, Marisol Domínguez-Álvarez^{3,4}, Jordi Giner², Ferran Sanchez-Reus⁵, Judit Villar-García⁶, Sara Quero^{4,7}, Marian García-Núñez^{4,7,8}, Alicia Marín^{4,8}, Eduard Monsó^{4,7}, Rosa Faner^{4,9}, Alvar Agustí^{4,9}, Silvia Vidal^{1†} and Oriol Sibila^{2*†} 

Abstract

Background: For still unclear reasons, chronic airway infection often occurs in patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD), particularly in those with more severe airflow limitation. Fatty-acid binding protein 4 (FABP4) is an adipokine involved in the innate immune response against infection produced by alveolar macrophages (M ϕ). We hypothesized that airway levels of FABP4 may be altered in COPD patients with chronic airway infection.

Methods: In this prospective and controlled study we: (1) compared airway FABP4 levels (ELISA) in induced sputum, bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and plasma samples in 52 clinically stable COPD patients (65.2 \pm 7.9 years, FEV₁ 59 \pm 16% predicted) and 29 healthy volunteers (55.0 \pm 12.3 years, FEV₁ 97 \pm 16% predicted); (2) explored their relationship with the presence of bacterial airway infection, defined by the presence of potentially pathogenic bacteria (PPB) at $\geq 10^3$ colony-forming units/ml in BALF; (3) investigated their relationship with the quantity and proportion of M ϕ in BALF (flow cytometry); and, (4) studied their relationship with the severity of airflow limitation (FEV₁), GOLD grade and level of symptoms (CAT questionnaire).

Results: We found that: (1) airway levels of FABP4 (but not plasma ones) were reduced in COPD patients vs. controls [219.2 (96.0–319.6) vs. 273.4 (203.1–426.7) (pg/ml)/protein, $p = 0.03$ in BALF]; (2) COPD patients with airway infection had lower sputum FABP4 levels [0.73 (0.35–15.3) vs. 15.6 (2.0–29.4) ng/ml, $p = 0.02$]; (3) in COPD patients, the number and proportion of M ϕ were positively related with FABP4 levels in BALF; (4) BALF and sputum FABP4 levels were positively related with FEV₁, negatively with the CAT score, and lowest in GOLD grade D patients.

Conclusions: Airway FABP4 levels are reduced in COPD patients, especially in those with airway infection and more severe disease. The relationship observed between M ϕ and airway FABP4 levels supports a role for FABP4 in the pathogenesis of airway infection and disease severity in COPD.

Keywords: FABP4, Chronic obstructive pulmonary disease, Macrophages, Bronchoalveolar lavage fluid

* Correspondence: osibila@santpau.cat

[†]Silvia Vidal and Oriol Sibila share the senior authorship

²Respiratory Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Biomedical Research Institute Sant Pau (IIB Sant Pau), Autonomous University of Barcelona, Barcelona, Spain

Full list of author information is available at the end of the article



Introduction

Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) currently is the third leading cause of mortality worldwide [1]. Chronic airway bacterial infection often occurs in COPD patients, particularly in those with more severe airflow limitation [2, 3]. The presence of airway infection increases the economic impact of the disease and worsens clinical outcomes including increased mortality [4]. Several studies have demonstrated that innate immunity alterations favor airway infection in COPD [5, 6]. However, the underlying biological mechanisms leading to chronic airway infection in COPD have not been yet fully elucidated.

Alveolar macrophages (M ϕ) are a central component of the innate immune response against airway infection. Several alterations of M ϕ in marker expression and functions have been previously described in COPD [7, 8]. Among many other functions, M ϕ produce fatty acid-binding protein 4 (FABP4), also known as adipocyte A-FABP or aP2. FABP4 is a member of the FABP family of small-molecular weight intracellular lipid chaperones that functions as a secreted adipokine and plays a role in airway defense against infection [9, 10]. For instance, in an experimental model of *Pseudomonas aeruginosa* infection in mice, the presence of FABP4 protected against airway infection [11]. However, limited data on COPD and its relationship with disease severity and airway infections are available.

We hypothesized that airway FABP4 levels may be reduced in COPD patients, especially in those with the more severe disease and with potentially more dysfunctional M ϕ . Accordingly, this study sought to: (1) compare airway (and plasma) FABP4 levels in COPD and healthy volunteers and, (2) study their relationship with presence of airway infection, quantity and proportion of M ϕ and several clinical markers of disease severity, such as the severity of airflow limitation (FEV₁), the GOLD classification and the level of symptoms (CAT questionnaire).

Methods

Study design and ethics

This was a prospective, multicenter, cross-sectional study that included clinically stable COPD patients and healthy volunteers with normal lung function, who served as controls. Participants were recruited from five university tertiary hospitals [Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (Barcelona, Spain), Hospital del Mar (Barcelona, Spain), Hospital Universitari Parc Taulí (Sabadell, Spain), Hospital Germans Trias i Pujol (Barcelona, Spain) and Hospital Clínic (Barcelona Spain)]. The study protocol was approved by the local institutional review board (IIBSP-MIC-2015-57) and all subjects gave signed informed consent.

Participants

The diagnosis of COPD was established according to the Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) guidelines [12]. The inclusion criteria were: 8 weeks of clinical stability (defined by the absence of an exacerbation that required oral corticosteroids and/or antibiotic treatment), age between 40 and 75 years, and FEV₁ between 20 and 70% predicted. All patients underwent a computerized tomography scan, and those with bronchiectasis, lung cancer, pneumonia, and/or interstitial lung diseases were excluded. Other exclusion criteria were patients with active malignant disease and/or any type of immunosuppression, drug addiction or alcohol abuse. As controls, we included adult volunteers without respiratory diseases and with normal spirometry recruited in these same centers [13].

Clinical assessment

Demographic data, the number of exacerbations in the previous year, the time from last exacerbation, relevant comorbid conditions and current treatments were recorded at inclusion using standardized questionnaires. All patients underwent spirometry (Datospir-600; Sibelman SA, Barcelona, Spain) following international recommendations. Reference values were those of Mediterranean populations [14].

Samples collection and processing

Bronchoalveolar lavage fluid (BALF), induced sputum and plasma were obtained from all participants and were processed immediately. BALF samples were recovered using 150 ml saline lavage with the bronchoscope wedged in the right middle lobe. BALF samples were centrifuged at 800 *xg* for 10 min to obtain the cellular pellet and the supernatant. Induced sputum was collected just before the bronchoscopy as previously described [15]. Sputum samples were disaggregated using dithiothreitol (Oxoid Ltd., Hampshire, United Kingdom) for 15 min and were centrifuged at 600 *xg* for 6 min to obtain the supernatant. Proteases inhibitors (Calbiochem, San Diego, CA) were added to the supernatants during thawing. Plasma samples were obtained from blood collected in ethylenediamine tetra-acetic acid (EDTA) tube and centrifuged at 850 *xg* for 10 min. BALF and sputum supernatants and plasma were stored immediately at -80 °C until analysis.

Microbiological study

Samples were processed for qualitative and quantitative bacteriology, as previously described [16]. Airway infection was defined as the presence of potentially pathogenic bacteria (PPB) at $\geq 10^3$ colony-forming units/ml in BALF [17] in clinically stable patients.

FABP4 measurement

FABP4 levels were measured by validated, commercially available ELISA kit (RayBiotech, Peachtree Corners, GA) according to the manufacturer's instructions. The limit of kit detection was 38 pg/ml. The dilutions used were 1/7 for BALF supernatants, 1/5 for sputum supernatants and 1/75 for plasma. BALF FABP4 levels were adjusted to the total protein content quantified using Qubit fluorometer (Invitrogen, Carlsbad, CA).

BALF flow cytometry

In COPD patients, cellular pellet obtained from BALF samples was lysed to avoid red blood cells contamination (RBC lysing solution; BioLegend, San Diego, CA). Cells were resuspended in one ml of PBS supplemented with 2% bovine serum albumin (BSA; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) to quantify the number of total cells in a MACSQuant cytometer (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). Cells were adjusted to 1×10^6 cells/ml and stained for 15 min at room temperature in dark with viability dye (Zombie NIR; BioLegend), CD45-FITC, CD14-APC (Immunotools GmbH, Friesoythe, Germany) and CD15-PE (Biolegend, San Diego, CA). Aggregated and non-viable cells were excluded from the analysis. M ϕ were gated according to CD45 positive population, CD15 negative, CD14 positive and high side scatter (SSC) parameter.

Statistical analyses

Results of continuous variables are presented as mean and standard deviation (SD) or median and interquartile range [25th – 75th percentile IQR], according to the Kolmogorov-Smirnov test of normality distribution, whereas categorical variables are presented as frequencies. Groups were compared using Student t-test, ANOVA test or their corresponding non-parametrical test when required. Correlations were analyzed using Spearman's Rho due to the variables did not present a normal distribution. A p -value < 0.05 was considered significant. Statistical analyses were performed using SPSS version 22 and Graph Pad Prism 7 software.

Results

Characteristics of participants

Fifty-two COPD patients and 29 controls were included. Table 1 shows their demographic and clinical characteristics. COPD patients were older (65.2 ± 7.9 vs. 55.0 ± 12.3 , $p = 0.0002$) than controls but gender (75.9 vs. 65.4% males, $p = 0.6$) and BMI (26.3 ± 4.7 vs. 28.7 ± 9.7 , $p = 0.7$) were similar in both groups. Airflow limitation in patients with COPD ranged from mild to severe (FEV₁ of $59 \pm 15\%$ of predicted) whereas spirometry was normal in controls by design. Twenty-four patients (46%) were classified as GOLD grade C and D, and 21

Table 1 Demographics and clinical characteristics among controls and COPD patients

	Controls ($n = 29$)	COPD ($n = 52$)	P value
Age	55.0 ± 12.3	65.2 ± 7.9	0.0002
Male, n (%)	22 (75.9)	34 (65.4)	0.6
BMI (kg/m^2)	28.7 ± 9.7	26.3 ± 4.7	0.7
Smoking status, n (%)			
Never	5 (17.2)	0 (0.0)	< 0.0001
Former	10 (34.5)	41 (78.8)	
Current	14 (48.3)	11 (21.1)	
Pack-years	26.0 ± 19.0	43.5 ± 19.2	0.002
FEV ₁ (% pred)	97 ± 16	59 ± 16	< 0.0001
FVC (% pred)	92 ± 15	85 ± 16	0.07
FEV ₁ /FVC	0.79 ± 0.05	0.52 ± 0.14	< 0.0001

Data is presented as mean \pm SD unless otherwise indicated

patients (40%) were frequent exacerbators, defined as those patients who suffered from 2 or more exacerbations during the previous year to the inclusion.

Twelve COPD patients (23%) had airway infection. Patients with airway infection were predominantly males (92%) and older than non-infected ones (Table 2). *Haemophilus influenzae* was the most common PPB isolated ($n = 9$, 75%), followed by *Streptococcus pneumoniae* ($n = 2$, 17%) and *Moraxella catharralis* ($n = 1$, 8%).

Airway and systemic FABP4 levels in patients and controls

Airway FABP4 levels were lower in COPD patients than in controls, reaching statistical significant differences in BALF [219.2 (96.0–319.6) vs. 273.4 (203.1–426.7) (pg/ml)/protein, $p = 0.03$], but not in sputum [12.2 (0.7–27.5) vs. 14.5 (0.5–45.6) ng/ml, $p = 0.4$] (Fig. 1A, C). Yet, we observed a positive significant correlation between BALF and sputum FABP4 levels in the entire population ($\rho = 0.31$, $p = 0.01$) and in COPD patients ($\rho = 0.37$, $p = 0.01$). On the other hand, plasma FABP4 levels were similar in patients and controls [26.6 (19.3–39.5) vs. 25.2 (18.3–36.5) ng/ml, $p = 0.4$] and no significant correlation was observed between systemic and airway FABP4 levels.

FABP4 levels and airway infection in COPD patients

Airway FABP4 levels were lower in COPD patients with airway infection vs. those without it, reaching statistical significant differences in sputum [0.73 (0.35–15.3) vs. 15.6 (2.0–29.4) ng/ml, $p = 0.02$] but not in BALF [181.5 (28.7–395.5) vs. 228.5 (106.3–319.1) (pg/ml)/protein, $p = 0.7$] (Fig. 1B, D). No differences in plasma FABP4 levels were observed between COPD patients with and without airway infection [29.8 (20.4–45.0) vs. 26.1 (19.3–37.9) ng/ml, $p = 0.6$].

Table 2 Patient demographics, clinical characteristics and prior treatments among non-infected and infected patients

	Non-infected (n = 40)	Infected (n = 12)	P value
Age	63.7 ± 7.6	69.9 ± 6.9	0.02
Male, n (%)	23 (57.5)	11 (91.7)	0.04
Smoking status, n (%)			
Never	0 (0)	0 (0)	0.7
Former	31 (77.5)	10 (83.3)	
Current	9 (22.5)	2 (16.7)	
Pack-years	42.3 ± 20.0	47.8 ± 16.1	0.2
Comorbid conditions, n (%)			
Cardiovascular	13 (32.5)	6 (50)	0.3
Hypertension	15 (37.5)	6 (50)	0.4
Diabetes	0 (0)	0 (0)	1
Gastroesophageal reflux	14 (35)	6 (50)	0.3
Treatment, n (%)			
ICS	22 (55)	6 (50)	0.5
LABA	32 (80)	8 (66.7)	0.3
LAMA	32 (80)	11 (91.7)	0.3
FEV ₁ (% pred)	58 ± 16.9	61 ± 17	0.6
FVC (% pred)	87 ± 16	76 ± 17	0.04
BMI (kg/m ²)	26.4 ± 4.8	26.0 ± 4.4	0.8
GOLD stage, n (%)			
A	13 (32.5)	6 (50)	0.4
B	8 (20)	1 (8.3)	
C	9 (22.5)	1 (8.3)	
D	10 (25)	4 (33.4)	
Prior exacerbations, n (%)			
0	16 (40)	4 (33.3)	0.9
1	8 (20)	3 (25)	
≥ 2	16 (40)	5 (41.7)	
Weeks from last exacerbation	26.2 ± 18.9	27.3 ± 19.1	0.6
CAT questionnaire	11.2 ± 6.5	10.5 ± 7.6	0.6

Data is presented as mean ± SD unless otherwise indicated

FABP4 levels and disease severity

Airway (but not plasma) FABP4 levels were related with several measures of disease severity, including GOLD stage, airway limitation and quality of life. Patient with GOLD D had the lowest values both in BALF (Fig. 2A) and sputum (Fig. 2B). In addition, a positive correlation among airway FABP4 levels and FEV₁ (% predicted) (Fig. 3A, B) and a negative correlation with levels of symptoms measured in CAT questionnaire (Fig. 3C, D) were observed.

No differences in airway FABP4 levels were observed regarding age and smoking status. Patients using inhaled corticosteroid (ICS) had lower values in BAL compared with those without ICS [(pg/ml)/protein, 123.6 (12.6–306.4) vs 250 (171.6–344.7), $p = 0.03$].

FABP4 and alveolar M ϕ

Alveolar M ϕ represented 49.9 (26.4–76.8) % of cells in BALF of COPD patients, corresponding to an absolute number of 140 (48.9–311) M ϕ per μ l. Both proportion and absolute number of alveolar M ϕ were significantly related with BALF FABP4 levels [proportion ($\rho = 0.54$, $p = 0.0003$) and absolute number ($\rho = 0.52$, $p = 0.0006$)] (Fig. 4). No significant differences among infected and non-infected patients and related to GOLD stage were found.

Discussion

The main results of this study show that, as hypothesized: (1) airway (but not plasma) levels of FABP4 are reduced in COPD patients, particularly in those with airway infection and more severe disease; and, (2) BALF

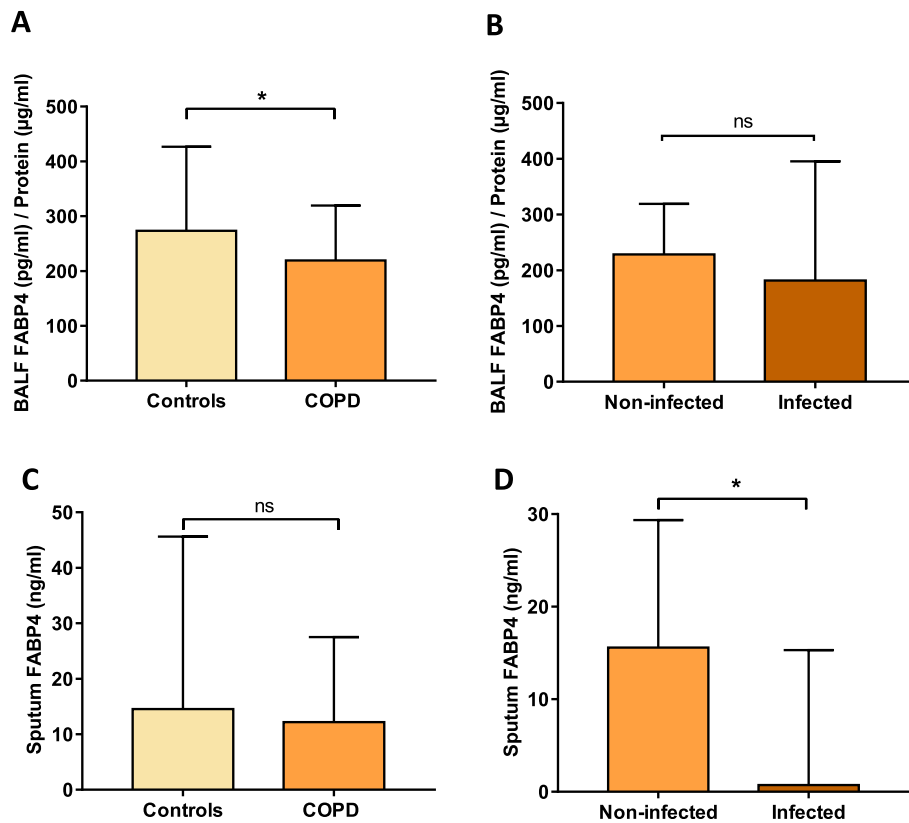


Fig. 1 Airway FABP4 levels in COPD. **A** BALF FABP4 levels in controls and COPD patients and **(B)** in non-infected and infected patients. **C** Sputum FABP4 levels in controls and COPD patients and **(D)** in non-infected and infected patients. *P*-values were obtained by Mann-Whitney test. **p*-value < 0.05. Data is represented as median with interquartile range

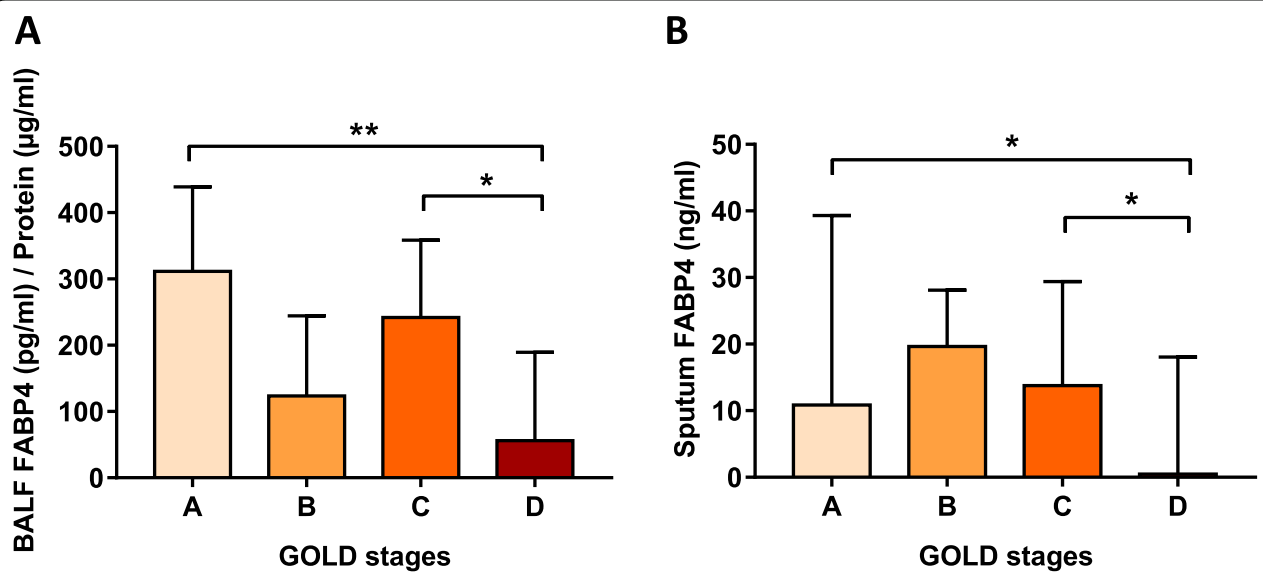
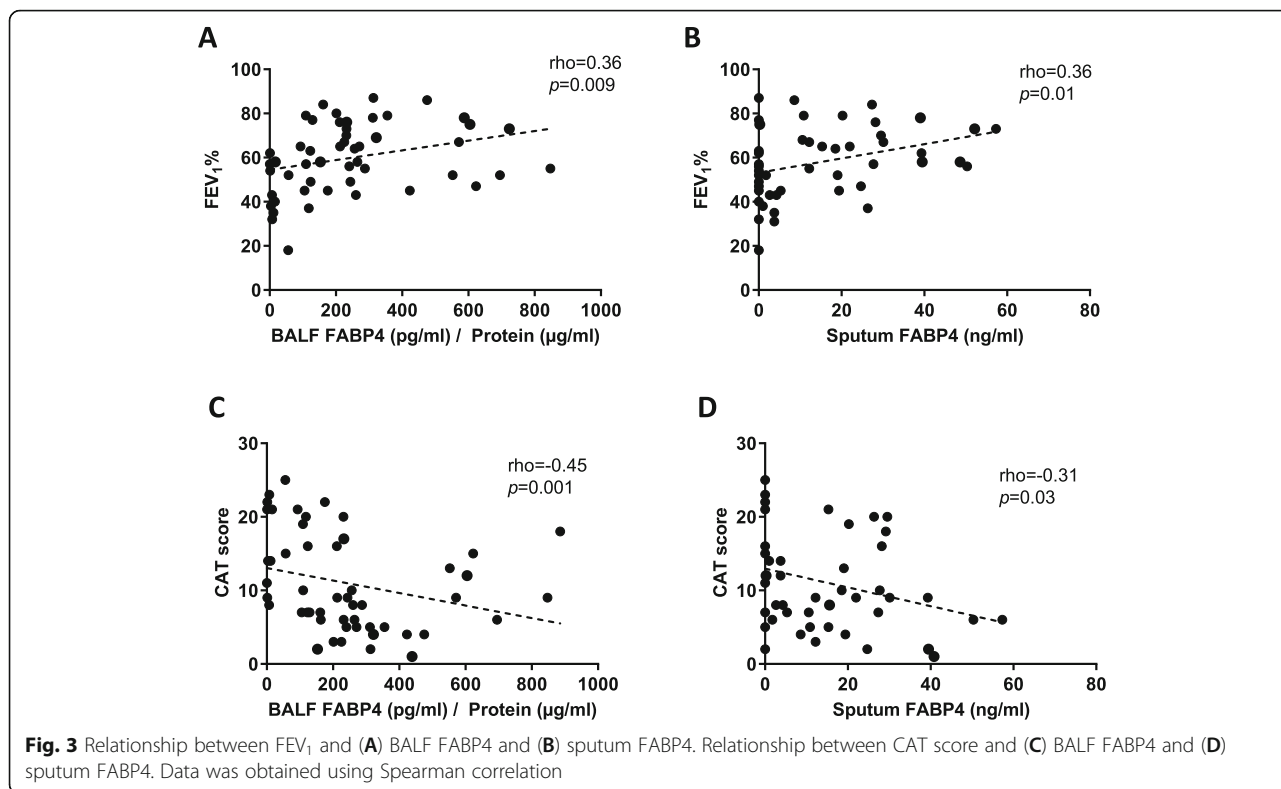


Fig. 2 Association of airway FABP4 levels and disease severity. **A** BALF and **(B)** Sputum FABP4 levels and GOLD stages classified in mild (GOLD A), moderate (GOLD B), severe (GOLD C) and very severe (GOLD D). *P*-values were obtained by Mann-Whitney test. **p*-value < 0.05 and ***p*-value < 0.01. Data is represented as median with interquartile range

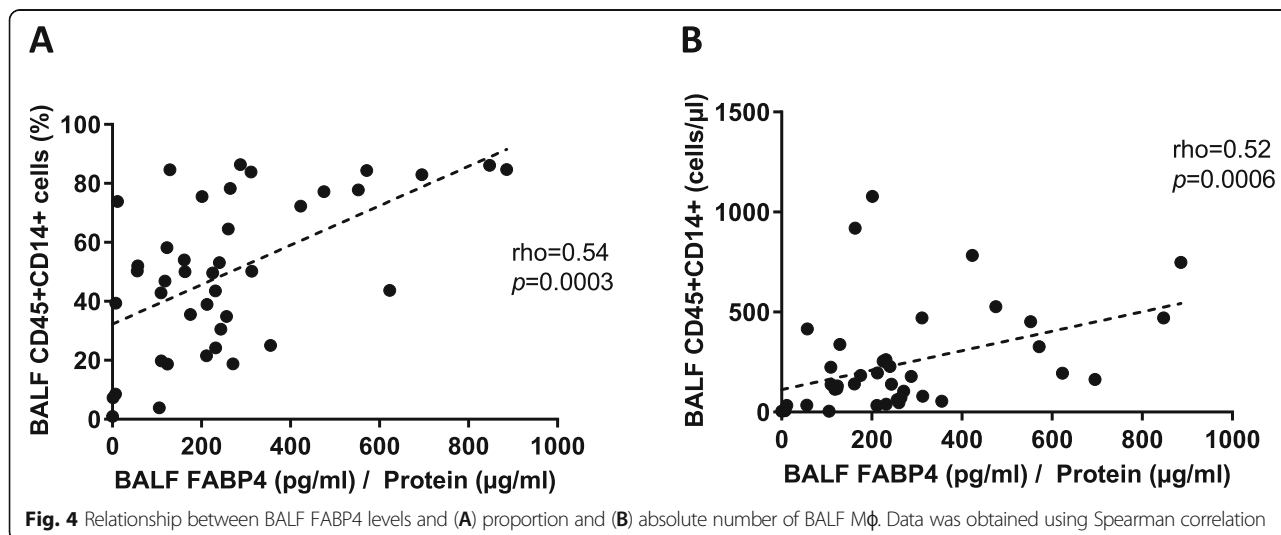


FABP4 levels are related to the number and proportion of alveolar Mφ. Collectively, these results suggest that reduced production of FABP4 by alveolar Mφ is associated with the presence of airway infection in COPD.

Previous studies

FABP4 is an adipokine widely studied in metabolic and cardiovascular diseases [18]. Its role in chronic respiratory diseases is poorly understood, although it has been recognized that FABP4 is associated with

airway inflammation [19]. Likewise, a dysregulation of airway FABP4 has been previously described in asthma [20] where it has been shown in experimental models that FABP4 participates in the recruitment and activation of eosinophils [21]. In patients with COPD, a dysregulation of systemic FABP4 compared with controls has been suggested [22], which is at variance with our findings here. Differences may be related to distinct inclusion criteria. Whereas Zhang et al excluded patients with metabolic and vascular



comorbidities [22], known to be associated with elevated systemic FABP4 levels [23, 24], we did not because cardiovascular comorbidities are highly prevalent in patients with COPD (74% in our cohort) and we did not want to bias our study population. In any case, to our knowledge, our study is the first to investigate airway FABP4 levels, and their relationship with airway infection and disease severity in COPD.

Interpretation of novel findings

Bacterial airway infections are relevant in the natural history of COPD [3] because it worsens clinical outcomes, including mortality and costs [4]. The molecular and cellular mechanisms that favor bacterial infection in some COPD patients are, however, not yet fully elucidated. We observed that airway FABP4 levels were reduced in COPD patients, particularly in those with evidence of airway infection, and we found a relationship between BALF M ϕ (absolute number and proportion) and FABP4 levels in COPD. Given that alveolar M ϕ produce FABP4 [9], these observations support a pathogenic role for a locally defective M ϕ production of FABP4. In support of this interpretation is the fact that FABP4 facilitates the interaction between M ϕ and neutrophils through the regulation of CXCL1, a chemokine secreted by M ϕ to recruit neutrophils to the site of infection [11, 25]. Further works studying M ϕ subpopulations would help to better understand the immunological mechanism related to FABP4 production by M ϕ .

On the other hand, we found that patients with severe COPD showed the lowest airway FABP4 levels. We also found that there was a direct relationship between airway FABP4 concentration and FEV₁ levels and an inverse relationship between the former and CAT score (i.e. worse health status). In keeping with these observations, some previous studies had demonstrated that patients with severe COPD have altered airway innate immunity [16, 26, 27] that leads to chronic airway inflammation and dysregulation of normal alveolar M ϕ function [28]. Yet, because our study is cross-sectional, we cannot infer what is the cause and what is the consequence, this is, what comes first.

Potential limitations

Our study has some limitations that deserve comment. First, controls were younger than COPD patients, but we did not observe any relationship between airway FABP4 levels and the age of the participants. Second, induced sputum was collected just before the bronchoscopy so we cannot discard any interaction with BALF samples, although this procedure had been applied to all the participants. Third, we did not perform flow cytometry in BALF from controls, but it is well reported in the literature that COPD alveolar M ϕ differ from healthy

controls in phenotype [29] and in the ability to phagocytose bacteria and apoptotic cells [30, 31]. Forth, we have not determined FABP4 in infected patients without COPD and it would be of great interest to better understand its role in the pathogenesis or airway infection. Finally, we did not obtain follow-up samples, so we cannot infer if any therapeutic intervention (e.g., treatment with low dose azithromycin) can restore airway FABP4 levels and what clinical consequences that may have.

Conclusions

FABP4 airway levels (but not plasma ones) are reduced in COPD patients, especially in those with chronic airway infection and more severe disease, in relation to a reduced number of alveolar M ϕ . These observations may be relevant for a better understanding of the pathogenesis (and eventual prevention or treatment) of chronic airway infection in these patients.

Abbreviations

APC: Allophycocyanin; BALF: Bronchoalveolar lavage fluid; BSA: Bovine serum albumin; CAT: COPD assessment test; COPD: Chronic obstructive pulmonary disease; EDTA: Ethylenediamine tetraacetic acid; ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay; FABP4: Fatty-acid binding protein 4; FEV₁: Forced expiratory volume in one second; FITC: Fluorescein isothiocyanate; GOLD: Global Initiative for chronic obstructive lung disease; IQR: Interquartile range; PE: Phycoerythrin; PPB: Potentially pathogenic bacteria; SD: Standard deviation; SSC: Side scatter

Acknowledgments

Authors thank all participants in the study for the willingness to contribute to medical research, and all field workers of the different participating centers for their dedication and quality of their daily work.

Authors' contributions

Study design: OS, SV, AA, RF and EM. Patient recruitment and data collection: OS, AR, MD, JG, FS, JV, SQ, MG, AM, RF. Performed experiments and sample processing: LP, AR, EC, SV. Writing the manuscript: LP, OS, SV, AA, EM. Revising of the manuscript and approval of submission: all authors. Responsible for the overall content as guarantor: OS.

Funding

This study is supported by Fundació Ramon Pla i Armengol, Instituto de Salud Carlos III, Fondos FEDER (PI15/02042, PI15/00167 and PI18/00311). RF is recipient of a MS research contract (CP16/000039). OS is supported by PERIS.

Availability of data and materials

All data generated or analyzed during this study are included in this published article.

Ethics approval and consent to participate

The study protocol was approved by the local institutional review board (IIBSP-MIC-2015-57) and all subjects gave signed informed consent.

Consent for publication

Obtained.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Author details

¹Inflammatory Diseases, Institut de Recerca de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Biomedical Research Institute Sant Pau (IIB Sant Pau), Barcelona, Spain. ²Respiratory Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Biomedical Research Institute Sant Pau (IIB Sant Pau), Autonomous University of Barcelona, Barcelona, Spain. ³Pneumology Department, Hospital del Mar,

Institut Hospital del Mar d'Investigacions Mèdiques (IMIM), Autonomous University of Barcelona, Barcelona, Spain. ⁴Centro de Investigación en red de Enfermedades Respiratorias (CIBERES), Instituto de Salud Carlos III (ISC III), Barcelona, Spain. ⁵Microbiology Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Biomedical Research Institute Sant Pau (IIB Sant Pau), Autonomous University of Barcelona, Barcelona, Spain. ⁶Department of Infectious Diseases, Hospital del Mar, Institut Hospital del Mar d'Investigacions Mèdiques (IMIM), Barcelona, Spain. ⁷Department of Respiratory Medicine, Parc Taulí Hospital Universitari. Institut d'Investigació i Innovació Parc Taulí, I3PT, Sabadell, Spain. ⁸Respiratory Department, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Fundació Institut d'Investigació Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain. ⁹Institut Respiratori, Hospital Clinic, Institut de Recerca Biomèdica August Pi i Sunyer (DIBAPS), University of Barcelona, Barcelona, Spain.

Received: 17 September 2019 Accepted: 5 January 2020

Published online: 13 January 2020

References

- Lozano R, Naghavi M, Foreman K, Lim S, Shibuya K, Aboyans V, et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* (London). 2012;380(9859):2095–128.
- Monsó E, Ruiz J, Rosell A, Manterola J, Fiz J, Morera J, et al. Bacterial infection in chronic obstructive pulmonary disease. A study of stable and exacerbated outpatients using the protected specimen brush. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995;152(4):1316–20.
- Zalacain R, Sobradillo V, Amilibia J, Barrón J, Achótegui V, Pijoan JJ, et al. Predisposing factors to bacterial colonization in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J*. 1999;13(2):343–8.
- Patel IS, Seemungal TAR, Wilks M, Lloyd-Owen SJ, Donaldson GC, Wedzicha JA. Relationship between bacterial colonisation and the frequency, character, and severity of COPD exacerbations. *Thorax*. 2002;57(9):759–64.
- Sethi S, Maloney J, Grove L, Wrona C, Berenson CS. Airway inflammation and bronchial bacterial colonization in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006;173(9):991–8.
- Mizgerd JP. Acute lower respiratory tract infection. *N Engl J Med*. 2008;358(7):716–27.
- Berenson CS, Kruzel RL, Eberhardt E, Dolnick R, Minderman H, Wallace PK, et al. Impaired innate immune alveolar macrophage response and the predilection for COPD exacerbations. *Thorax*. 2014;69(9):811–8.
- Dewhurst JA, Lea S, Hardaker E, Dungwa JV, Ravi AK, Singh D. Characterisation of lung macrophage subpopulations in COPD patients and controls. *Sci Rep*. 2017;7(1):7143.
- Ghelfi E, Karaaslan C, Berkelhamer S, Akar S, Kozakewich H, Cataltepe S. Fatty acid-binding proteins and Peribronchial angiogenesis in Bronchopulmonary dysplasia. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2011;45(3):550–6.
- Cao H, Sekiya M, Ertunc ME, Burak MF, Mayers JR, White A, et al. Adipocyte lipid chaperone aP2 is a secreted adipokine regulating hepatic glucose production. *Cell Metab*. 2013;17(5):768–78.
- Liang X, Gupta K, Quintero JR, Cernadas M, Kobzik L, Christou H, et al. Macrophage FABP4 is required for neutrophil recruitment and bacterial clearance in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *FASEB J*. 2018;33(3):3562–74.
- Singh D, Agusti A, Anzueto A, Barnes PJ, Bourbeau J, Celli BR, et al. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive lung disease: the GOLD science committee report 2019. *Eur Respir J*. 2019;53(5):1900164.
- Agusti A, Calverley PMA, Celli B, Coxson HO, Edwards LD, Lomas DA, et al. Characterisation of COPD heterogeneity in the ECLIPSE cohort. *Respir Res*. 2010;11:122.
- Castellsagué J, Burgos F, Sunyer J, Barberà JA, Roca J. Prediction equations for forced spirometry from European origin populations. Barcelona collaborative group on reference values for pulmonary function testing and the Spanish Group of the European Community Respiratory Health Survey. *Respir Med*. 1998;92(3):401–7.
- Vidal S, Bellido-Casado J, Granel C, Crespo A, Plaza V, Juárez C. Flow cytometry analysis of leukocytes in induced sputum from asthmatic patients. *Immunobiology*. 2012;217(7):692–7.
- Sibila O, Garcia-Bellmunt L, Giner J, Rodrigo-Troyano A, Suarez-Cuartin G, Torrego A, et al. Airway Mucin 2 is decreased in patients with severe chronic obstructive pulmonary disease with bacterial colonization. *Ann Am Thorac Soc*. 2016;13(5):636–42.
- Cabello H, Torres A, Celis R, El-Ebiary M, Puig de la Bellacasa J, Xaubet a, et al. bacterial colonization of distal airways in healthy subjects and chronic lung disease: a bronchoscopic study. *Eur Respir J*. 1997;10(5):1137–44.
- Furuhashi M. Fatty acid-binding protein 4 in cardiovascular and metabolic diseases. *J Atheroscler Thromb*. 2019;26(3):216–32.
- Wu G, Yang L, Xu Y, Jiang X, Jiang X, Huang L, et al. FABP4 induces asthmatic airway epithelial barrier dysfunction via ROS-activated FoxM1. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018;495(1):1432–9.
- Shum BOV, Mackay CR, Gorgun CZ, Frost MJ, Kumar RK, Hotamisligil GS, et al. The adipocyte fatty acid-binding protein aP2 is required in allergic airway inflammation. *J Clin Invest*. 2006;116(8):2183–92.
- Ge XN, Bastan I, Dileepan M, Greenberg Y, Ha SG, Steen KA, et al. FABP4 regulates eosinophil recruitment and activation in allergic airway inflammation. *Am J Physiol Cell Mol Physiol*. 2018;315(2):L227–40.
- Zhang X, Li D, Wang H, Pang C, Wu Y, Wen F. Gender difference in plasma fatty-acid-binding protein 4 levels in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Biosci Rep*. 2016;36(1):e00302.
- Terra X, Quintero Y, Auguet T, Porras JA, Hernández M, Sabench F, et al. FABP 4 is associated with inflammatory markers and metabolic syndrome in morbidly obese women. *Eur J Endocrinol*. 2011;164(4):539–47.
- Kralisch S, Fasshauer M. Adipocyte fatty acid binding protein: a novel adipokine involved in the pathogenesis of metabolic and vascular disease? *Diabetologia*. 2013;56(1):10–21.
- Makowski L, Brittingham KC, Reynolds JM, Suttles J, Hotamisligil GS. The fatty acid-binding protein, aP2, coordinates macrophage cholesterol trafficking and inflammatory activity. *J Biol Chem*. 2005;280(13):12888–95.
- Persson LJP, Aanerud M, Hardie JA, Miodini Nilsen R, Bakke PS, Eagan TM, et al. Antimicrobial peptide levels are linked to airway inflammation, bacterial colonisation and exacerbations in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J*. 2017;49(3):1601328.
- Millares L, Marin A, Garcia-Aymerich J, Sauleda J, Belda J, Monsó E, et al. Specific IgA and metalloproteinase activity in bronchial secretions from stable chronic obstructive pulmonary disease patients colonized by *Haemophilus influenzae*. *Respir Res*. 2012;13:113.
- Hiemstra PS. Altered macrophage function in chronic obstructive pulmonary disease. *Ann Am Thorac Soc*. 2013;10(Suppl):S180–5.
- Shaykhiev R, Krause A, Salit J, Strulovici-Barel Y, Harvey B-G, O'Connor TP, et al. Smoking-dependent reprogramming of alveolar macrophage polarization: implication for pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *J Immunol*. 2009;183(4):2867–83.
- Hodge S, Hodge G, Scicchitano R, Reynolds PN, Holmes M. Alveolar macrophages from subjects with chronic obstructive pulmonary disease are deficient in their ability to phagocytose apoptotic airway epithelial cells. *Immunol Cell Biol*. 2003;81(4):289–96.
- Berenson CS, Garlipp MA, Grove LJ, Maloney J, Sethi S. Impaired phagocytosis of Nontypeable *Haemophilus influenzae* by human alveolar macrophages in chronic obstructive pulmonary disease. *J Infect Dis*. 2006;194(10):1375–84.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



4.2 ARTICLE II

Antimicrobial peptides, disease severity and exacerbations in bronchiectasis.

Oriol Sibila*, **Lidia Perea***, Elisabet Cantó, Amelia Shoemark, Diane Cassidy, Alexandria Holly Smith, Guillermo Suarez-Cuartin, Ana Rodrigo-Troyano, Holly R Keir, Martina Oriano, Samantha Ong, Silvia Vidal, Francesco Blasi, Stefano Aliberti, James D Chalmers.

Thorax. 2019 Sep;74(9):835-842.

Factor d'impacte: 10.3, Primer Quartil

*Els autors van contribuir de la mateixa manera en l'article.

Antimicrobial peptides, disease severity and exacerbations in bronchiectasis

Oriol Sibila,¹ Lídia Perea,² Elisabet Cantó,² Amelia Shoemark,³ Diane Cassidy,³ Alexandria Holly Smith,⁴ Guillermo Suarez-Cuartin,¹ Ana Rodrigo-Troyano,¹ Holly R Keir,³ Martina Oriano,⁵ Samantha Ong,³ Silvia Vidal,² Francesco Blasi,⁵ Stefano Aliberti,⁵ James D Chalmers³

► Additional material is published online only. To view please visit the journal online (<http://dx.doi.org/10.1136/thoraxjnl-2018-212895>).

¹Respiratory Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Biomedical Research Institute Sant Pau (IIB Sant Pau), Barcelona, Spain

²Laboratory of Experimental Immunology, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Biomedical Research Institute Sant Pau (IIB Sant Pau), Barcelona, Spain

³Tayside Respiratory Research Group, University of Dundee, Dundee, UK

⁴University of Cambridge, Cambridge, United Kingdom

⁵Department of Pathophysiology and Transplantation, University of Milan, Fondazione IRCCS Cà Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milano, Italy

Correspondence to

Dr Oriol Sibila, Respiratory Medicine, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona 08025, Spain; OSibila@santpau.cat

OS and LP are joint first authors.

Received 29 November 2018

Revised 12 June 2019

Accepted 16 June 2019

Published Online First

5 July 2019



© Author(s) (or their employer(s)) 2019. No commercial re-use. See rights and permissions. Published by BMJ.

To cite: Sibila O, Perea L, Cantó E, et al. *Thorax* 2019;**74**:835–842.

ABSTRACT

Rationale Recently a frequent exacerbator phenotype has been described in bronchiectasis, but the underlying biological mechanisms are unknown. Antimicrobial peptides (AMPs) are important in host defence against microbes but can be proinflammatory in chronic lung disease.

Objectives To determine pulmonary and systemic levels of AMP and their relationship with disease severity and future risk of exacerbations in bronchiectasis.

Methods A total of 135 adults with bronchiectasis were prospectively enrolled at three European centres. Levels of cathelicidin LL-37, lactoferrin, lysozyme and secretory leucocyte protease inhibitor (SLPI) in serum and sputum were determined at baseline by ELISA. Patients were followed up for 12 months. We examined the ability of sputum AMP to predict future exacerbation risk.

Measurements and main results AMP levels were higher in sputum than in serum, suggesting local AMP release. Patients with more severe disease at baseline had dysregulation of airway AMP. Higher LL-37 and lower SLPI levels were associated with Bronchiectasis Severity Index, lower FEV₁ (forced expiratory volume in 1 s) and *Pseudomonas aeruginosa* infection. Low SLPI levels were also associated with the exacerbation frequency at baseline. During follow-up, higher LL-37 and lower SLPI levels were associated with a shorter time to the next exacerbation, whereas LL-37 alone predicted exacerbation frequency over the next 12 months.

Conclusions Patients with bronchiectasis showed dysregulated sputum AMP levels, characterised by elevated LL-37 and reduced SLPI levels in the frequent exacerbator phenotype. Elevated LL-37 and reduced SLPI levels are associated with *Pseudomonas aeruginosa* infection and can predict future risk of exacerbations in bronchiectasis.

INTRODUCTION

Bronchiectasis is a chronic inflammatory lung disease characterised by permanent dilatation of the bronchi. Most patients suffer daily cough and sputum production and some of them experience frequent exacerbations.¹ A frequent exacerbator phenotype has recently been described, in which patients consistently have multiple exacerbations over time and this condition independently predicts worse clinical outcomes including increased mortality.² The underlying biological mechanisms

Key messages

What is the key question?

- Is there a dysregulation in pulmonary and systemic antimicrobial peptides (AMPs) associated with the frequent exacerbator phenotype in bronchiectasis?

What is the bottom line?

- Frequent exacerbators have dysregulation of AMPs with particularly high levels of the cathelicidin LL-37 and low levels of secretory leucocyte protease inhibitor in sputum, which could predict time to next exacerbation and the frequency of exacerbations during follow-up.

Why read on?

- This is the first study to describe AMP dysregulation in the frequent exacerbator phenotype in bronchiectasis.

leading to frequent exacerbations in this group have not yet been identified, but frequent exacerbators appear to have greater neutrophilic inflammation and are more susceptible to infection with bacteria, particularly *Pseudomonas aeruginosa*.^{3,4}

Antimicrobial peptides (AMPs) are important in host defence against pathogenic microbes in the lung.⁵ Among the most important and abundant AMPs in the airway are lysozyme, lactoferrin and the cathelicidin LL-37 (which are proinflammatory mediators released from activated neutrophils, macrophages and bronchial epithelium) and secretory leucocyte protease inhibitor (SLPI, produced by respiratory epithelial cells and mostly anti-inflammatory).^{6,7} AMP function through multiple mechanisms including protein degradation (lysozyme), nutrient depletion (lactoferrin), cellular disruption and lysis, and inhibition of virulence factors (LL-37, SLPI).^{8,9} AMP are designed to protect against bacterial infection but in the context of chronic lung inflammation bacteria such as *P. aeruginosa* adapt to resist AMP killing, changing methods of iron acquisition and variations in biofilm-associated polysaccharides.¹⁰ The result may be an ineffective and excessive AMP response that stimulates inflammation without achieving bacterial clearance.¹¹

A consistent finding in bronchiectasis is the persistence of bacterial infection despite an

excessive inflammatory response which instead of achieving bacterial clearance results in host damage.^{3 12} The contribution of AMP to the vicious cycle of bronchiectasis has not been previously explored. We therefore hypothesised that AMP are altered in sputum from patients with bronchiectasis and may correlate with disease severity and predict future risk of exacerbations.

METHODS

Study design and ethics

This was an international, multicentre, prospective, observational study which included consecutive adults with bronchiectasis. The study protocol was approved by local institutional review board and all subjects gave signed informed consent.

Participants

Patients were recruited from three regional specialist bronchiectasis clinics at the Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (Barcelona, Spain), Ospedale Maggiore Policlinico (Milano, Italy) and Ninewells Hospital (Dundee, UK).

Bronchiectasis was defined by the presence of bronchial dilatation on high-resolution CT scanning with a compatible clinical history of cough, sputum production and/or recurrent respiratory infections. Patients with cystic fibrosis (CF), primary immunodeficiency, active malignancy, active allergic bronchopulmonary aspergillosis, interstitial lung disease, active mycobacterial disease, HIV infection and long-term oral corticosteroid treatment were excluded.

Clinical assessments

All patients were clinically stable, defined by the absence of an exacerbation that required antibiotic treatment within 30 days. Frequent exacerbators were defined as three or more exacerbations per year at baseline. Demographic data, number of exacerbations in the previous year, relevant comorbid conditions and current treatments were recorded. Exacerbations were recorded as moderate (treated with antibiotics but not requiring hospitalisation) or severe (requiring hospitalisation or intravenous antibiotics). All patients underwent spirometry.¹³ The underlying aetiology of bronchiectasis was determined after testing recommended by current guidelines.^{1 14} The Bronchiectasis Severity Index (BSI) and FACED scores were calculated.^{15 16} Severe disease was considered when BSI score was ≥ 9 points and FACED score was ≥ 5 points.

Longitudinal outcomes

Patients were followed up for 1 year from the time of sputum and serum collection. During follow-up, patients were visited every 6 months as part of routine clinical practice at the study centres. Time to first exacerbation was calculated as the time from sampling to the first day of antibiotic administration because of an exacerbation.

Bacteriology

All bacteriology was performed on spontaneous early-morning sputum samples. Sputum was separated from saliva and the sample split for bacteriology and assessment of AMP levels. Samples were processed for bacteriology as previously described.¹⁷

AMP and inflammatory mediator measurement

Methods of sputum and blood processing were standardised across the three sites. Sputum samples were processed by ultracentrifugation at 50 000 g for 90 min followed by careful

extraction of the supernatant. Samples were processed within 2 hours of expectoration and immediately frozen at -80°C .

Serum and sputum lactoferrin, lysozyme (AssayPro, St. Charles, Missouri, USA), LL-37 (Hycult Biotech, Plymouth, Pennsylvania, USA), SLPI and matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) (R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA) levels were measured by validated commercially available ELISA kits. Sputum samples were diluted 1/25 000 for lactoferrin and lysozyme, 1/20 for LL-37 and 1/2000 for SLPI assays. The limits of detection were 0.625 ng/mL for lactoferrin, 0.0781 ng/mL for lysozyme, 0.14 ng/mL for LL-37 and 0.025 ng/mL for SLPI. Neutrophil elastase (NE) activity in sputum supernatants was measured by activity-based immunoassay (ProAxis, Belfast, UK) as previously described.¹⁸

Western blot

To investigate the degradation of SLPI in bronchiectasis airway sputum, the samples were subjected to denaturing gel electrophoresis on 15% SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) gels before being transferred to nitrocellulose. After blocking with 5% skimmed milk in phosphate-buffered saline supplemented with Tween 20 (PBST), the membranes were incubated overnight in anti-SLPI antibody at 0.1 $\mu\text{g/mL}$ (catalogue no AF1274; R&D Systems) at 4°C . After incubation with Anti-goat HRP (catalogue no 1721034; BioRad, Watford, UK) at 1/2500 dilution for 1 hour, the blot was washed thoroughly in PBST before SLPI proteins were visualised using Millipore Immobilon Western Chemiluminescent HRP substrate (catalogue no WBKLS0100) used as per manufacturer's recommendation. A representative autoradiographic film is shown.

Air-liquid interface nasal epithelial cell culture

Nasal basal epithelial cells obtained from healthy subjects and patients with bronchiectasis were grown and seeded into 24-well transwell inserts at p2 or p3. Cells were fully differentiated into ciliated air-liquid interface cultures using Pneumocult ALI+media (Stemcell Technologies, Cambridge, UK). Cells were apically treated with 100 μL /well of phosphate-buffered saline (PBS) (control), NE at 3 $\mu\text{g/mL}$ (Sigma, elastase from human leucocyte, E8140-1UN), with or without elastase inhibitor (AstraZeneca, AZD9668) at 10 nM (a dose sufficient to completely block elastase activity as determined in preliminary experiments) or inhibitor alone. After 30 min of incubation at 37°C , apical supernatants were collected. An additional 100 μL /well PBS was used to wash the apical surface of the cells and added to the corresponding supernatants. Baseline characteristics of healthy controls are described in the Methods section of the online supplementary data.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using SPSS V.22. Categorical variables are presented as frequencies and percentages and comparisons performed using χ^2 test or Fisher's exact test when required. Continuous variables are presented as mean and SD in parametrical variables and as median and IQR in non-parametrical ones. Differences were analysed using Student's t-test, analysis of variance test or their corresponding non-parametrical test when required (Kruskal-Wallis and Mann-Whitney U tests). The relationship between linear variables was studied using linear regression and Spearman rank correlation (r and p-value), with the latter included because relationships between inflammatory biomarkers were not assumed to be linear. Data are reported with the r and p-values derived from the Spearman

rank correlation. The contribution of different proteases to SLPI levels was studied with multiple linear regression. Exacerbation rate was analysed using a negative binomial model with time in study as an offset. Time to first exacerbation was modelled using Cox's proportional hazard regression. Exacerbation rate and time to first exacerbation were adjusted for BSI, site and fully adjusted for bronchiectasis severity, gender, aetiology, inhaled corticosteroid use and site. Patients lost to follow-up or dying within the 1-year follow-up were censored in the analysis. Discrimination between groups for the prediction of hospitalisation for severe exacerbations was tested using the area under the receiver operator characteristic curve. A p value <0.05 was considered significant.

RESULTS

Patient characteristics

A total of 135 adults with stable bronchiectasis were included in the study. Table 1 shows the baseline characteristics of the population. Mean age was 69 (± 10) years and 56% were females. The majority of patients had idiopathic or postinfective bronchiectasis and the mean BSI score was 8.0 (± 4.3) and FACED score was 2.4 (± 1.5), indicating moderate to severe bronchiectasis. Most of the patients (65%) were receiving inhaled long-acting bronchodilator treatment, whereas 43% were receiving inhaled corticosteroid treatment and 4% were receiving inhaled antibiotics. Three hundred and twenty-two exacerbations were recorded in the previous year, including 32 (10%) who require hospitalisation. Sixty-eight patients (50.4%) were frequent exacerbators defined as three or more exacerbations per year at baseline. Frequent exacerbators had worse lung function and more severe disease compared with non-frequent exacerbators (see online supplementary table E1).

AMP levels in sputum and blood

All measured AMP in patients with bronchiectasis were higher in sputum than in serum. Lactoferrin was the AMP with highest pulmonary expression, with a median (IQR) of 114.6 (45.7–250.6) $\mu\text{g/mL}$. In serum, lactoferrin levels were 4.3 (2.3–6.5) $\mu\text{g/mL}$. Lysozyme was the AMP with highest systemic expression with a median (IQR) of 5.8 (4.4–7.3) $\mu\text{g/mL}$. In sputum, lysozyme levels were 68.9 (42.1–105.2) $\mu\text{g/mL}$. LL-37 levels were 1444 (28.1–8054) ng/mL in sputum and 328.3 (204.3–533.1) ng/mL in serum while SLPI levels were 536.4 (161.7–2729) ng/mL in sputum and 120.8 (85.6–152.2) ng/mL in serum.

No correlations between pulmonary and systemic AMP levels were found. Spearman rank correlation between sputum and serum lactoferrin was $r = -0.05$ ($p = 0.59$), between sputum and serum lysozyme was $r = 0.06$ ($p = 0.49$), between sputum and serum LL-37 was $r = 0.08$ ($p = 0.36$) and between sputum and serum SLPI was $r = 0.03$ ($p = 0.73$).

AMP levels and disease severity

Patients with severe disease had elevated LL-37 levels and lower SLPI levels. Using the BSI score, the highest sputum LL-37 levels were detected in patients with severe BSI score in comparison to patients with moderate and mild disease (3835 (56.9–13 502) vs 108.2 (21.1–6456) vs 148.7 (17.3–2743) ng/mL , $p = 0.007$). Sputum SLPI levels were the lowest in the most severe group in comparison to moderate and mild patients (341.6 (88.8–1635) vs 608.5 (275.9–2678) vs 875.5 (444.1–7415) ng/mL , $p = 0.004$) (figure 1). Using the FACED score, similar relationships were observed to those seen with BSI although overall group differences were not statistically significant ($p = 0.05$ and $p = 0.1$,

Table 1 Patient demographics, clinical characteristics and prior treatments

	Patients (N=135)
Age (mean \pm SD)	69.1 (10.5)
Male	59 (43.7)
Smoking status	
Never	82 (60.7)
Ex-smoker	23 (17.0)
Current	30 (22.2)
Comorbidities	
Cardiovascular disease	32 (23.7)
Diabetes mellitus	13 (9.6)
Stroke	12 (8.9)
Treatment	
Inhaled bronchodilators	88 (65.2)
Inhaled corticosteroids	59 (43.7)
Inhaled antibiotics	6 (4.4)
Chronic macrolide therapy	31 (23.0)
FEV ₁ (% predicted) (mean \pm SD)	78.3 (28.3)
FVC (% predicted) (mean \pm SD)	94.3 (27.0)
BMI (kg/m ²) (mean \pm SD)	25.9 (5.6)
Aetiology	
Idiopathic	61 (45.2)
Postinfective	22 (16.3)
Post-tuberculosis	12 (8.9)
COPD	12 (8.9)
Rheumatoid arthritis	6 (4.4)
CTD	4 (3.0)
ABPA	4 (3.0)
Primary ciliary dyskinesia	3 (2.2)
Inflammatory bowel disease	3 (2.2)
Asthma	3 (2.2)
Haematological malignancy-associated immunodeficiency	2 (1.5)
Young syndrome	2 (1.5)
Specific antibody deficiency	1 (0.7)
Exacerbations in previous 12 months	
0	24 (17.8)
1	28 (20.7)
2	15 (11.1)
3	20 (14.8)
≥ 4	48 (35.6)
BSI (mean \pm SD)	8.0 (4.3)
FACED (mean \pm SD)	2.4 (1.5)

Data are expressed by n (%) as otherwise is indicated

ABPA, allergic bronchopulmonary aspergillosis; BMI, body mass index; BSI, Bronchiectasis Severity Index; COPD, chronic obstructive pulmonary disease; CTD, connective tissue disease; FEV₁, forced expiratory volume in 1 s; FVC, forced vital capacity.

respectively; see online supplementary figure E1). No correlation among systemic AMP levels and disease severity were found.

A weak inverse significant correlation was also observed between sputum LL-37 ($r = -0.25$, $p = 0.004$), lactoferrin

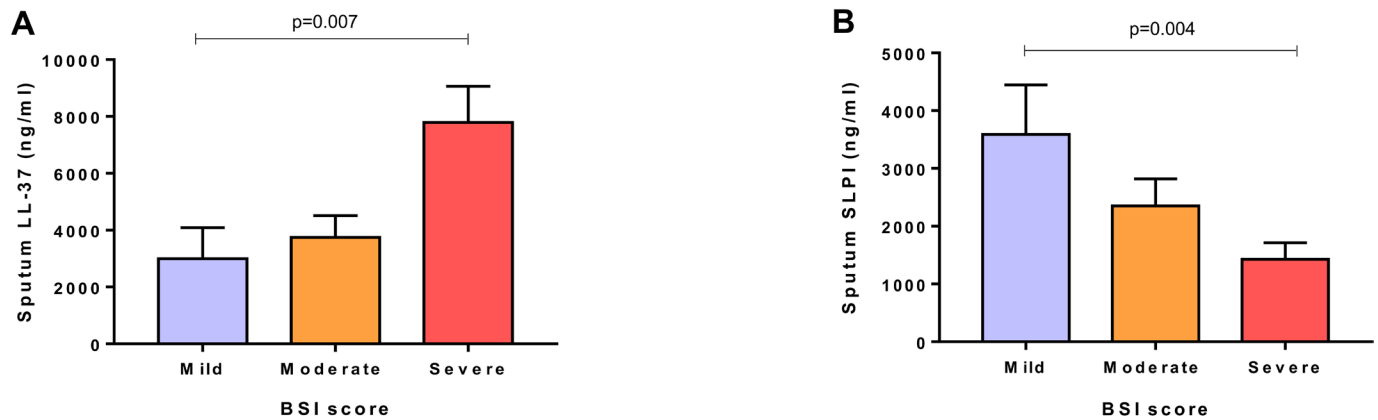


Figure 1 Association of sputum antimicrobial peptide levels and severity of disease. (A) Sputum LL-37 levels and Bronchiectasis Severity Index (BSI) score divided into mild (0–4 points), moderate (5–8 points) and severe (≥ 9 points). (B) Sputum SLPI and BSI score divided into mild, moderate and severe. P values are obtained by Kruskal-Wallis test. Graphs are represented as mean and SEM.

($r = -0.23$, $p = 0.006$) and lysozyme ($r = -0.19$, $p = 0.02$) with FEV₁, whereas sputum levels of SLPI had a weak correlation ($r = 0.17$, $p = 0.05$) (see online supplementary figure E2). No correlations between serum determinations and lung function tests were observed.

Frequent exacerbators had significant lower airway SLPI compared with infrequent and non-exacerbators (350.2 (101.7–2583) vs 560.7 (269.2–2424) vs 934.3 (385.1–7206) ng/mL, $p = 0.01$). Sputum lysozyme, lactoferrin and LL-37 were not associated with baseline exacerbation frequency (see online supplementary figure E3). Systemic AMP levels were not associated with exacerbation frequency.

AMP levels and airway infection

Sputum cultures were positive for bacteria in 86 patients (64%) and negative in 49 (36%). *P. aeruginosa* was the most frequently isolated pathogen in sputum culture ($n = 39$, 29%), followed by *Haemophilus influenzae* ($n = 31$, 23%), *Staphylococcus aureus* ($n = 6$, 4%), *Escherichia coli* ($n = 3$, 2%), *Moraxella catarrhalis* ($n = 2$, 1%), *Stenotrophomonas* ($n = 2$, 1%), *Streptococcus pneumoniae* ($n = 2$, 1%) and *Serratia marcescens* ($n = 1$, 0.7%). Clinical characteristics of patients grouped according to the presence of *P. aeruginosa*, other pathogens or negative sputum culture (who were considered non-infected) are showed online (see online supplementary table E2).

When compared with patients infected by other pathogens and non-infected patients, patients with bronchiectasis with *P. aeruginosa* showed significantly higher sputum LL-37 levels (3835 (72.2–12 435) vs 2425 (36.2–9658) vs 57.8 (17.1–3651) ng/mL, $p = 0.002$), higher sputum lactoferrin levels (190.7 (68.1–364.3) vs 99.2 (40.4–250.6) vs 79.3 (45.7–201.1) ng/mL, $p = 0.04$) and lower sputum SLPI levels (363.3 (103.7–739.7) vs 753.3 (161.7–2624) vs 1066 (309.5–6245) ng/mL, $p = 0.001$) (figure 2). No differences in systemic AMP levels were found between patients infected by *P. aeruginosa*, patients infected by other pathogens and non-infected patients.

No differences in sputum AMP levels were found when patients with and without chronic macrolide treatment and inhaled corticosteroids were compared. In addition, no differences were found among patients with and without nebulised antibiotics, although the small proportion of treated patients ($n = 6$, 4%) did not exclude a potentially effect (see online supplementary table E3).

AMP and elastase activity

A significant correlation between sputum LL-37 ($r = 0.36$, $p = 0.002$), sputum lactoferrin ($r = 0.38$, $p < 0.001$), sputum lysozyme ($r = 0.26$, $p = 0.03$) and elastase activity was found (see online supplementary figure E4). A previous study identified that in CF SLPI was degraded by NE into lower molecular weight cleavage products,¹⁹ while a further study found degradation by MMP-9.²⁰ We hypothesised that proteases activity in the bronchiectasis airway would be responsible for lower levels of SLPI. We found, however, no significant correlation between SLPI and elastase activity ($r = -0.09$, $p = 0.46$) or MMP-9 ($r = -0.13$, $p = 0.2$) (figure 3A,B). In multiple linear regression incorporating elastase activity and MMP-9, proteases accounted for a maximum of 23% of the variance in SLPI levels.

By western blot, we identified a heterogeneous pattern of SLPI cleavage with no association between NE activity and SLPI cleavage pattern (figure 3C). Based on previous work that suggest NE can prevent release of SLPI from lung epithelial cells,²¹ we tested whether exogenous NE inhibited SLPI secretion from primary airway epithelial cells. We observed that nasal epithelial cells from controls and bronchiectasis secreted similar amounts of SLPI (301.6 (167.4–676.4) vs 163.1 (128.8–340.4), $p = 0.46$) (figure 3D). The addition of exogenous elastase decreased the secretion of SLPI to 21.6% (13.8%–37.7%) of the secretion from cells treated with control buffer ($p = 0.03$). The NE inhibitor alone had no significant impact on SLPI release, while the addition of NE and inhibitor still resulted in the inhibition of SLPI release suggesting that this effect was independent of NE protease activity ($p = 0.028$) (figure 3E).

Longitudinal outcomes

One hundred and thirty-two out of 135 patients (98%) completed 12 months of follow-up. During this time, a total of 310 exacerbations have been recorded in 102 patients, including 36 severe exacerbations. The median number of exacerbations per patient was 2.0. In univariate analysis, patients with three or more exacerbations during follow-up had higher levels of LL-37 (2976 (48.8–15 472) vs 416.4 (21.8–7251) vs 61.4 (19.8–2865) ng/mL, $p = 0.02$) and lower levels of SLPI (316.3 (89.9–944.1) vs 753.3 (343.1–3914) vs 1261 (265.2–6521) ng/mL, $p < 0.001$) in comparison to those patients with one or two exacerbations and patients without exacerbations (figure 4).

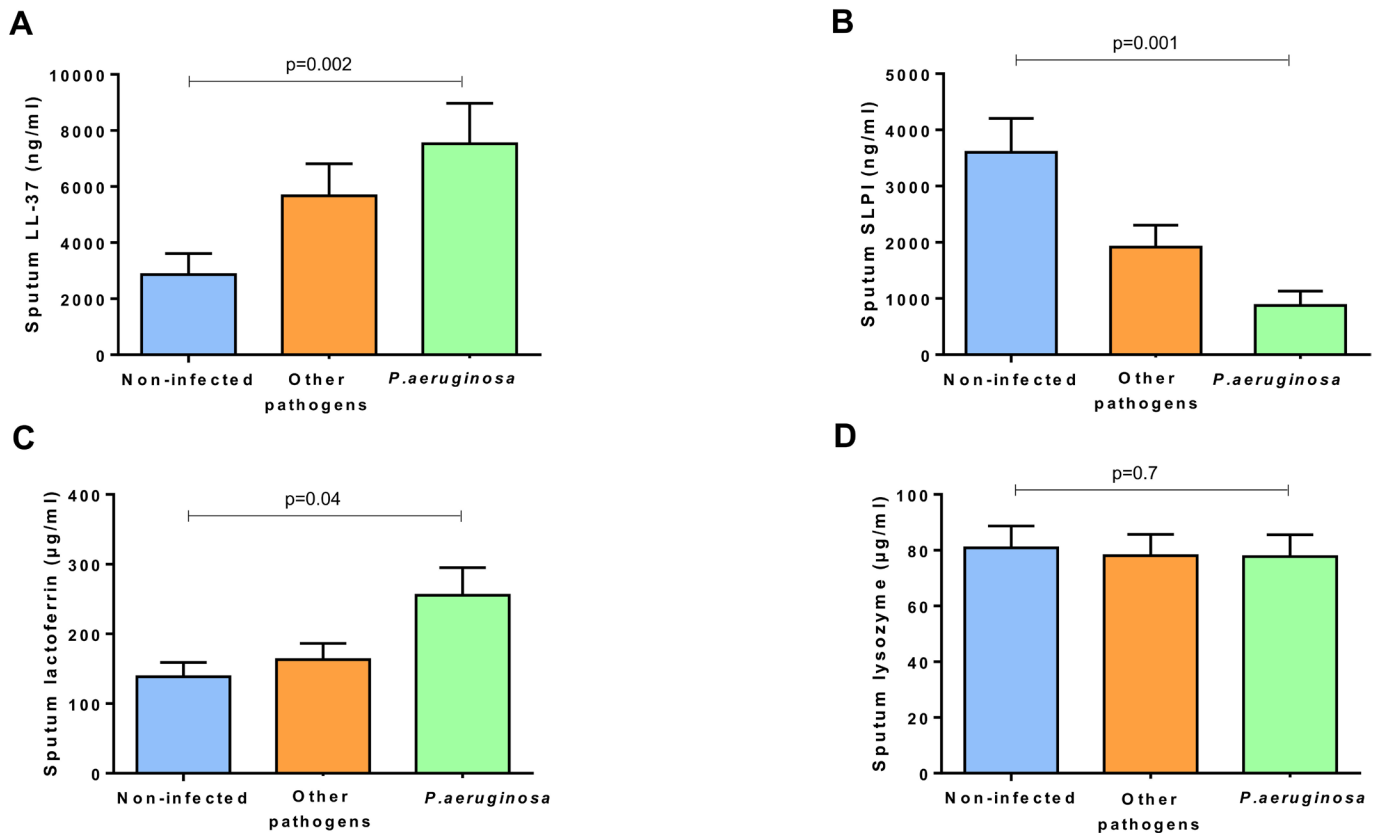


Figure 2 Sputum antimicrobial peptide levels: (A) LL-37, (B) SLPI, (C) lactoferrin and (D) lysozyme, and the presence of airway infection. Patients are divided into non-infected, infected by other pathogens different than *Pseudomonas aeruginosa* and infected by *P. aeruginosa*. P values are obtained by Kruskal-Wallis test. Graphs are represented as mean and SEM.

In an exploratory analysis, we examined outcomes for patients above and below a cut-off representing the median of the population (to the nearest whole number). Patients with LL-37 ≥ 1500 ng/mL had a higher frequency of exacerbations (incidence rate ratio (IRR) 1.57, 95% CI 1.04 to 2.37, $p=0.02$). Patients also had a shorter time to next exacerbation with LL-37 levels above the median for the population (HR 1.68, 95% CI 1.13 to 2.50, $p=0.01$). These findings persisted after adjusting for BSI and site (see online supplementary table E4). LL-37 showed an area under the curve (AUC) of 0.76 (0.65–0.86), $p<0.0001$ for predicting hospitalisation (see online supplementary Figure E5).

For SLPI, low levels were not significantly associated with a higher frequency of exacerbations (IRR 0.76, 95% CI 0.50 to 1.51, $p=0.1$) but did demonstrate a shorter time to next exacerbation when a cut-off of 1000 ng/mL was used (HR 0.63, 95% CI 0.42 to 0.94, $p=0.02$) (figure 4). After adjusting for BSI and site, a trend to predict the time to first exacerbation was observed (see online supplementary table E4). SLPI showed an AUC of 0.74 (0.62–0.86), $p<0.0001$ for predicting hospitalisation for severe exacerbation (see online supplementary figure E5).

DISCUSSION

This study demonstrates that airway AMP, especially high LL-37 and low SLPI sputum levels are associated with disease severity, disease activity and airway infection in patients with bronchiectasis. In addition, patients with higher levels of LL-37 and lower levels of SLPI had a shorter time to the next exacerbation and an increased frequency of exacerbations during follow-up. The relationships between LL-37 and SLPI and both prior and future exacerbations suggest that

dysregulation of AMP may be one of the mechanisms underlying the frequent exacerbator phenotype in bronchiectasis. Our findings suggested that AMP may be ineffective as an innate host defence mechanism, especially in those bronchiectasis patients with severe disease and with chronic *P. aeruginosa* infection. This fact may contribute to maintaining a vicious cycle of increased inflammation without eliminating bacterial infection. If further validated in prospective larger studies, LL-37 and SLPI could represent novel biomarkers to predict future risk of exacerbations in patients with bronchiectasis.

AMPs are important in host defence against bacteria, viruses and fungi.⁵ They are produced by respiratory epithelial cells, neutrophils and macrophages and play an important role in innate lung defence.^{6,8} Although no previous comprehensive studies of AMP in bronchiectasis have been conducted, our results complement and extend previous observations in other chronic airway diseases such as chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and CF. In COPD, increased sputum levels of LL-37 were associated with airflow limitation, health status and exercise tolerance,²² and lower sputum lysozyme and SLPI levels were detected in patients with bacterial colonisation and during acute infectious exacerbations.²³ In bronchiectasis, one previous study demonstrated that high levels of sputum LL-37 were detected in patients chronically infected with *P. aeruginosa*.²⁴ In our study, we demonstrated that elevated sputum LL-37 and reduced sputum SLPI levels were associated with disease severity, worse lung function and the presence of airway infection, especially due to *P. aeruginosa*. In addition, sputum lactoferrin and lysozyme levels were also associated to worse lung function and sputum SLPI were lower in frequent

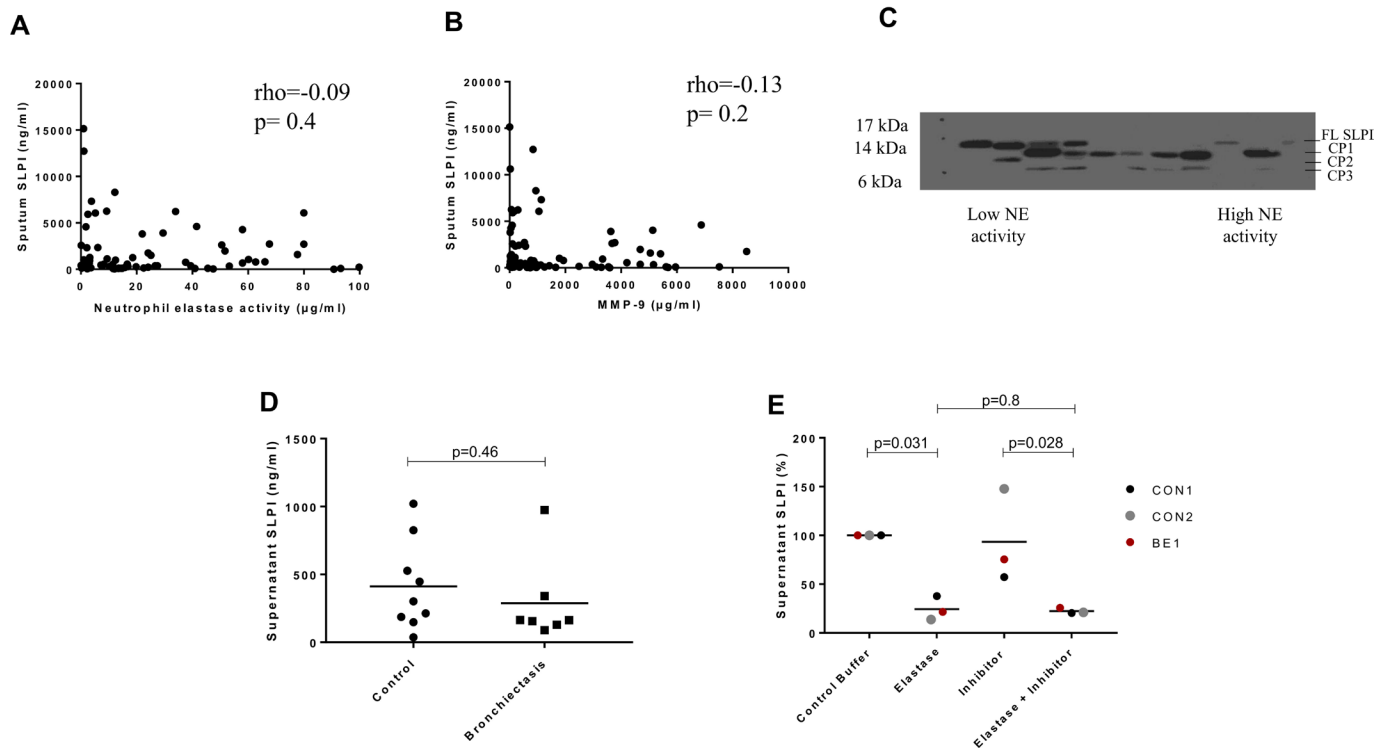


Figure 3 (A) Relationship between sputum SLPI and neutrophil elastase activity. (B) Relationship between sputum SLPI and sputum MMP-9 levels. Rho and p-values were obtained from Spearman rank correlation. (C) Western blot demonstrating degradation pattern of SLPI in sputum. Each column represents an individual patient ordered from left to right in terms of increasing sputum neutrophil elastase activity (measured by immunoassay as described in the Methods section). (D) SLPI secretion from nasal epithelial cells of control and patients with BE. (E) SLPI secretion from control (CON1 and CON2) and BE nasal epithelial cells untreated (control buffer) or treated with elastase, inhibitor or a mixture of elastase and inhibitor. BE, bronchiectasis; CP1, cleavage product 1; CP2, cleavage product 2; CP3, cleavage product 3; FL SLPI, full-length secretory leucocyte protease inhibitor; MMP-9, matrix metalloproteinase 9; NE, neutrophil elastase.

exacerbators. Local production of AMP in the lung, probably related to chronic airway inflammation, is likely to be the key mechanism in bronchiectasis, since we observed much higher levels in sputum than in serum and no relationship between serum levels and disease severity.

LL-37 is a human cathelicidin produced by neutrophils and epithelial cells in response to pro-inflammatory stimuli including cytokines, pathogen-associated molecular patterns and tissue injury.²⁵ LL-37 displays antimicrobial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria, fungi and viruses, neutralises Lipopolysaccharide (LPS) activity and protects against endotoxic shock.²⁶ In addition, it is involved in the regulation of inflammation, cell proliferation and apoptosis.²⁷ In our study, we demonstrated that high pulmonary levels of LL-37 are associated to disease severity, worse lung function and airway infection. It may seem contradictory that the presence of airway infection and exacerbation risk is associated with higher levels of an AMP that should reduce infection. However, previous studies primarily in CF have demonstrated that the interaction of LL-37 with DNA and with glycosaminoglycan in the inflamed lung impairs the antibacterial function of LL-37 and its ability to neutralise LPS.^{28,29} LL-37 is, therefore, able to enhance mucus production and promote inflammation while losing its antimicrobial activity.³⁰ These previous findings likely explain the high levels of LL-37 identified in our study and how LL-37 may contribute to poor outcomes.

Bacterial clearance is the primary function of AMP. However, some pathogens, especially *P. aeruginosa*, have developed different process of adaptation to innate immune

clearance mechanisms in the lung, such as creation of biofilms, resistance to inflammasome-mediated clearance and resistance to AMP.¹¹ A recent study evaluating *P. aeruginosa* populations using whole-genome sequencing in patients with bronchiectasis showed that *P. aeruginosa* populations adapt by accumulating loss-of-function mutations. This fact leads to changes in phenotypes including different modes of iron acquisition and variations in biofilm-associated polysaccharides.¹⁰ These findings may explain why, despite an appropriate host response increasing AMP secretion, *P. aeruginosa* persists in the lungs and the elevated AMP levels could contribute to perpetuate an excessive inflammatory response, impacting negatively on clinical outcomes.

In contrast to the LL-37 data, in our study sputum levels of SLPI were lower in the most severe patients and in those infected by *P. aeruginosa*. The main function of SLPI is to protect local tissue from the detrimental consequences of inflammation, as a result of its antiprotease activity and anti-inflammatory properties.^{7,31} Previous studies have demonstrated decreased levels of SLPI in patients with CF infected with *P. aeruginosa* due to NE degradation.¹⁹ In keeping with the emerging data that CF and bronchiectasis have highly diverging pathophysiology, we found a different relationship in bronchiectasis. SLPI levels were not related to sputum NE activity or MMP-9 levels. SLPI degradation was heterogeneous with multiple cleavage products and was unrelated to elastase activity in sputum. Most patients, even those with high levels of SLPI by ELISA, had evidence of SLPI degradation suggesting that functional SLPI deficiency may be present even in patients

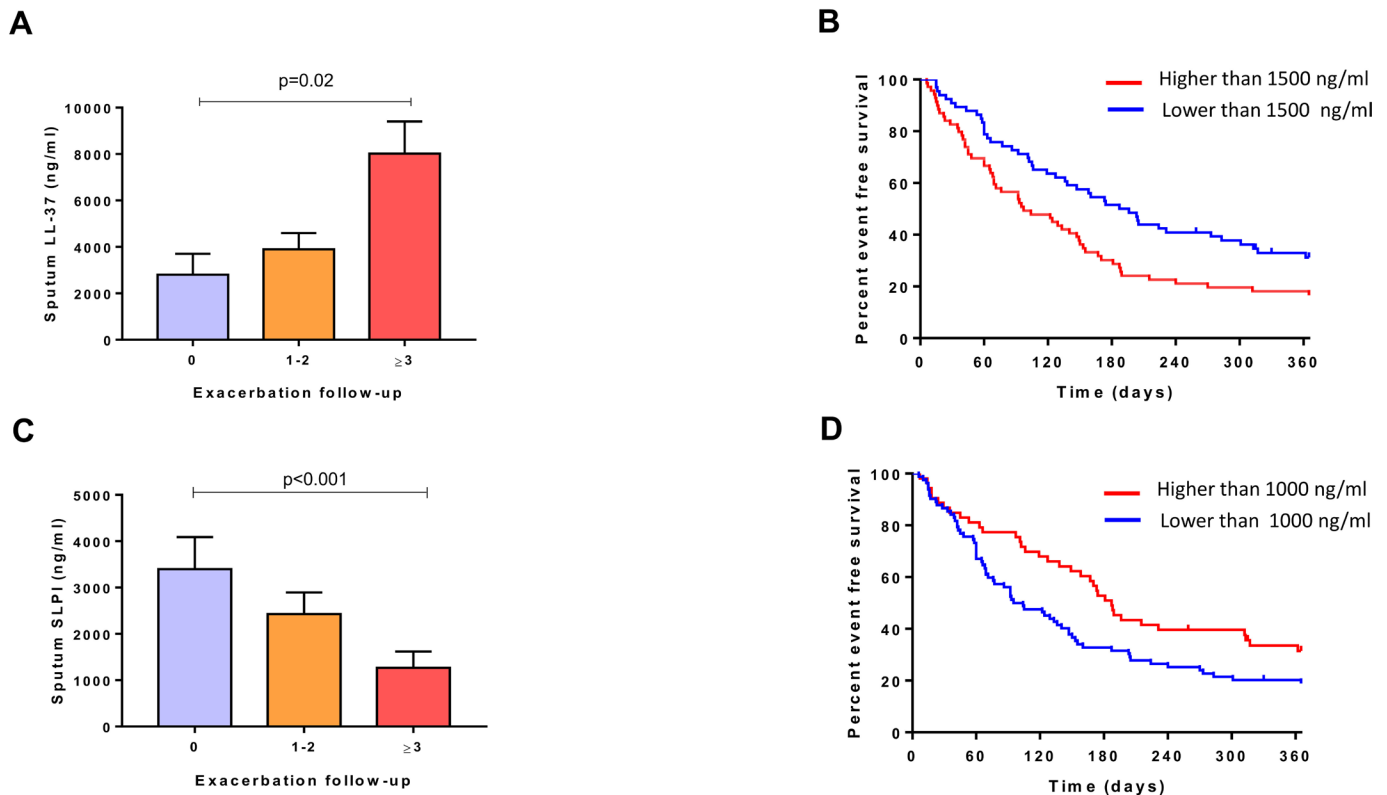


Figure 4 (A) Sputum SLPI levels and frequency of exacerbations during 1-year follow-up. (B) Time to next exacerbation. Percentage of patients free of exacerbation using LL-37 1500 ng/mL as a cut-off (HR 1.68 (95% CI 1.13 to 2.50), $p=0.01$). (C) Sputum SLPI levels and frequency of exacerbations during 1-year follow-up. (D) Time to next exacerbation. Percentage of patients free of exacerbation using SLPI 1000 ng/mL as a cut-off (HR 0.63 (95% CI 0.42 to 0.94), $p=0.02$). P values in panels A and C are obtained by Kruskal-Wallis test. Graphs are represented as mean and SEM.

with preserved protein levels. Our data suggest that multiple proteases such as matrix metalloproteinases and cathepsins are likely contributing to SLPI deficiency in the airway. However, protease levels only accounted for a maximum of 23% of the variance in sputum SLPI levels, suggesting an important contribution from reduced SLPI production. In addition, our data demonstrate that elastase reduces the release of SLPI from epithelial cells independent of its protease activity, as previous data suggested.²¹ Other studies have generated a variant of SLPI resistant to degradation by NE.³² However, our data have important therapeutic implications since NE inhibitors that are in development for the treatment of bronchiectasis would not be expected to restore normal SLPI function in view of our findings.

Our study has limitations. First, this study was exploring multiple biomarkers and so we acknowledge the risk of spurious associations as a result of multiple statistical comparisons. We addressed this, however, by looking at baseline data with multiple markers and then focusing our prospective follow-up study on LL-37 and SLPI only, markers which had shown a clear association with disease severity at baseline. The finding of consistent results during follow-up makes spurious associations very unlikely. Our results were consistent, biologically plausible and robust across all studied AMPs. Second, the absence of a control group prevents the comparison of AMP levels of patients with bronchiectasis and healthy subjects. And finally, although our study is the largest of AMP in bronchiectasis, using well-characterised patients in multi-centre and international study, it is not possible to clarify if dysregulated AMP levels are markers of disease severity more than a cause of exacerbation, and further studies are needed

to better clarify this point. Our study did not explore how sputum biomarkers could be implemented into clinical practice, which may be limited because of the need for sputum processing.

In conclusion, we found that patients with bronchiectasis show dysregulated AMP characterised by elevated proinflammatory LL-37, lactoferrin and lysozyme with reduced anti-inflammatory SLPI. The frequent exacerbator phenotype is associated with increased levels of LL-37 and degradation of SLPI, providing the first biological characterisation of this key phenotype.

Contributors Study design: OS, SA, JDC. Patient recruitment and data collection: OS, LP, AS, GS-C, AR-T, FB, SA, JDC. Performed experiments and sample processing: LP, EC, AS, DC, AS, HRK, MO, SO, SV. Writing the manuscript: OS, LP, JDC. Revising of the manuscript and approval of submission: all authors. Responsible for the overall content as guarantors: OS, JDC.

Funding European Respiratory Society through the EMBARC2 consortium, Instituto de Salud Carlos III (PI18/00311), Fundació Catalana de Pneumologia (FUCAP), Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica (SEPAR) and a research Grant from Zambon. OS is supported by PERIS. JDC is supported by the GSK/British Lung Foundation Chair of Respiratory Research.

Competing interests None declared.

Patient consent for publication Obtained.

Provenance and peer review Not commissioned; externally peer reviewed.

Data availability statement All data relevant to the study are included in the article or uploaded as supplementary information.

REFERENCES

- 1 Polverino E, Goeminne PC, McDonnell MJ, *et al*. European Respiratory Society guidelines for the management of adult bronchiectasis. *Eur Respir J* 2017;50.

- 2 Chalmers JD, Aliberti S, Filonenko A, *et al.* Characterization of the "Frequent Exacerbator Phenotype" in Bronchiectasis. *Am J Respir Crit Care Med* 2018;197:1410–20.
- 3 Chalmers JD, Smith MP, McHugh BJ, *et al.* Short- and long-term antibiotic treatment reduces airway and systemic inflammation in non-cystic fibrosis bronchiectasis. *Am J Respir Crit Care Med* 2012;186:657–65.
- 4 Araújo D, Shteinberg M, Aliberti S, *et al.* The independent contribution of *Pseudomonas aeruginosa* infection to long-term clinical outcomes in bronchiectasis. *Eur Respir J* 2018;51.
- 5 Peters BM, Shirliff ME, Jabra-Rizk MA. Antimicrobial peptides: primeval molecules or future drugs? *PLoS Pathog* 2010;6:e1001067.
- 6 Bals R, Hiemstra PS. Innate immunity in the lung: how epithelial cells fight against respiratory pathogens. *Eur Respir J* 2004;23:327–33.
- 7 Doumas S, Kolokotronis A, Stefanopoulos P. Anti-inflammatory and antimicrobial roles of secretory leukocyte protease inhibitor. *Infect Immun* 2005;73:1271–4.
- 8 Beisswenger C, Bals R. Functions of antimicrobial peptides in host defense and immunity. *Curr Protein Pept Sci* 2005;6:255–64.
- 9 Wah J, Wellek A, Frankenberger M, *et al.* Antimicrobial peptides are present in immune and host defense cells of the human respiratory and gastrointestinal tracts. *Cell Tissue Res* 2006;324:449–56.
- 10 Hilliam Y, Moore MP, Lamont IL, *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* adaptation and diversification in the non-cystic fibrosis bronchiectasis lung. *Eur Respir J* 2017;49. doi:10.1183/13993003.02108-2016
- 11 Riquelme SA, Ahn D, Prince A. *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae* Adaptation to Innate Immune Clearance Mechanisms in the Lung. *J Innate Immun* 2018;10:442-454.
- 12 Angrill J, Agusti C, De Celis R, *et al.* Bronchial inflammation and colonization in patients with clinically stable bronchiectasis. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164:1628–32.
- 13 Miller MR, Hankinson J, Brusasco V, *et al.* Standardisation of spirometry. *Eur Respir J* 2005;26:319–38.
- 14 Suarez-Cuartin G, Chalmers JD, Sibila O. Diagnostic challenges of bronchiectasis. *Respir Med* 2016;116:70–7.
- 15 Chalmers JD, Goeminne P, Aliberti S, *et al.* The bronchiectasis severity index. An international derivation and validation study. *Am J Respir Crit Care Med* 2014;189:576–85.
- 16 Martínez-García Miguel Á, de Gracia J, Vendrell Relat M, *et al.* Multidimensional approach to non-cystic fibrosis bronchiectasis: the FACED score. *Eur Respir J* 2014;43:1357–67.
- 17 Sibila O, Suarez-Cuartin G, Rodrigo-Troyano A, *et al.* Secreted mucins and airway bacterial colonization in non-CF bronchiectasis. *Respirology* 2015;20:1082–8.
- 18 Chalmers JD, Moffitt KL, Suarez-Cuartin G, *et al.* Neutrophil elastase activity is associated with exacerbations and lung function decline in bronchiectasis. *Am J Respir Crit Care Med* 2017;195:1384–93.
- 19 Weldon S, McNally P, McElvaney NG, *et al.* Decreased levels of secretory leucoprotease inhibitor in the *Pseudomonas*-infected cystic fibrosis lung are due to neutrophil elastase degradation. *J Immunol* 2009;183:8148–56.
- 20 Vandooren J, Goeminne P, Boon L, *et al.* Neutrophils and Activated Macrophages Control Mucosal Immunity by Proteolytic Cleavage of Antileukoprotease. *Front Immunol* 2018;9:1154.
- 21 Sullivan AL, Dafforn T, Hiemstra PS, *et al.* Neutrophil elastase reduces secretion of secretory leukoprotease inhibitor (SLPI) by lung epithelial cells: role of charge of the proteinase-inhibitor complex. *Respir Res* 2008;9:60.
- 22 Jiang Y-Y, Xiao W, Zhu M-X, *et al.* The effect of human antibacterial peptide LL-37 in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Med* 2012;106:1680–9.
- 23 Parameswaran GI, Sethi S, Murphy TF. Effects of bacterial infection on airway antimicrobial peptides and proteins in COPD. *Chest* 2011;140:611–7.
- 24 Chalmers JD, McHugh BJ, Docherty C, *et al.* Vitamin-D deficiency is associated with chronic bacterial colonisation and disease severity in bronchiectasis. *Thorax* 2013;68:39–47.
- 25 Yang D, de la Rosa G, Tewary P, *et al.* Alarmins link neutrophils and dendritic cells. *Trends Immunol* 2009;30:531–7.
- 26 De Smet K, Contreras R. Human antimicrobial peptides: defensins, cathelicidins and histatins. *Biotechnol Lett* 2005;27:1337–47.
- 27 Bucki R, Leszczyńska K, Namiot A, *et al.* Cathelicidin LL-37: a multitask antimicrobial peptide. *Arch Immunol Ther Exp* 2010;58:15–25.
- 28 Bucki R, Byfield FJ, Janmey PA. Release of the antimicrobial peptide LL-37 from DNA/F-actin bundles in cystic fibrosis sputum. *Eur Respir J* 2007;29:624–32.
- 29 Bergsson G, Reeves EP, McNally P, *et al.* LL-37 complexation with glycosaminoglycans in cystic fibrosis lungs inhibits antimicrobial activity, which can be restored by hypertonic saline. *J Immunol* 2009;183:543–51.
- 30 Zhang Y, Jiang Y, Sun C, *et al.* The human cathelicidin LL-37 enhances airway mucus production in chronic obstructive pulmonary disease. *Biochem Biophys Res Commun* 2014;443:103–9.
- 31 Hiemstra PS, Maassen RJ, Stolk J, *et al.* Antibacterial activity of antileukoprotease. *Infect Immun* 1996;64:4520–4.
- 32 Camper N, Glasgow AMA, Osbourn M, *et al.* A secretory leukocyte protease inhibitor variant with improved activity against lung infection. *Mucosal Immunol* 2016;9:669–76.

Antimicrobial peptides, disease severity and exacerbations in Bronchiectasis

Oriol Sibila, Lidia Perea, Elisabet Cantó, Amelia Shoemark, Diane Cassidy, Alexandra Smith,
Guillermo Suarez-Cuartin, Ana Rodrigo-Troyano, Holly R Keir, Martina Oriano, Samantha Ong,
Silvia Vidal, Francesco Blasi, Stefano Aliberti, James D Chalmers.

ONLINE DATA SUPPLEMENT

METHODS

Air-liquid interface nasal epithelial cell culture

For the nasal cilia stuff, healthy controls were recruited from NHS Tayside and University of Dundee staff aged 25 to 60 years old. All controls had no history of rhinitis, asthma or other respiratory disease and were required to be free of upper respiratory tract infection for at least 6 weeks prior to nasal sampling.

RESULTS

AMP levels and FACED score

High sputum LL-37 levels were detected in patient with severe FACED score (7633 (719.1-21135) vs 2678 (30.1-9056) vs 329.6 (21.8-6412) ng/ml, $p=0.05$) while sputum SLPI levels were the lowest in the most severe group (236.2 (84.7-901.5) vs 769.7 (125.7-3592) vs 637.4 (296.0-3812) ng/ml, $p=0.1$) (**Figure E1**).

Table E1. Patient demographics, clinical characteristics and prior treatments among non-frequent exacerbators and frequent exacerbators.

	Non-frequent exacerbators (<i>n</i> = 67)	Frequent exacerbators (<i>n</i> = 68)	<i>P</i> value
Age (mean ± SD)	69.3 (±10.6)	68.7 (±10.5)	0.3
Male	32 (54.2)	27 (45.8)	0.3
Smoking status			
Never	44 (65.7)	38 (55.9)	0.1
Ex-smoker	13 (19.4)	10 (14.7)	
Current	10 (14.9)	20 (29.4)	
Comorbidities			
Cardiovascular disease	14 (20.9)	18 (26.5)	0.4
Diabetes mellitus	6 (9.0)	7 (10.3)	0.8
Stroke	5 (7.5)	7 (10.3)	0.6
Treatment			
Inhaled long-acting bronchodilator	35 (52.2)	53 (77.9)	0.002
Inhaled corticosteroids	24 (35.8)	35 (59.3)	0.07
Inhaled antibiotics	2 (4.0)	4 (7.0)	0.5
Chronic macrolide therapy	17 (25.4)	14 (20.6)	0.5
FEV ₁ (% pred) (mean ± SD)	87.5 (±27.7)	69.3 (±26.2)	<0.0001
FVC (% pred) (mean ± SD)	101.6 (±26.1)	87.1 (±26.2)	0.004
BMI (kg/m ²) (mean ± SD)	26.4 (±4.4)	25.4 (±6.5)	0.06
Aetiology			
Idiopathic	33 (49.3)	28 (41.2)	0.1
Post-infective	12 (17.9)	10 (14.7)	
Post-TBC	8 (11.9)	4 (5.9)	
Others	14 (20.9)	26 (38.2)	
Exacerbations previous 12 months			
0	24 (35.8)	0 (0.0)	<0.0001
1	28 (41.8)	0 (0.0)	
2	15 (22.4)	0 (0.0)	
3	0 (0.0)	20 (29.4)	
4 or more	0 (0.0)	48 (70.6)	
BSI (mean ± SD)	5.8 (±3.0)	10.3 (±4.3)	<0.0001
FACED (mean ± SD)	2.1 (±1.4)	2.6 (±1.7)	0.1

Data are presented as n(%) unless otherwise indicated.

BMI, body mass index; BSI, Bronchiectasis Severity Index; FEV₁, forced expiratory volume in 1 s; FVC, forced vital capacity; PPB, potentially pathogenic bacteria; TBC, tuberculosis; SD, standard deviation.

Table E2. Patient demographics, clinical characteristics and prior treatments among non-infected, infected by *P. aeruginosa* and infected by other pathogens

	Non-infected (n = 49)	Infected by other pathogens (n = 47)	Infected by <i>P. aeruginosa</i> (n = 39)	P value
Age (mean ± SD)	67.8 (10.6)	70.9 (10.6)	68.7 (10.3)	0.4
Male	17 (34.7)	24 (51.1)	18 (46.2)	0.3
Smoking status				
Never	31 (63.3)	24 (51.1)	27 (69.2)	0.2
Ex-smoker	9 (18.4)	7 (14.9)	7 (17.9)	
Current	9 (18.4)	16 (34.0)	5 (12.8)	
Comorbidities				
Cardiovascular disease	10 (20.4)	11 (23.4)	11 (28.2)	0.7
Diabetes mellitus	6 (12.2)	6 (12.8)	1 (2.6)	0.2
Stroke	4 (8.2)	4 (8.5)	4 (10.3)	0.9
Treatment				
Long-acting bronchodilator	28 (57.1)	27 (57.4)	34 (85)	0.01
Inhaled corticosteroids	15 (30.6)	24 (51.1)	20 (51.3)	0.07
Inhaled antibiotics	0 (0)	4 (8.5)	2 (5)	0.1
Chronic macrolide therapy	12 (24.5)	9 (19.1)	10 (25.6)	0.7
FEV ₁ (% pred) (mean ± SD)	85.5 (23.5)	83.6 (29.3)	62.8 (27.3)	<0.001
FVC (% pred) (mean ± SD)	98.1 (23.7)	99.7 (26.2)	83.1 (29.2)	0.008
BMI (kg/m ²) (mean ± SD)	26.3 (5.6)	27.6 (5.7)	23.3 (4.2)	0.001
Bronchiectasis etiology				
Idiopathic	16 (32.7)	29 (61.7)	16 (41.0)	0.1
Post-infective	9 (18.4)	6 (12.8)	7 (17.9)	
Post-tuberculosis	6 (12.2)	1 (2.1)	5 (12.8)	
Others	18 (36.7)	11 (23.4)	11 (28.2)	
Exacerbations previous 12 months				
0	13 (26.5)	9 (19.1)	2 (5.1)	0.1
1	13 (26.5)	8 (17.0)	7 (17.9)	
2	5 (10.2)	4 (8.5)	6 (15.4)	
3	8 (16.3)	6 (12.8)	6 (15.4)	
4 or more	10 (20.4)	20 (42.6)	18 (46.2)	
BSI (mean ± SD)	5.7 (3.2)	7.7 (3.8)	11.5 (4.0)	<0.001
FACED (mean ± SD)	1.7 (1.2)	1.9 (1.1)	3.73 (1.4)	<0.001

Data are presented as n(%) unless otherwise indicated.

BMI, body mass index; BSI, Bronchiectasis Severity Index; FEV₁, forced expiratory volume in 1 s; FVC, forced vital capacity; PPB, potentially pathogenic bacteria; SD, standard deviation.

Table E3.- Sputum LL-37, SLPI, lactoferrin and lysozyme levels in bronchiectasis patients with and without inhaled antibiotic treatment, chronic macrolide therapy and inhaled corticosteroids treatment.

	No chronic macrolides n=104 (77%)	Chronic macrolides n= 31 (27%)	p-value
Sputum LL-37 (ng/ml)	2440.4 (18.4-7422.1)	26.0 (11.4-10667.6)	0.3
Sputum SLPI (ng/ml)	535.2 (191.6-2610.3)	637.4 (89.9-4042.3)	0.6
Sputum Lactoferrin (µg/ml)	118.5 (50.2-248.3)	55.7 (37.0-300.4)	0.2
Sputum Lysozyme (µg/ml)	69.2 (42.1-106.0)	63.7 (37.2-95.2)	0.7

	No ICS n=76 (56%)	ICS n= 59 (44%)	p-value
Sputum LL-37 (ng/ml)	1986.3 (17.6-6074.7)	361.9 (12.1-12334.0)	0.6
Sputum SLPI (ng/ml)	659.0 (173.4-4220.4)	509.9 (129.0-2569.0)	0.5
Sputum Lactoferrin (µg/ml)	117.5 (49.5-239.8)	113.5 (40.39-285.0)	0.7
Sputum Lysozyme (µg/ml)	68.4 (37.5-103.0)	75.6 (42.5-106.2)	0.9

	No inhaled antibiotic n= 129 (96%)	Inhaled antibiotic n=6 (4%)	p-value
Sputum LL-37 (ng/ml)	1443.7 (17.0-8108.1)	2654.7 (29.2-9348.6)	0.3
Sputum SLPI (ng/ml)	560.7 (178.5-3534.5)	246.1 (94.7-861.2)	0.8
Sputum Lactoferrin (µg/ml)	114.6 (46.1-246.0)	136.9 (43.3-385.5)	0.6
Sputum Lysozyme (µg/ml)	69.5 (42.3-105.6)	41.6 (19.1-114.4)	0.5

Data are presented as median (Interquartile range). ICS: Inhaled corticosteroids

Table E4.- Analysis of negative binomial model with adjustments.

		IRR	95% CI	p-value
LL-37 \geq1500 ng/ml				
Exacerbation Rate	Unadjusted	1.57	1.04-2.37	0.02
	Adjusted for BSI	1.53	1.01-2.31	0.04
	Adjusted for site	1.52	1.01-2.28	0.046
Time to first exacerbation	Unadjusted	1.68	1.13-2.50	0.01
	Adjusted for BSI	1.58	1.05-2.36	0.029
	Adjusted for site	1.68	1.11-2.56	0.015
SLPI <1000 ng/ml				
Exacerbation Rate	Unadjusted	0.76	0.50-1.15	0.1
	Adjusted for BSI	0.77	0.50- 1.17	0.2
	Adjusted for site	0.73	0.48- 1.11	0.1
Time to first exacerbation	Unadjusted	0.63	0.42-0.94	0.02
	Adjusted for BSI	0.68	0.45-1.03	0.067
	Adjusted for site	0.70	0.46-1.05	0.085

FIGURES

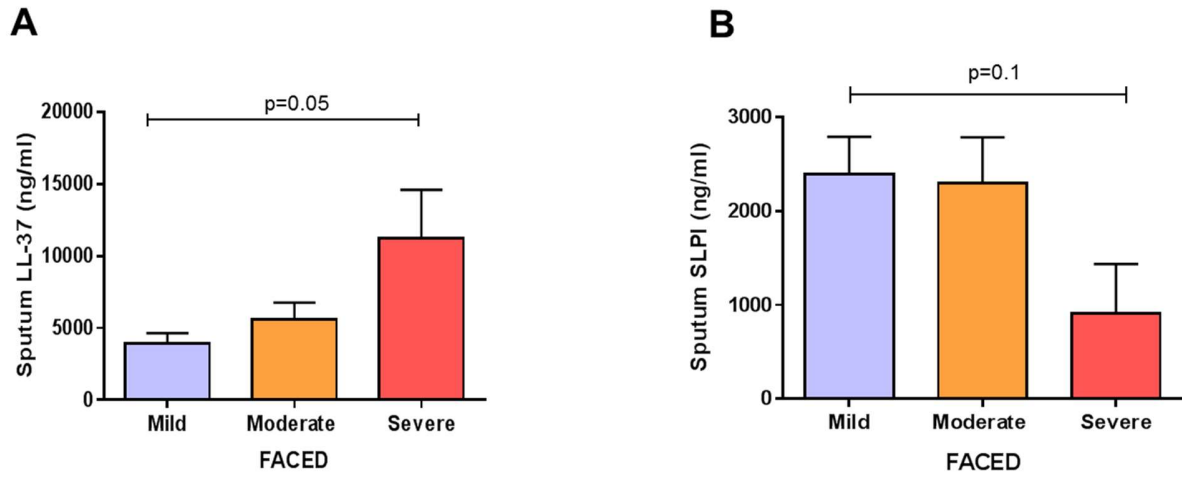


Figure E1. A: Sputum LL-37 levels of Faced score, divided as mild (0-2 points), moderate (2-4 points) and severe (5-7 points), and B: Sputum SLPI levels of Faced score. p values are obtained by Kruskal-Wallis test. Graphs are represented as mean with SEM.

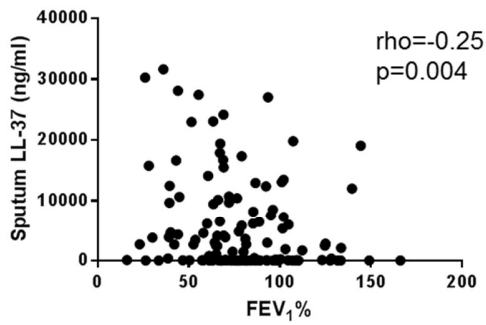
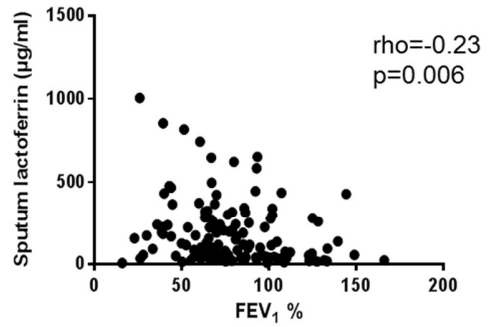
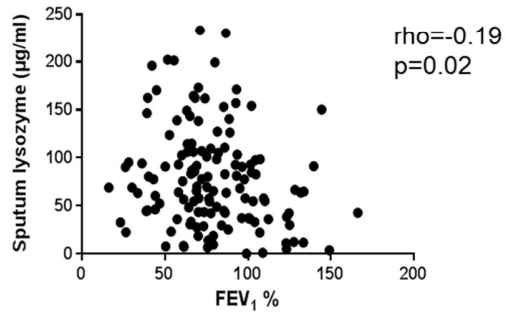
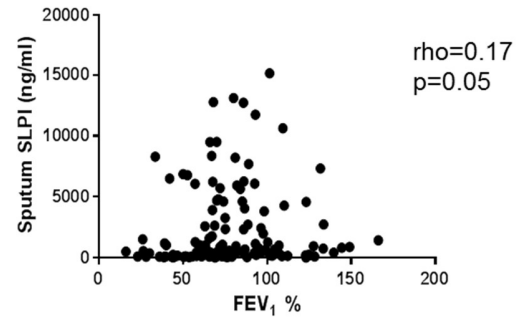
A**B****C****D**

Figure E2. Relationship between sputum AMP levels (A: LL-37, B: lysozyme, C: lactoferrin and D: SLPI) and FEV₁% predicted. Rho and p-value were obtained from Spearman rank correlation.

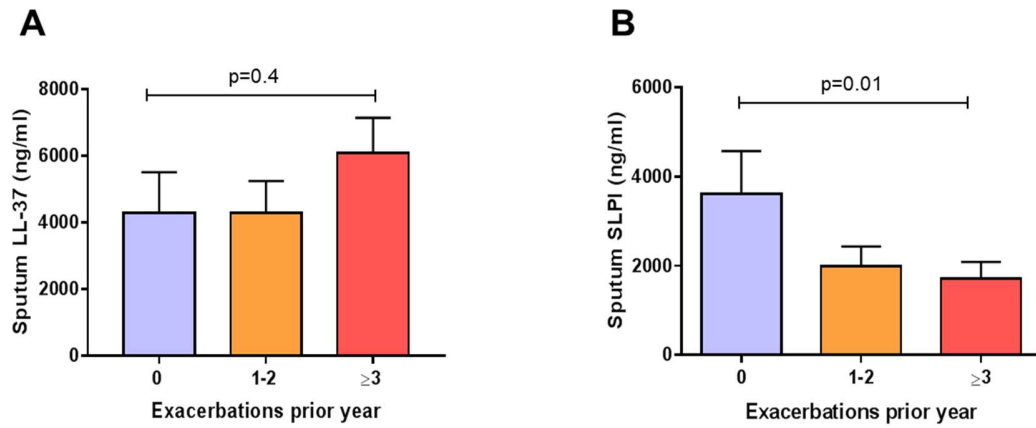


Figure E3. A: Sputum LL-37 and B: SLPI levels and frequency of exacerbations in the previous year. p values are obtained by Kruskal-Wallis test. Graphs are represented as mean with SEM.

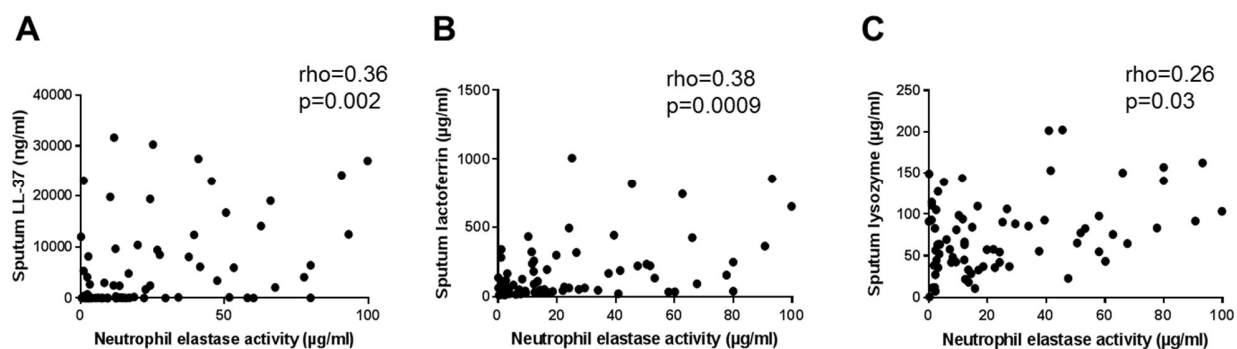


Figure E4. Relationship between sputum AMP levels (A: LL-37, B: lysozyme, C: lactoferrin) and neutrophil elastase activity (Ns=73). Rho and p-value were obtained from Spearman rank correlation.

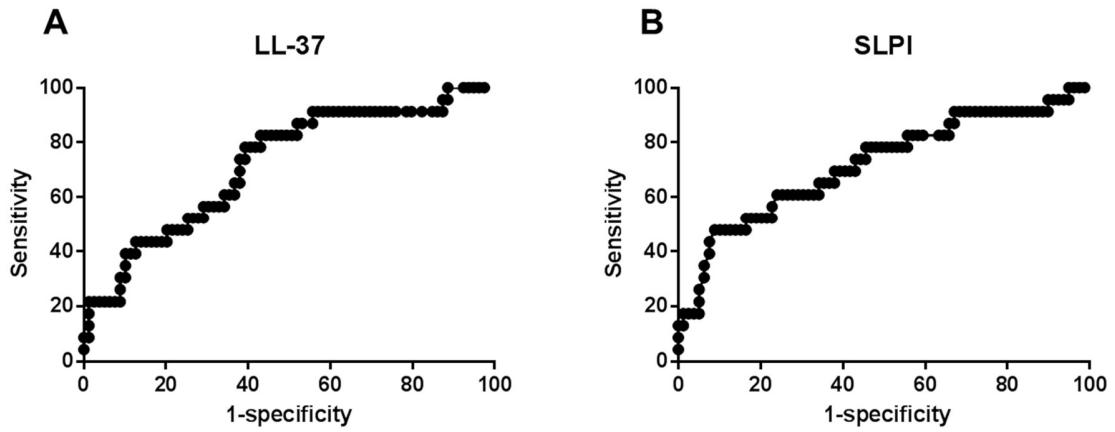


Figure E5. A: ROC curve of sputum LL-37 for predicting severe exacerbation (Area under the curve (AUC) 0.76, 95% confidence interval (CI) 0.65-0.86, $p < 0.0001$). B: ROC curve of sputum SLPI levels for predicting severe exacerbation (AUC 0.72, 95% CI 0.62-0.86, $p < 0.0001$).

4.3. ARTICLE III

A cluster analysis of bronchiectasis patients based on the airway immune profile

Lidia Perea*, Elisabet Cantó*, Guillermo Suarez-Cuartin, Stefano Aliberti, James D Chalmers, Oriol Sibila#, Silvia Vidal#.

En revisió a la revista *Chest*

*Els autors van contribuir de la mateixa manera en l'article.

#Els autors comparteixen la posició sènior de l'article.



If there is Online Only content that cannot be converted to a Word processing format, you may have to click the Supplemental Files icon on the menu bar in your Reviewer Center to access.

**A CLUSTER ANALYSIS OF BRONCHIECTASIS PATIENTS
BASED ON THE AIRWAY IMMUNE PROFILE**

Journal:	<i>CHEST</i>
Manuscript ID	CHEST-20-3516.R1
Article Type:	Original Research
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Perea, Lidia; Institut d'Investigació Biomèdica Sant Pau (IIB Sant Pau), Cantó, Elisabet; Institut d'Investigació Biomèdica Sant Pau (IIB Sant Pau) Suarez-Cuartin, Guillermo; Hospital Universitari de Bellvitge Aliberti, Stefano; Department of Pathophysiology and Transplantation, University of Milan, Cardio-thoracic unit and Adult Cystic Fibrosis Centre, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Chalmers, James; University of Dundee, Sibila, Oriol; Hospital Clinic de Barcelona, Respiratory Department; Servei de Pneumologia Vidal, Silvia; Institut d'Investigació Biomèdica Sant Pau (IIB Sant Pau)
Keywords:	BRONCHIECTASIS, Cluster analysis, Airway immunity, Exacerbations

SCHOLARONE™
Manuscripts

1
2
3 1 **Word count main body:** 3146 (Abstract 256)
4
5 2

6
7 3 **A CLUSTER ANALYSIS OF BRONCHIECTASIS PATIENTS BASED ON THE**
8 **AIRWAY IMMUNE PROFILE**
9 4

10 5
11
12
13
14 6 Lidia Perea, MSc*¹, Elisabet Cantó, PhD*¹, Guillermo Suarez-Cuartin, MD, PhD², Stefano
15 7 Aliberti, MD³, James D Chalmers, MD, PhD⁴, Oriol Sibila, MD, PhD^{#5}, Silvia Vidal, PhD^{#1}
16
17
18 8

19
20 9 ¹ Inflammatory Diseases, Institut de Recerca de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau,
21 10 Biomedical Research Institute Sant Pau (IIB Sant Pau), Barcelona, Spain.

22
23 11 ² Respiratory Department, Hospital Universitari de Bellvitge, l'Hospitalet de Llobregat, Spain

24
25 12 ³ Department of Pathophysiology and Transplantation, University of Milan, Fondazione IRCCS
26 13 Cà Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milano, Italy.

27
28 14 ⁴ Tayside Respiratory Research Group, University of Dundee, Dundee, UK.

29
30 15 ⁵ Respiratory Department, Hospital Clinic, IDIBAPS, CIBERES, University of Barcelona,
31 16 Barcelona (Spain)
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

18 * Joint first authorship

19 # Joint senior authorship

20
21 **Corresponding author:** Silvia Vidal. Inflammatory Diseases, Institut de Recerca de l'Hospital
22 de la Santa Creu i Sant Pau, Biomedical Research Institute Sant Pau (IIB Sant Pau). Sant Quintí
23 77-79, 08041. Barcelona, Spain. E-mail: svidal@santpau.cat

1
2
3 27 **Running Head:**
4

5
6 28 Patients with bronchiectasis exhibit distinct airway immune profiles associated with
7
8 29 severity disease and future exacerbations.
9

10
11 30

12
13 31 **Conflict of interest:** JDC has received research grants from Glaxosmithkline, Boehringer-
14
15 32 Ingelheim (BI), Astrazeneca (AZ), Gilead Sciences, Zambon and Insmmed and has received
16
17 33 personal fees from BI, AZ, Glaxosmithkline, Chiesi, Novartis, Insmmed and Zambon. SA has
18
19 34 received research grants from Chiesi, Insmmed and Fisher & Paykel and has received personal
20
21 35 fees from Bayer Healthcare, Grifols, AZ, Zambon, Chiesi, Insmmed, Glaxosmithkline, Menarini
22
23 36 and ZetaCube Srl. All other authors have no conflicts of interest to declare.
24

25
26 37

27
28 38 **Funding:** This study is supported by Instituto de Salud Carlos III and Fondos FEDER
29
30 39 (PI18/00311) and Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica (SEPAR)
31

32
33 40

34
35 41

36
37 42

38
39 43

40
41 44

42
43 45

44
45 46

46
47 47

48
49 48

50
51 49

52
53 50

54
55 51

56
57 52
58
59
60

1
2
3 **53 ABBREVIATIONS LIST**
4

5
6 54 ANOVA: Analysis of variance; AMPs: Antimicrobial peptides; BMI: Body mass index; BSI:
7 55 Bronchiectasis Severity Index; C1: Cluster 1; C2: Cluster 2; C3: Cluster 3; CO₂: carbon dioxide;
8 56 COPD: Chronic Obstructive Pulmonary Disease; CXCL10: C-X-C motif chemokine 10; DNA:
9 57 Deoxyribonucleic acid; ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay; FACED: FEV₁, Age,
10 58 Chronic colonization, Extension and Dyspnea; FEV₁ %: Forced Expiratory Volume in the first
11 59 second; GAGs: Glycosaminoglycans; HR: Hazard ratio; IL-1 β : Interleukin 1 β ; IL-6: Interleukin
12 60 6; IL-8: Interleukin 8; IQR: Interquartile range; MMP-9: Matrix metalloproteinase 9; Ng/ml:
13 61 Nanograms per milliliter; PCR: Polymerase chain reaction; Pg/ml: Picograms per milliliter;
14 62 RPMI: Roswell Park Memorial Institute Medium; SD: Standard deviation; SLPI: Secretory
15 63 leukocyte protease inhibitor; SPSS: Statistical Package for the Social Sciences; TGF- β : Tumor-
16 64 growth factor β ; TNF- α : Tumor necrosis factor α ; μ g/ml: micrograms per milliliter; μ m:
17 65 micrometer.
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

81 **ABSTRACT**

82 **Background and Research Question:** Clinical heterogeneity in bronchiectasis remains a
83 challenge to improve the appropriate targeting of therapies and patient management.
84 Antimicrobial peptides (AMPs) have been linked to disease severity and phenotype. This study
85 aims to identify clusters of patients based on the levels of AMPs, airway inflammation, tissue
86 remodeling and damage; and to establish their relationship with disease severity and clinical
87 outcomes.

88 **Study Design and Methods:** A prospective cohort of $n=128$ stable patients with bronchiectasis
89 were recruited across three centers in three different countries (Spain, Scotland and Italy). Two-
90 step cluster strategy was used to stratify patients according to levels of lactoferrin, lysozyme,
91 LL-37 and SLPI in sputum. Measurements of inflammation (IL-8, TGF- β and IL-6), tissue
92 remodeling and damage (GAGs, MMP-9, neutrophil elastase, total and bacterial DNA) and
93 neutrophil chemotaxis were assessed.

94 **Results:** Three clusters of patients were defined according to distinct airway AMPs profiles.
95 They represented groups of patients with gradually distinct airway infection and disease
96 severity. Each cluster was associated with an airway profile of inflammation, tissue remodeling
97 and damage. The relationships between soluble mediators were also distinct between clusters.
98 This analysis allowed the identification of the cluster with the most deregulated local innate
99 immune response. During follow-up, each cluster showed different risk of suffering three or
100 more exacerbations ($p=0.03$) and different time to first exacerbation ($p=0.03$).

101 **Interpretation:** Bronchiectasis patients can be stratified in different clusters according to
102 profiles of airway AMPs, inflammation, tissue remodeling and damage. The combination of
103 these immunological variables shows a relationship with disease severity and future risk of
104 exacerbations.

105

106 **Keywords:** Bronchiectasis, Cluster analysis, Airway immunity, Exacerbations

107

108

109

110

111

112 INTRODUCTION

113 Non-cystic fibrosis bronchiectasis is a heterogeneous, chronic, irreversible airway
114 disease characterized by recurrent airway infection that worsen the prognosis.¹ Clinical
115 heterogeneity in airway diseases has been studied from clinical data.^{2,3} In bronchiectasis,
116 chronic infection with *Pseudomonas aeruginosa*, other pathogens and daily sputum production
117 without airway infection allowed the identification of four clinical phenotypes.² However, there
118 is a need to identify biological clusters based on pathobiological mechanisms (endotypes) to
119 better target anti-inflammatory therapies.

120 Neutrophilic inflammation is a hallmark of bronchiectasis. Neutrophils are recruited to
121 the lung during infection in proportion of bacterial load.⁴ In the lung, neutrophils release
122 antimicrobial peptides (AMPs), also produced by alveolar macrophages and airway epithelial
123 cells.^{5,6} Recently, we showed that patients with bronchiectasis had deregulated airway AMPs
124 levels, especially the frequent exacerbator phenotype.⁷ Elevated LL-37 and reduced SLPI levels
125 were independently related with more severe disease and can predict risk of exacerbations.
126 Furthermore, elevated LL-37, lactoferrin and reduced SLPI were associated with airway
127 infection, especially due to *P. aeruginosa*.⁷ The presence of airway AMPs in chronic obstructive
128 pulmonary disease (COPD) was associated to inflammatory markers such as IL-6, IL-8 and
129 TNF- α .⁸ However, the relationships between airway AMPs and cytokines have not been
130 described yet in bronchiectasis.

131 Airway epithelial damage is another consequence of neutrophilic inflammation, which
132 favors airway infection.⁹ Among the constituents of the airway epithelium, glycosaminoglycans
133 (GAGs) are polysaccharides expressed ubiquitously on the extracellular matrix of the lung and
134 cell surface and in intracellular compartments.¹⁰ In addition to their structural functions, GAGs
135 can also interact and modulate the function of AMPs,¹¹ DNA, chemokines, cytokines, growth
136 factors, enzymes and adhesion molecules.^{12,13} To our knowledge, GAGs levels in bronchiectasis
137 have not been described yet in the literature.

138 Biological heterogeneity in respiratory diseases has been demonstrated in other chronic
139 airway diseases such as COPD and asthma. Biologic clusters based on sputum IL-1 β , serum
140 CXCL10 and number of peripheral eosinophils allowed for the recognition of clinical COPD
141 exacerbation phenotypes.¹⁴ In addition, sputum cellular and cytokines profiles were associated
142 with distinct and overlapping groups of patients with asthma and COPD.^{15,16} This clustering
143 strategy using multiple variables related to biological mechanisms could therefore prove to be a
144 potential tool to better discriminate patients.

1
2
3 145 In the present study, we hypothesized that the distinct degrees of disease severity may
4 146 be explained by characteristic profiles of airway AMPs, inflammation, tissue remodeling and
5 147 damage. Firstly, we identified clusters of patients based on airway AMPs levels, secondly, we
6 148 showed that airway AMPs clusters link to airway inflammation, remodeling, and damage and
7 149 finally we found that these clusters differ in clinical severity and outcomes.
8
9
10
11
12 150
13
14 151

16 **METHODS**

17 **Study design and Ethics**

18
19
20
21 152 The study was international, multicenter, and prospective and included consecutive
22 153 adult patients with bronchiectasis. The study was approved by the ethics committee “Comitè
23 154 Ètic d’Investigació Clínica de la Fundació de Gestió Sanitària del Hospital de la Santa Creu i
24 155 Sant Pau de Barcelona Hospital de Sant Pau” (IIBSP-BRO-2013) and all subjects signed the
25 156 informed consent form.
26
27
28
29

30 157 **Patients**

31
32 158 Clinically stable patients with non-cystic fibrosis bronchiectasis ($n=128$) were recruited
33 159 from three regional specialist bronchiectasis clinics: Hospital de Sant Pau i la Santa Creu
34 160 (Barcelona, Spain), Ninewells Hospital (Dundee, Scotland), and Ospedale Maggiore Policlinico
35 161 (Milano, Italy). Inclusion and exclusion criteria were defined as previously described.⁷
36 162 Demographic data, number of exacerbations in the previous year, relevant comorbid conditions
37 163 and current treatments were recorded. A cohort of 8 adult volunteers without any respiratory
38 164 condition and normal spirometry was included as controls. For blood neutrophil experiments, 10
39 165 healthy donors, sex and age-matched with patients, were included.
40
41
42
43
44
45

46 Patients were followed-up for one year to assess the number of exacerbations and the
47 time of the first exacerbation from the date of inclusion.
48
49

50 **Sample collection and processing**

51
52 Spontaneous sputum samples were obtained at the time of inclusion and were processed
53 within two hours of collection as previously described.⁷ Bacteriological assays were performed,
54 and sputum supernatants were frozen at -80°C until analysis.
55
56
57

58 **Bacteriology**

1
2
3 Specific microorganisms were identified in sputum samples according to standard
4 laboratory methods and were classified as recognized pathogenic bacteria: *Pseudomonas*
5 *aeruginosa*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis*,
6 *Stenotrophomonas*, *Serratia*, *Staphylococcus* spp and *Escherichia coli*; or non-pathogenic
7 bacteria: *Streptococcus viridans*, *Corynebacterium* spp, and coagulase-negative staphylococci.¹⁷
8
9

10 11 12 **Measurement of AMPs and cytokines**

13
14 Sputum LL-37 (Hycult Biotech, Plymouth, PA, USA), lactoferrin, lysozyme (AssayPro,
15 St. Charles, MO, USA) and SLPI (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) were measured by
16 commercial ELISA kits as previously described.⁷ Sputum IL-8 and TGF- β (Mabtech AB, Nacka
17 Strand, Sweden) and IL-6 (Immunotools, Friesoythe, Germany) were measured by commercial
18 ELISA kits. The limits of detection were 10 pg/ml for IL-8 and IL-6 and 40 pg/ml for TGF- β .
19 Samples were diluted 1/25 for IL-8, 1/5 for TGF- β and 1/10 for IL-6.
20
21
22

23 24 25 **Tissue remodeling and damage assessment**

26
27 Sulphated GAGs (keratan, chondroitin and heparin sulphate) were measured in sputum
28 supernatants using a commercial kit based on a competitive-ELISA detection method (Fine
29 Biotech Co, Wuhan, China). The limit of detection was 1.563 ng/ml and samples were diluted
30 1/3. Levels of matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) were measured using a commercial ELISA
31 kit (R&D Systems). Neutrophil elastase activity was measured by activity-based immunoassay
32 (ProAxis LTD, Belfast, UK) as previously described.¹⁸
33
34
35

36 37 38 **Measurement of DNA**

39
40 Total DNA was extracted from sputum supernatant using the QIAmp DNA Blood Kit
41 (Qiagen, Hilden, Germany), following the manufacturer's instructions and measured using the
42 Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).
43 Bacterial DNA was isolated using the Femto Bacterial DNA Quantification Kit (Zymo
44 Research, Irvine, CA, USA) by a quantitative real-time PCR system (ThermoFisher).
45
46
47

48 49 50 **Blood neutrophil chemotaxis assays**

51
52 RPMI-1640 medium (Lonza, Basel, Switzerland), supplemented with 10% sputum
53 supernatants, was placed in the bottom of a 24-well plate with 3 μ m transwell inserts (Millipore,
54 Massachusetts, USA). Above, 1×10^6 /ml of healthy blood neutrophils purified using Ficoll-
55 Hypaque, dextran-saccharose sedimentation and lysis of erythrocytes, were added and incubated
56 for 4 hours at 37°C 5% CO₂. Next, inserts were removed, migrating neutrophils were harvested
57 from the bottom of the plate and the neutrophil count was determined by flow cytometry
58
59
60

(MACSQuant cytometer; Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). As a control for unspecific migration, a well with neutrophils and medium alone was also included.

Clustering analysis

Clustering variables (LL-37 and SLPI) were selected based on their independence as confirmed by bivariate correlations. Clusters were obtained using the two-step cluster function in SPSS version 22. The optimal number of clusters ($n=3$) was automatically selected by an algorithm based on Schwarz's Bayesian Criterion. The resulting clusters distributed the patients in Cluster 1 (C1) $n = 33$, Cluster 2 (C2) $n = 74$ and Cluster 3 (C3) $n = 21$.

Statistical analysis

The Kolmogorov-Smirnov test was applied to test for normal data distribution. Categorical variables were presented as frequencies. Continuous variables were presented as mean and standard deviation (SD) or median and interquartile range (25th – 75th percentile IQR). The comparisons were analyzed using the Student t-test, the ANOVA test or their corresponding non-parametrical tests when required. Correlations were analyzed using Pearson or Spearman's coefficients according to their normal distribution. Time to first exacerbation was modeled using Kaplan-Meier analysis. In each figure legend, the number of samples is indicated. The correlation matrix was obtained by R software and Corrplot packages.¹⁹ A p -value <0.05 was considered significant.

RESULTS

Clinical characteristics of patients

Table I shows the demographic and clinical characteristics of all patients included in the study. The mean age was 69 years (± 10) and 56.3 % were females. Patients were predominantly non-smokers (59.4%), and idiopathic bronchiectasis (45.3%) was the most common etiology. The mean forced expiratory volume (FEV₁ % predicted) was 78.4 ± 28.8 and the mean body mass index (BMI) was 25.7 ± 5.5 . Half of the patients included were frequent exacerbators.²⁰ Demographics and clinical characteristics of controls included in the study are shown in e-Table 1 of the supplementary material.

Compared with controls, bronchiectasis patients had significantly higher sputum levels of LL-37 ($p=0.004$) and lower levels of SLPI ($p=0.008$). No significant differences were observed in lactoferrin ($p=0.2$) and lysozyme levels ($p=0.5$) (data not shown).

Cluster classification

We then studied the relationship between AMPs in order to apply clustering strategies. We only found strong correlations between lactoferrin and lysozyme ($\rho=0.57$, $p<0.0001$), and LL-37 ($\rho=0.73$, $p<0.0001$). After confirming that LL-37 and SLPI were independent, we used them as clustering variables. Table I shows the characteristics of patients included in each cluster. C3 had the highest percentage of patients taking inhaled corticosteroids ($p=0.01$) and long-acting beta agonists ($p=0.004$), and the highest percentage of patients who had suffered from whooping cough ($p=0.008$).

Airway antimicrobial peptides levels

The sputum AMPs profile in each cluster is shown in **Figure 1A**. All of these AMPs were significantly different between clusters ($p<0.0001$). We also found that C1 was the most similar to controls. C2 had lower levels of lysozyme and SLPI than controls, whereas C3 had higher levels of LL-37 and lactoferrin, and lower levels of SLPI than controls [Controls: $\mu\text{g/ml}$ lactoferrin: 59.4 (13.9-168.8); $\mu\text{g/ml}$ lysozyme: 80.5 (57-121.3); $\mu\text{g/ml}$ LL-37: 0.02 (0.007-0.2); $\mu\text{g/ml}$ SLPI: 7.7 (1.3-11.1)].

Airway infection and disease severity

The percentage of airway infection was significantly different between clusters: 42.4% of infected patients in C1, 67.6% in C2 and 85.7% in C3 ($p=0.005$). *P. aeruginosa* infection was present in 52.4%, 31.1% and 12.1% of patients, respectively ($p=0.003$) (**Figure 2A**).

Patients in C3 had higher severity assessed by BSI and FACED score ($p=0.01$ and $p=0.02$) than patients in C2 and C1. BMI was gradually distinct between the three clusters, with the lowest values in C3 patients ($p=0.01$). This finding was not influenced by gender or age since no significant differences were observed between clusters. C3 had also the lowest FEV₁ %, reaching a statistically significant difference in comparison with C2 ($p=0.05$) (**Figure 2B-D**).

Inflammation

Patients in C3 had the highest levels of IL-8 ($p=0.0003$), lower levels of TGF- β than C1 ($p=0.04$), and lower levels of IL-6 than C2 ($p=0.003$). Patients in C2 had lower levels of TGF- β than C1 ($p<0.0001$) and higher levels of IL-6 ($p=0.05$) (**Figure 3A**).

Since bronchiectasis is characterized by neutrophilic inflammation,⁴ we tested the capacity of sputum supernatants from bronchiectasis patients to induce the chemotaxis of healthy blood neutrophils. Although we did not observe statistically significant differences

1
2
3 between clusters, we did observe a positive correlation between the chemotaxis index and the
4 sputum content of IL-8 ($\rho=0.38$, $p=0.05$) and LL-37 ($\rho=0.49$, $p=0.009$) (**Figure 3B-C**).

7 **Tissue remodeling and airway damage**

9
10 Patients in C3 had the highest levels of GAGs ($p<0.0001$), MMP-9 ($p=0.004$) and
11 neutrophil elastase activity ($p=0.005$) (**Figure 4A-C**). We also observed that patients in C3 had
12 the highest levels of total DNA and bacterial DNA ($p<0.0001$ and $p<0.0001$). Only a trend of
13 higher GAGs levels in C2 compared with C1 was observed (**Figure 4D**).

16
17 The relationships between AMPs, inflammatory mediators and markers of tissue
18 remodeling and damage were studied in each cluster. We observed a distinct profile of
19 relationships in each cluster (**e-Figure 1**).

22 **Longitudinal outcomes**

24
25 Ninety-eight patients exacerbated during the 1-year follow up. Of them, 24 patients
26 (24.5%) suffered from severe exacerbations. 66.7% of patients in C3 suffered three or more
27 total exacerbations during follow-up, compared to 37.8% in C2 and 24.2% in C1 ($p=0.03$)
28 (**Figure 5A**). Patients in C3 also suffered more severe exacerbations that required hospital
29 admission compared with patients in C2 and C1 (0.8 ± 1.5 vs 0.2 ± 0.6 vs 0.1 ± 0.3 ; $p=0.006$)
30 (**Figure 5B**) and had a shorter time to first exacerbation compared to patients in C2 (HR 1.4,
31 95% CI 0.8-2.5) and C1 (HR 2.1, 95% CI 1.0-4.2) ($p=0.03$). We also observed that patients in
32 C2 exacerbated earlier than patients in C1 (HR 1.7, 95% CI 1.1-2.6) ($p=0.04$) (**Figure 5C**).

40 **DISCUSSION**

42
43 In this study, we have applied a new strategy combining airway AMPs to identify three
44 biological clusters associated with distinct profiles of airway inflammation, tissue remodeling
45 and damage. Furthermore, the three clusters had distinct degrees of past, current and future
46 clinical parameters. This tool helped us to identify a cluster (C3) with the highest severity and
47 the highest risk of future exacerbations characterized by a deregulated local innate immune
48 response and increased tissue remodeling and damage. We also identified two clusters (C1 and
49 C2) with low tissue remodeling and damage that could explain their severity.

51
52 Our cluster strategy was based on LL-37 and SLPI due to their independence and their
53 marked association with BSI, airway infection and risk of exacerbation.⁷ The three identified
54 clusters presented different airway AMPs profiles. C3 patients, with the highest levels of LL-37
55 and lactoferrin, and the lowest levels of SLPI, were the patients with the highest severity. In
56
57
58
59
60

1
2
3 contrast, C1 patients, who had an airway AMPs profile similar to controls, were the mildest
4 patients in our cohort. Finally, C2 patients, with low levels of SLPI and lysozyme, were the
5 patients with moderate severity. It should be mentioned that our control airway AMPs levels are
6 comparable with other reports.^{21,22} Some works on biological clusters have been published in
7 COPD and asthma.¹⁴⁻¹⁶ Similar to our study, they were focused on local immune response,
8 though they used other sputum inflammatory mediators such as chemokines, IL-1 β and TNF- α .
9 In our work, we obtained clusters based on AMPs rather than on an extensive panel of sputum
10 inflammatory mediators because AMPs are mainly neutrophil proteins and closely related to
11 airway infection.
12
13
14
15
16
17

18 We found that airway AMPs profiles in each cluster were associated distinctly with
19 airway infection. Interestingly, C3 patients had high LL-37, lactoferrin and lysozyme levels and
20 were therefore expected to have a greater protection against infection. However, they had the
21 highest percentage of airway infection. This apparent contradiction could be explained by
22 Cole's vicious cycle hypothesis,²³ which suggests that chronic inflammation contributes to the
23 persistence of pulmonary bacteria, which lead to greater inflammation. In fact, C3 patients were
24 frequently infected with *P.aeruginosa* and this infection is linked to high inflammatory levels,
25 severity and poor outcomes in patients with bronchiectasis.²⁴ Even though C1 and C2 patients
26 presented lower inflammation and better outcomes than C3, 12% and 31% of patients
27 respectively were infected by *P.aeruginosa*. There are several possible explanations for the
28 presence of *P.aeruginosa* in these clusters. One is a lower bacterial load in C1 and C2 than in
29 C3.²⁵ Although data for the quantitative bacterial load are not available, we found that C3 had
30 the highest sputum bacterial DNA, which is in line with this hypothesis. Another possibility is
31 that clusters are associated with different *P.aeruginosa* strains in terms of virulence factors,
32 biofilm production and antimicrobial resistance that favor their persistence in the lungs.²⁶⁻²⁸
33 Thus, we speculate that C3 could be the cluster with the most virulent and resistant
34 *P.aeruginosa* strains.
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45

46 We found that LL-37 levels are correlated with in vitro neutrophil migration towards
47 sputum, confirming that this AMPs has additional functions. LL-37 is also associated with
48 endotoxin binding, wound healing, release of histamine and leukotriene B4, and modulation of
49 dendritic cell function.²⁹ In physiological concentrations, LL-37 properties are beneficial for the
50 host defense, but at higher concentrations, it has a cytotoxic effect on leukocytes and epithelial
51 cells.^{30,31} The high levels of total DNA that we found in C3 patients suggest the death of
52 neutrophils and epithelial cells due to cytotoxic levels of LL-37. Watt AP *et al.* and Bedi P *et al.*
53 reported that neutrophils isolated from the sputum³² and blood³³ of bronchiectasis patients had a
54 delayed apoptosis. However, the sputum soluble factors reflect the consequences of the presence
55 of neutrophils in airways. Although we had no information regarding the number of sputum
56
57
58
59
60

1
2
3 neutrophils, we determined IL-8 levels as an indirect measure of their presence and C3 was the
4 cluster with the highest IL-8 levels. The fact that we found no differences in IL-8 and total and
5 bacterial DNA between C1 and C2 suggests that there was no difference in the presence of
6 sputum neutrophils.
7
8
9

10 We found different GAGs levels in the sputum supernatant from bronchiectasis patients.
11 C3 had the highest levels of airway sulphated GAGs followed to C2, suggesting an excessive
12 tissue remodeling characteristic of the excessive inflammation and the imbalance between
13 pulmonary proteases and anti-proteases.³⁴ C3 had the highest levels of MMP-9 and neutrophil
14 elastase activity. These proteases contribute to the damage of airway epithelium through the
15 breakdown of GAGs³⁵ and render the airways more susceptible to infection.²³ When we
16 analyzed the relationship between the immune parameters determined, we found that in the C3
17 almost all the relationships observed in C1 and C2 were absent. This fact suggests that the poor
18 outcomes of C3 could be linked to deregulated airway immune responses. Therefore, the
19 severity of bronchiectasis could be a combination of multiple factors, including inflammation,
20 remodeling, and deregulation of certain AMPs. The result of this combination allows us to
21 stratify the bronchiectasis patients in three clusters characterized by distinct airway infection,
22 clinical parameters and future exacerbations.
23
24
25
26
27
28
29
30
31

32 Our study has some limitations. First, we had no consecutive samples during the follow-
33 up. Therefore, we could not analyze the long-term stability of these clusters. Second, we know
34 the risk of spurious associations due to multiple statistical comparisons. However, we focused
35 the cluster analysis on two independent markers (LL-37 and SLPI) clearly associated with
36 clinical parameters at baseline. And finally, airway infection was determined by conventional
37 microbiological cultures instead of molecular diagnosis which could better explore the
38 characteristics of airway infection in each cluster.
39
40
41
42

43 INTERPRETATION

44
45 Our cluster strategy identifies three clusters of bronchiectasis patients with distinct
46 profiles of AMPs, inflammation and lung remodeling and damage. These profiles are translated
47 into distinct and gradual clinical phenotypes in terms of airway infection, disease severity and
48 outcomes, strengthening the validity of these biological clusters. However, it is important to
49 external validate these clusters. Furthermore, our work gives relevance to the finding that
50 distinct relationships among airway immune response mediators exist in each biological cluster.
51 Therefore, our work highlights the importance of identifying patients at distinct grades of
52 severity based on the airway immune profile in order to improve therapies to restore their
53 pulmonary immune homeostasis.
54
55
56
57
58
59
60

ACKNOWLEDGEMENTS

This work has been performed within the Ph.D. Immunology Program of Universitat Autònoma de Barcelona.

Author's contributions: LP and SV take full responsibility for the content of the manuscript, including the data analysis. LP and EC: Study design and performance of experimental work, data collection, data interpretation and statistical analysis including writing of the final manuscript. GS, JDC and SA: Patient recruitment, sample collection, clinical data and data analysis. OS and SV: Study design, obtained study funding, interpretation of results, data analysis and writing of the final manuscript. All authors reviewed and approved the final draft of the manuscript.

Financial/non-financial disclosures: JDC has received research grants from Glaxosmithkline, Boehringer-Ingelheim (BI), Astrazeneca (AZ), Gilead Sciences, Zambon and Insmmed and has received personal fees from BI, AZ, Glaxosmithkline, Chiesi, Novartis, Insmmed and Zambon. SA has received research grants from Chiesi, Insmmed and Fisher & Paykel and has received personal fees from Bayer Healthcare, Grifols, AZ, Zambon, Chiesi, Insmmed, Glaxosmithkline, Menarini and ZetaCube Srl. All other authors have no conflicts of interest to declare.

Additional information: The e-Figure and e-Table are provided in the online supplement.

REFERENCES

- 166 1. Chalmers JD, Aliberti S, Blasi F. Management of bronchiectasis in adults. *Eur Respir J*
167 2015;45(5):1446–1462.
- 168 2. Aliberti S, Lonni S, Dore S, et al. Clinical phenotypes in adult patients with
169 bronchiectasis. *Eur Respir J*. 2016;47(4):1113–1122.
- 170 3. Guan WJ, Jiang M, Gao YH, et al. Unsupervised learning technique identifies
171 bronchiectasis phenotypes with distinct clinical characteristics. *Int J Tuberc Lung Dis*
172 2016;20(3):402–410.
- 173 4. King PT. The role of the immune response in the pathogenesis of bronchiectasis.
174 *Biomed Res Int*. 2018;2018:68026.
- 175 5. Peters BM, Shirliff ME, Jabra-Rizk MA. Antimicrobial peptides: primeval molecules or
176 future drugs? *PLoS Pathog*. 2010;6(10):e1001067.
- 177 6. Fuschillo S, Felice A De, Balzano G. Mucosal inflammation in idiopathic bronchiectasis:
178 Cellular and molecular mechanisms. *Eur Respir J*. 2008;31(2):396–406.
- 179 7. Sibila O, Perea L, Cantó E, et al. Antimicrobial peptides, disease severity and
180 exacerbations in bronchiectasis. *Thorax* 2019;74(9):835–842.
- 181 8. Persson LJ, Aanerud M, Hardie JA, et al. Antimicrobial peptide levels are linked to
182 airway inflammation, bacterial colonisation and exacerbations in chronic obstructive
183 pulmonary disease. *Eur Respir J*. 2017;49(3):1601328.
- 184 9. Martínez-García MÁ, Sánchez CP, Moreno RMG. The double-edged sword of
185 neutrophilic inflammation in bronchiectasis. *Eur Respir J*. 2015;46(4):898–900.
- 186 10. Wigén J, Elowsson-Rendin L, Karlsson L, Tykesson E, Westergren-Thorsson G.
187 Glycosaminoglycans: A Link between Development and Regeneration in the Lung. *Stem*
188 *Cells Dev*. 2019;28(13):823–832.
- 189 11. Andersson E, Rydengård V, Sonesson A, Mörgelin M, Björck L, Schmidtchen A.
190 Antimicrobial activities of heparin-binding peptides. *Eur J Biochem* 2004;271(6):1219–
191 1226.
- 192 12. Linhardt RJ, Toida T. Role of glycosaminoglycans in cellular communication. *Acc Chem*
193 *Res* 2004;37(7):431–438.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- 194 13. Kuschen GSV, Coulin F, Power CA, et al. Glycosaminoglycans interact selectively with
195 chemokines and modulate receptor binding and cellular responses. *Biochemistry*
196 1999;38(39):12959–12968.
- 197 14. Bafadhel M, McKenna S, Terry S, et al. Acute exacerbations of chronic obstructive
198 pulmonary disease: Identification of biologic clusters and their biomarkers. *Am J Respir*
199 *Crit Care Med* 2011;184(6):662–671.
- 200 15. Ghebre MA, Pang PH, Diver S, et al. Biological exacerbation clusters demonstrate
201 asthma and chronic obstructive pulmonary disease overlap with distinct mediator and
202 microbiome profiles. *J Allergy Clin Immunol* 2018;141(6):2027-2036.e12.
- 203 16. Ghebre MA, Bafadhel M, Desai D, et al. Biological clustering supports both “Dutch”
204 and “British” hypotheses of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *J*
205 *Allergy Clin Immunol*. 2015;135:63-72.e10.
- 206 17. Sibila O, Suarez-Cuartin G, Rodrigo-Troyano A, et al. Secreted mucins and airway
207 bacterial colonization in non-CF bronchiectasis. *Respirology*. 2015;20(7):1082–1088.
- 208 18. Chalmers JD, Moffitt KL, Suarez-Cuartin G, et al. Neutrophil elastase activity is
209 associated with exacerbations and lung function decline in bronchiectasis. *Am J Respir*
210 *Crit Care Med* 2017;195(10):1384–1393.
- 211 19. Taiyun Wei M, Taiyun Wei cre A, Simko aut V, et al. Package “corrplot” Title
212 Visualization of a Correlation Matrix. 2017.
- 213 20. Chalmers JD, Aliberti S, Filonenko A, et al. Characterization of the “frequent exacerbator
214 phenotype” in bronchiectasis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2018;197(11):1410–1420.
- 215 21. Persson LJ., Aanerud M, Hardie JA, et al. Antimicrobial peptide levels are linked to
216 airway inflammation, bacterial colonisation and exacerbations in chronic obstructive
217 pulmonary disease. *Eur Respir J*. 2017;49(3):1601328.
- 218 22. Ryttilä P, Rehn T, Ilumets H, et al. Increased oxidative stress in asymptomatic current
219 chronic smokers and GOLD stage 0 COPD. *Respir Res*. 2006;7(1):69.
- 220 23. Cole PJ. Inflammation: A two-edged sword - The model of bronchiectasis. *Eur J Respir*
221 *Dis* 1986;69(SUPPL. 147):6–15.
- 222 24. Finch S, McDonnell MJ, Abo-Leyah H, Aliberti S, Chalmers JD. A comprehensive analysis

- 1
2
3 223 of the impact of pseudomonas aeruginosa colonization on prognosis in adult
4
5 224 bronchiectasis. *Ann Am Thorac Soc* 2015;12(11):1602–1611.
6
7 225 25. Sibila O, Laserna E, Shoemark A, et al. Airway Bacterial Load and Inhaled Antibiotic
8
9 226 Response in Bronchiectasis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2019;200(1):33–41.
10
11 227 26. Woo TE, Lim R, Surette MG, et al. Epidemiology and natural history of Pseudomonas
12
13 228 aeruginosa airway infections in non-cystic fibrosis bronchiectasis. *ERJ Open Res*.
14
15 229 2018;4(2):pii: 00162-2017.
16
17 230 27. Woo TE, Duong J, Jervis NM, Rabin HR, Parkins MD, Storey DG. Virulence adaptations of
18
19 231 Pseudomonas aeruginosa isolated from patients with non-cystic fibrosis bronchiectasis.
20
21 232 *Microbiol (United Kingdom)* 2016;162(12):2126–2135.
22
23 233 28. Workentine ML, Sibley CD, Glezerson B, et al. Phenotypic Heterogeneity of
24
25 234 Pseudomonas aeruginosa Populations in a Cystic Fibrosis Patient. *PLoS One*.
26
27 235 2013;8(4):e60225.
28
29 236 29. Kai-Larsen Y, Agerberth B. The role of the multifunctional peptide LL-37 in host defense.
30
31 237 *Front Biosci*. 2008;13(10):3760–3767.
32
33 238 30. Johansson J, Gudmundsson GH, Rottenberg ME, Berndt KD, Agerberth B. Conformation-
34
35 239 dependent antibacterial activity of the naturally occurring human peptide LL-37. *J Biol*
36
37 240 *Chem* 1998;273(6):3718–3724.
38
39 241 31. Lau YE, Bowdish DME, Cosseau C, Hancock REW, Davidson DJ. Apoptosis of airway
40
41 242 epithelial cells: Human serum sensitive induction by the cathelicidin LL-37. *Am J Respir*
42
43 243 *Cell Mol Biol* 2006;34(4):399–409.
44
45 244 32. Watt AP, Brown V, Courtney J, et al. Neutrophil apoptosis, proinflammatory mediators
46
47 245 and cell counts in bronchiectasis. *Thorax* 2004;59(3):231–236.
48
49 246 33. Bedi P, Davidson DJ, McHugh BJ, Rossi AG, Hill AT. Blood Neutrophils Are
50
51 247 Reprogrammed in Bronchiectasis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2018;198(7):880–890.
52
53 248 34. Hogg, J C SR. Chronic obstructive pulmonary disease c 2: Pathology and biochemistry of
54
55 249 emphysema. *Thorax* . 2002;57:830–834.
56
57 250 35. Passi A, Negrini D, Albertini R, Miserocchi G, Luca G De. The sensitivity of versican from
58
59 251 rabbit lung to gelatinase A (MMP-2) and B (MMP-9) and its involvement in the
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

252
253
254
255
256
257
258
259
260
261
262
263
264
265
266
267
268
269
270
271
272
273
274

development of hydraulic lung edema. *FEBS Lett* 1999;456(1):93–96.

CONFIDENTIAL

1
2
3 275 **Take Home Point:**
4

5 276 - **Study Question:** Can we identify distinct clusters of bronchiectasis patients based on
6
7 277 airway immune profile?

8 278 - **Results:** We found three clusters of patients based on airway AMPs, inflammation,
9
10 279 tissue remodeling and damage associated to distinct severity disease and future
11
12 280 exacerbations.

13 281 - **Interpretation:** The combination of airway AMPs, inflammation, tissue remodeling
14
15 282 and damage markers shows a relationship with disease severity and future risk of
16
17 283 exacerbations.
18

19 284

20
21 285

22
23
24 286

25
26
27 287

28
29 288

30
31 289

32
33
34 290

35
36
37 291

38
39 292

40
41 293

42
43
44 294

45
46
47 295

48
49 296

50
51 297

52
53
54 298

55
56
57 299

58
59 300
60

CONFIDENTIAL

301 **Table I.** Patient demographics, clinical characteristics and prior treatments of patients stratified
 302 in each cluster.

	All patients (n=128)	Cluster 1 (n=33)	Cluster 2 (n=74)	Cluster 3 (n=21)	p-value
Age (mean ± SD)	69 ± 10	70 ± 3	70 ± 1	72 ± 2	0.7
Female	72 (56.3)	18 (54.5)	42 (56.8)	12 (57.1)	0.9
Smoking status					
Never	76 (59.4)	19 (57.6)	43 (58.1)	14 (66.7)	0.1
Ex-smoker	30 (23.4)	5 (15.2)	18 (24.3)	7 (33.3)	
Current	22 (17.2)	9 (27.3)	13 (17.6)	0 (0)	
Comorbidities					
Cardiovascular disease	29 (22.7)	6 (18.2)	21 (28.4)	2 (9.5)	0.1
Diabetes mellitus	12 (9.4)	6 (18.2)	5 (6.8)	1 (4.8)	0.1
Stroke	8 (6.3)	2 (6.1)	5 (6.8)	1 (4.8)	0.9
COPD	23 (21)	7 (21.9)	12 (20.3)	4 (21.1)	1
Treatment					
LABA	76 (59.4)	24 (72.7)	35 (47.3)	17 (81.0)	0.004
LAMA	42 (32.8)	13 (39.4)	22 (29.7)	7 (33.3)	0.6
Inhaled corticosteroids	55 (43)	13 (39.4)	27 (36.5)	15 (71.4)	0.01
Inhaled antibiotics	6 (4.7)	2 (6.1)	2 (2.7)	2 (9.5)	0.4
Aetiology					
Idiopathic	58 (45.3)	11 (33.3)	37 (50)	10 (47.6)	0.3
Post-infective	21 (16.4)	6 (18.2)	11 (14.9)	4 (19)	
Post-tuberculosis	12 (9.4)	6 (18.2)	6 (8.1)	0 (0)	
Others	37 (28.9)	10 (30.3)	20 (27)	7 (33.3)	
Whooping pertussis	7 (5.5)	2 (12.5)	1 (1.9)	4 (26.7)	0.008
Exacerbations previous 1-year					
0	23 (18)	6 (18.2)	13 (17.6)	4 (19)	0.9
1-2	41 (32)	11 (33.3)	25 (33.8)	5 (23.8)	
3 or more	64 (50)	16 (48.5)	36 (48.6)	12 (57.1)	

303 Data are presented as n (%) unless otherwise indicated.

304 COPD, chronic obstructive pulmonary disease; LABA, long-acting beta agonist; LAMA, long-
 305 acting muscarinic antagonist; SD, standard deviation.

306

1
2
3 307 **FIGURE LEGENDS**
4
5

6 308 **Figure 1.** Profile of airway AMPs levels (Lactoferrin, lysozyme, LL-37 and SLPI levels) in
7
8 309 each cluster of patients ($n=128$). p -values are obtained by t-test or Mann-Whitney test according
9
10 310 their normal distribution. * <0.05 ; ** <0.01 ; *** <0.001 . *C1 and C2; #C1 and C3; §C2 and C3.
11

12
13 311 **Figure 2.** Airway infection and baseline clinical parameters in each cluster of patients. **(A)**
14
15 312 Percentage of airway infection. p -value was obtained by Chi-square test. **(B)** BSI score, **(C)**
16
17 313 FACED score and **(D)** parameters included in these scores such as body mass index and FEV₁
18
19 314 %pred ($n=128$). p -values are obtained by t-test or Mann-Whitney test according their normal
20
21 315 distribution.
22

23
24 316 **Figure 3.** Inflammatory mediators in each cluster of patients. **(A)** Profile of IL-8, TGF- β and
25
26 317 IL-6 levels in each cluster ($n=128$). p -values are obtained by t-test or Mann-Whitney test
27
28 318 according their normal distribution. * <0.05 ; ** <0.01 ; *** <0.001 . *C1 and C2; #C1 and C3; §C2
29
30 319 and C3. **(B)** Relationship between chemotaxis of healthy blood neutrophils cultured in sputum
31
32 320 supernatants ($n=25$) and the content of IL-8 and **(C)** LL-37 sputum levels. Correlations were
33
34 321 analyzed using Spearman test.
35
36

37
38 322 **Figure 4.** Tissue remodelling and airway epithelial damage in each cluster of patients. **(A)**
39
40 323 Sulphated GAGs levels ($n=128$), **(B)** MMP-9 levels ($n=81$), **(C)** activity of neutrophil elastase
41
42 324 ($n=78$), and **(D)** total and bacterial DNA levels ($n=128$ and $n=60$, respectively). p -values are
43
44 325 obtained by t-test or Mann-Whitney test according their normal distribution.
45
46

47 326 **Figure 5.** Relationship between clusters and clinical outcomes. **(A)** Percentage of the total
48
49 327 exacerbations during 1 year of follow-up ($n=128$). **(B)** Percentage of severe exacerbations that
50
51 328 required hospitalizations during 1 year of follow-up ($n=128$). **(C)** Percentage of patients free of
52
53 329 exacerbation in each cluster ($n=128$). Log-rank (Mantel-Cox) test was used.
54
55

56 330
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

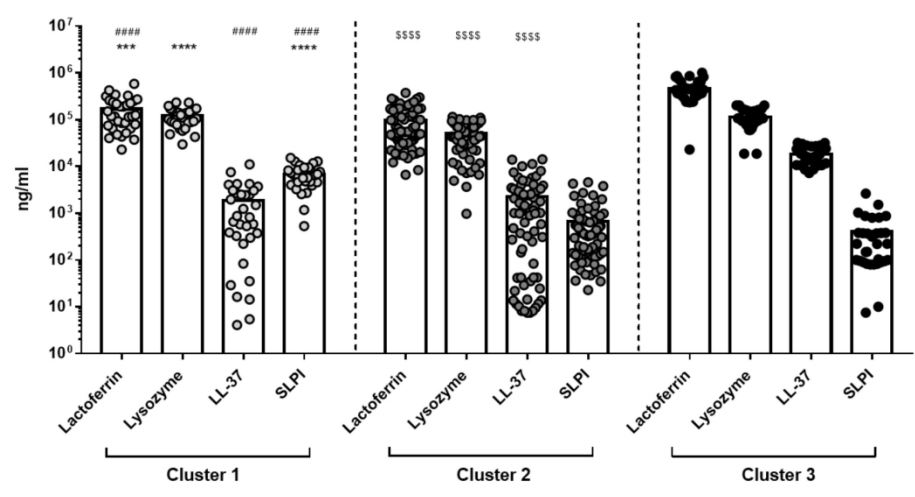


Figure 1

219x123mm (300 x 300 DPI)

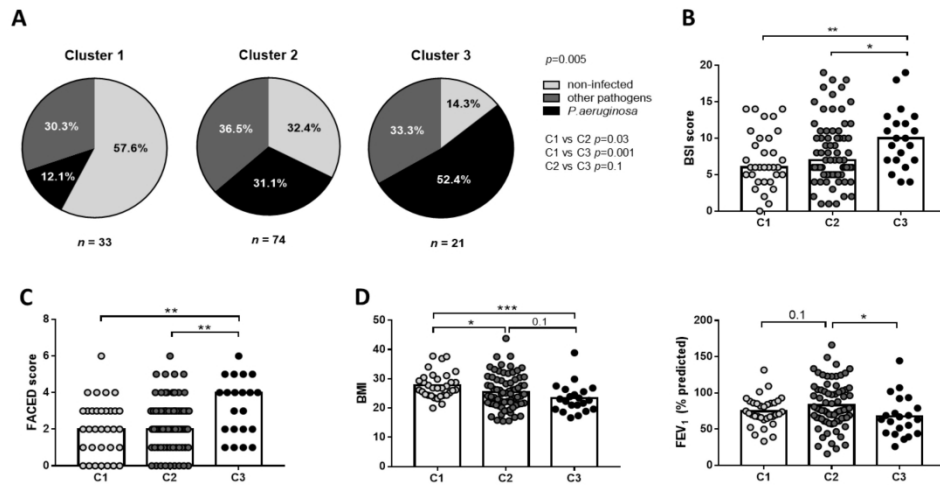


Figure 2

250x140mm (300 x 300 DPI)

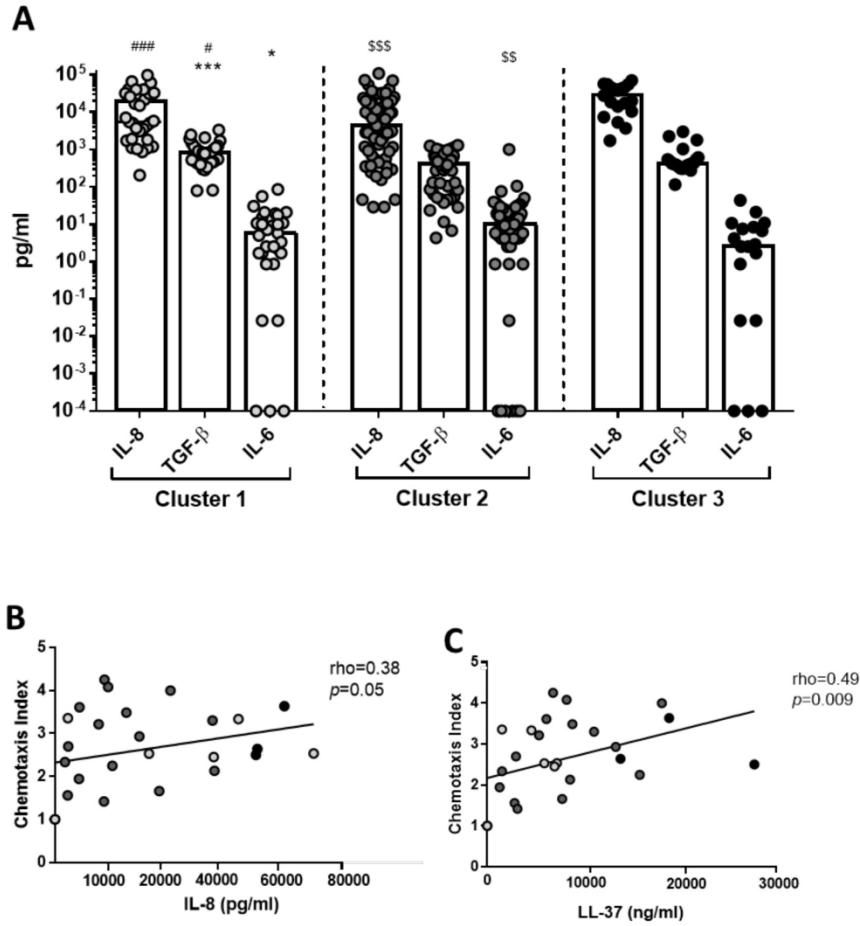


Figure 3

168x174mm (300 x 300 DPI)

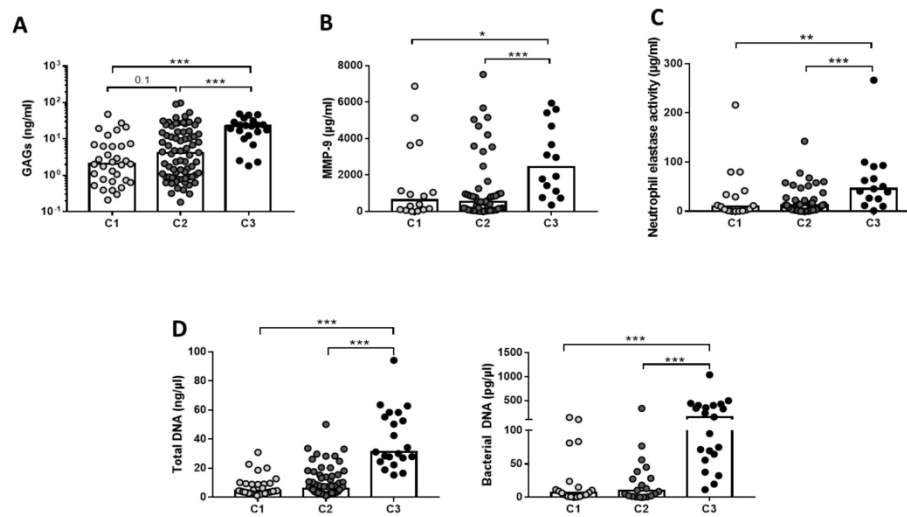


Figure 4

253x143mm (300 x 300 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

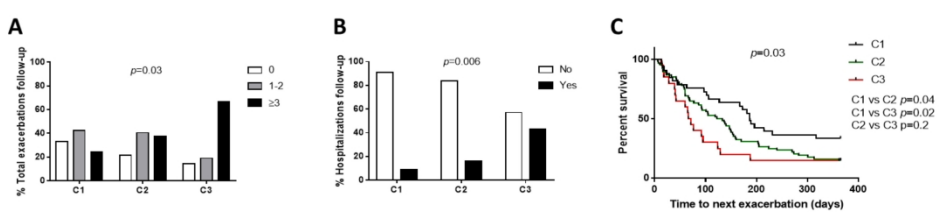


Figure 5

259x66mm (300 x 300 DPI)

1
2
3
4
5
6 **A CLUSTER ANALYSIS OF BRONCHIECTASIS PATIENTS BASED ON THE**
7
8 **AIRWAY IMMUNE PROFILE**
9
10

11
12 Lidia Perea, MSc*¹, Elisabet Cantó, PhD*¹, Guillermo Suarez-Cuartin, MD, PhD², Stefano
13 Aliberti, MD³, James D Chalmers, MD, PhD⁴, Oriol Sibila, MD, PhD^{#5}, Silvia Vidal, PhD^{#1}
14
15
16
17
18
19
20

21
22 **SUPPLEMENTAL DATA**
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

CONFIDENTIAL

SUPPLEMENTARY TABLES

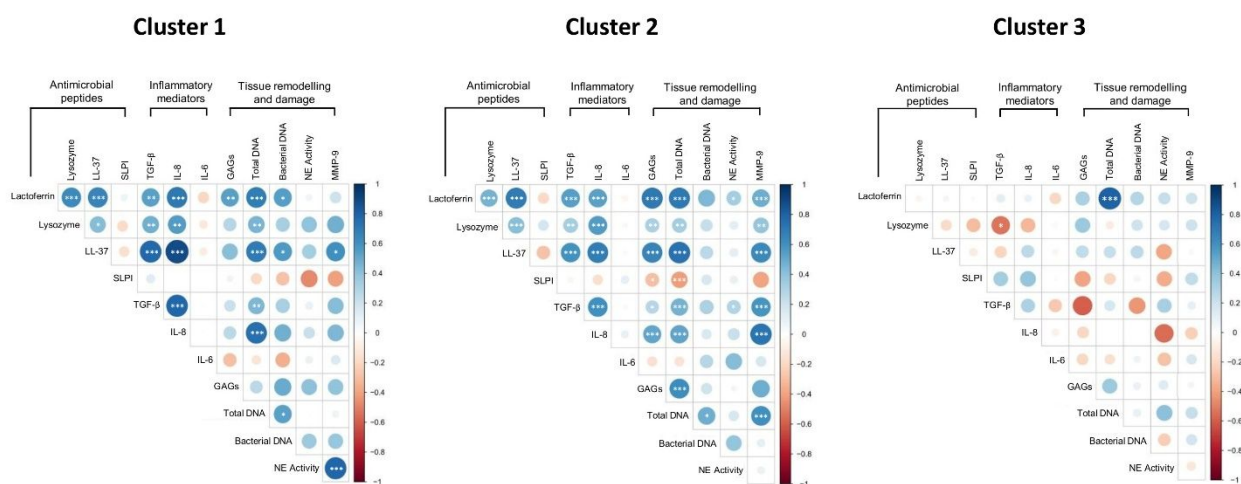
e-Table 1. Demographical and clinical characteristics of controls

	Controls (<i>n</i> = 8)
Age	53.0 ± 18.0
Female, <i>n</i> (%)	3 (37.5)
BMI (kg/m ²)	26.9 ± 6.5
Smoking status, <i>n</i> (%)	
Never	4 (50)
Former	3 (37.5)
Current	1 (12.5)
FEV ₁ (% pred)	94.4 ± 10.0
FVC (% pred)	88.9 ± 5.3

Data is presented as mean ± SD unless otherwise indicated

SUPPLEMENTARY FIGURE LEGEND:

e-Figure 1. Relationship between AMPs, inflammatory molecules and tissue remodelling in each cluster of patients. Correlations were analysed using Spearman test or Pearson, according their normal distribution. Correlation matrix was obtained by R software and Corrplot packages.



5. RESUM GLOBAL DE RESULTATS I DISCUSSIÓ

5.1. ARTICLE I

Reduced airway levels of fatty-acid binding protein 4 in COPD: relationship with airway infection and disease severity.

Lidia Perea, Ana Rodrigo-Troyano, Elisabet Cantó, Marisol Domínguez-Álvarez, Jordi Giner, Ferran Sanchez-Reus, Judit Villar-García, Sara Quero, Marian García-Núñez, Alicia Marín, Eduard Monsó, Rosa Faner, Alvar Agustí, Silvia Vidal, Oriol Sibila.

Respiratory Research. 2020 Jan 13;21(1):21.

5.1.1. Resum global de resultats

Els macròfags alveolars són components clau en la resposta immune innata contra infeccions respiratòries. S'han descrit diverses alteracions en els macròfags alveolars en pacients amb MPOC en quant a l'expressió de marcadors i funcions. Una de les múltiples molècules que produeixen els macròfags, és la proteïna FABP4, coneguda també com A-FABP o a-P2, ja que també és produïda de manera abundant pels adipòcits. La FABP4 actua com a una adipocina secretada amb funcions a nivell de la resposta immune innata. En models experimentals d'infecció respiratòria per *P.aeruginosa*, FABP4 actua reclutant neutròfils al lloc d'infecció, suggerint un paper protector enfront la infecció respiratòria. Tot i així, en pacients amb MPOC no s'han estudiat els nivells pulmonars de FABP4 ni la seva implicació clínica.

Aquest treball es va dissenyar amb l'objectiu principal d'estudiar el paper pulmonar de FABP4 en pacients amb MPOC en fase d'estabilitat clínica i en controls sans. Les mostres escollides a nivell pulmonar van ser rentats broncoalveolars (BAL) i espus. Pel que fa als valors de FABP4 en les mostres de BAL, la concentració de FABP4 obtinguda per l'ELISA es va normalitzar d'acord amb la quantitat de proteïna total present en el BAL per evitar biaixos de dilució de la proteïna. També es van recollir mostres de sang per estudiar l'associació de FABP4 pulmonar i sistèmica. Així doncs, es va analitzar l'associació entre els nivells pulmonars i sistèmics de FABP4 i la

presència d'infecció respiratòria i el grau de severitat de la malaltia. També es va estudiar la relació amb la quantitat de macròfags alveolars identificats per citometria de flux com a població CD45⁺CD14⁺CD15⁻ i alta complexitat cel·lular (SSC) en mostres de BAL.

A l'estudi es van incloure 52 pacients amb MPOC en fase estable, dels quals un 23% presentava infecció respiratòria causada principalment per *H.influenzae* (75%). Es van incloure també 29 controls sans amb la funció pulmonar mantinguda, més joves que els pacients amb MPOC però emparellats per gènere i IMC. Aquest emparellament era important degut a què com l'FABP4 també es produït pels adipòcits, havíem d'evitar el biaix produït per aquests dos paràmetres altament relacionats amb la quantitat d'adipòcits.

Al comparar pacients amb MPOC i controls, vam observar que els pacients amb MPOC tenien nivells reduïts en BAL però no en esput. També vam obtenir una dèbil correlació entre els nivells de FABP4 en BAL i en esput en pacients amb MPOC. Pel que fa als nivells sistèmics de FABP4, no vam trobar cap diferència significativa en els anteriors anàlisis i, per tant, tampoc cap correlació entre els nivells pulmonars i sistèmics de FABP4.

A l'estudiar l'associació entre els nivells pulmonars de FABP4 i la presència d'infecció respiratòria, vam observar que els pacients amb infecció respiratòria presentaven nivells reduïts de FABP4 en esput, però no en BAL, comparat amb aquells pacients sense infecció respiratòria. Aquests resultats tampoc els vam trobar a nivell sistèmic, indicant que és la producció local de FABP4 la que està implicada amb la infecció respiratòria. També vam observar que els pacients amb un major grau de severitat de la malaltia, mesurat per l'índex GOLD D presentaven nivells pulmonars reduïts de FABP4 tant en BAL com en esput. A més, un major grau de limitació pulmonar i una pitjor qualitat de vida també anaven relacionades amb nivells pulmonars reduïts de FABP4, tant en BAL com en esput.

Com la severitat de la MPOC pot estar causada per diferents paràmetres demogràfics, vam analitzar si l'edat, l'hàbit tabàquic i els tractaments seguits pel pacient tenien alguna influència. Tot i així, no existeix cap associació amb l'edat ni amb el tabac. Pel que fa al tractament, vam observar que els pacients que estaven o havien seguit l'any anterior un tractament amb corticoides inhalats presentaven nivells reduïts de FABP4 en BAL comparat amb aquells pacients que no seguien aquest tipus de tractament.

Per últim, vam obtenir una relació directa entre el percentatge i el nombre absolut de macròfags alveolars en BAL amb la quantitat de FABP4 present en aquestes mostres. Atès que no vam trobar cap associació entre la presència de macròfags i la presència d'infecció respiratòria, severitat, limitació respiratòria ni qualitat de vida, aquestes dades suggerien que la quantitat de FABP4 no va només relacionada amb el nombre de macròfags sinó també amb la capacitat que tenen aquests de produir FABP4.

5.1.2 Discussió i rellevància

La principal troballa del nostre estudi és que els nivells pulmonars de FABP4 es troben reduïts en pacients amb MPOC, concretament en aquells que tenen infecció respiratòria i una major severitat de la malaltia, determinada per una gran limitació respiratòria, una qualitat de vida pobre i un elevat nombre d'aguditzacions. A més, el fet que aquest resultat no es reproduïx a nivell sistèmic suggereix que és la desregulació local dels nivells de FABP4 la que està directament relacionada amb la infecció respiratòria i la severitat. Aquest resultat no s'havia descrit amb anterioritat en pacients amb MPOC i obre la porta a futurs estudis sobre els mecanismes que expliquin la reducció dels nivells de FABP4 i les seves implicacions a nivell immunològic.

Es coneix que FABP4 facilita la interacció entre macròfags i neutròfils a través de la secreció de la quimiocina CXCL1 en models experimentals. Aquest fet afavoriria l'arribada de neutròfils al lloc de la infecció per tal de combatre-la amb les seves funcions de fagocitosi, desgranulació, esclat respiratori i producció de trampes extracel·lulars. El fet que els nivells de FABP4 en BAL de pacients amb MPOC

s'associïn amb la presència de macròfags alveolars posa de manifest que els futurs estudis s'haurien de centrar en l'estudi de les subpoblacions de macròfags. D'aquesta manera, es podria conèixer més a fons el seu paper i així poder restablir els nivells pulmonars normals de FABP4.

5.2. ARTICLE II

Antimicrobial peptides, disease severity and exacerbations in bronchiectasis.

Oriol Sibila*, **Lídia Perea***, Elisabet Cantó, Amelia Shoemark, Diane Cassidy, Alexandria Holly Smith, Guillermo Suarez-Cuartin, Ana Rodrigo-Troyano, Holly R Keir, Martina Oriano, Samantha Ong, Silvia Vidal, Francesco Blasi, Stefano Aliberti, James D Chalmers.

Thorax. 2019 Sep;74(9):835-842.

5.2.1. Resum global de resultats

Els pèptids antimicrobians (PAMs) són essencials en la defensa de l'hoste contra els patògens. Es troben presents en totes les mucoses però de manera rellevant en l'epiteli respiratori, ja que contínuament entra aire potencialment contaminat als nostres pulmons. Els PAMs més abundants a nivell respiratori són la Lactoferrina i la Lisozima, però també hi ha PAMs que la seva rellevància ve per la seva associació directa amb un ambient inflamatori, com són LL-37 i SLPI. Un dels problemes immunològics que es produeix en les malalties respiratòries cròniques és que tot i que els pacients presenten una forta resposta inflamatòria, no s'aconsegueix una eficient eliminació dels patògens sinó que més aviat contribueix en el dany tissular de l'hoste. Aquest seguit d'esdeveniments és el que es coneix com a la teoria del cercle viciós. Degut a què la inflamació local en pacients amb bronquièctasis és principalment neutrofílica, i que l'epiteli respiratori és un dels elements més importants de la resposta immune innata com a barrera física, l'estudi dels PAMs pot contribuir a un major enteniment de la malaltia. Fins ara, mai s'havia estudiat la participació dels PAMs dins del cercle viciós dels pacients amb bronquièctasis.

Aquest treball es va dissenyar amb l'objectiu principal d'estudiar els nivells de Lactoferrina, Lisozima, LL-37 i SLPI en mostres d'esput de pacients amb bronquièctasis en fase d'estabilitat clínica i relacionar-ho amb la presència d'infecció respiratòria, la severitat i les futures aguditzacions. Les mostres recollides van ser

esputs, com a representació pulmonar, i sang, per mesurar el paper sistèmic dels PAMs.

A l'estudi es van incloure 135 pacients amb bronquièctasis en fase estable, dels quals un 64% presentava infecció respiratòria causada principalment per *P.aeruginosa* (45%). Quan vam analitzar els nivells de PAMs a nivell local i sistèmic, no vam trobar cap relació entre els dos compartiments. Tampoc existeix cap associació amb els nivells sistèmics en cap dels anàlisis que s'expliquen a continuació.

Al comparar els nivells pulmonars de PAMs en pacients amb diferents graus de severitat mesurada amb l'índex BSI, vam observar que els pacients més severs presentaven nivells elevats de LL-37 i nivells reduïts de SLPI. Quan vam utilitzar per l'anàlisi l'índex FACED, vam trobar que les associacions es mantien però la diferència entre grups era només una tendència estadística. Això suggereix que l'índex BSI dona pes a paràmetres relacionats amb els nivells pulmonars de PAMs. Aquestes diferències no es van veure en els nivells de Lactoferrina i Liozima. El que sí que vam trobar van ser correlacions dèbils entre els nivells pulmonars dels quatre PAMs i el paràmetre de FEV₁, sent correlacions indirectes les de LL-37, Lactoferrina i Liozima. Pel que fa al fenotip d'aguditzador freqüent, només vam observar uns nivells reduïts de SLPI comparat amb l'aguditzador no freqüent i amb els no aguditzadors.

Seguidament vam analitzar l'associació dels nivells pulmonars de PAMs amb la infecció respiratòria. Aquest anàlisi va revelar que els pacients amb infecció causada per *P.aeruginosa* presentaven nivells elevats de LL-37 i de Lactoferrina i nivells reduïts de SLPI, comparat amb els pacients infectats per altres bacteris i amb els pacients sense cap infecció. Respecte al tractament seguit per aquests pacients, no vam trobar cap associació entre els nivells pulmonars de PAMs i l'ús de macròlids crònics, corticoesteroides inhalats ni antibiòtics nebulitzats.

Per estudiar a fons la causa dels nivells pulmonars reduïts de SLPI en els pacients més severs i amb infecció respiratòria, vam determinar els nivells pulmonars de NE activa i de la MMP-9, conegudes per ser proteases capaces de tallar i inactivar l'SLPI. No vam trobar cap associació entre els nivells d'aquestes proteases i els de SLPI, tot i que els

nivells de Lactoferrina, Lisozima i LL-37 sí que es relacionaven amb la quantitat de NE activa. Aplicant l'estratègia de regressió múltiple vam trobar que l'activitat de NE i MMP-9 explicaria només un 23% de la reducció dels nivells de SLPI. Com aquestes proteases són capaces de tallar l'SLPI en productes de baix pes molecular, vam determinar per Western Blot el patró de SLPI. El que vam observar és que els espus dels pacients amb bronquièctasis presenten un patró heterogeni de tall de SLPI que no va associat a l'activitat NE ni MMP-9. Per últim, vam testar si l'addició exògena de NE a cèl·lules epitelials inhibia la secreció de SLPI, com recentment havia suggerit un estudi. En la mateixa línia que aquest treball, vam demostrar que la presència de NE, tot i tenir reduïda la seva funció de proteasa, inhibia la secreció de SLPI per part de les cèl·lules epitelials pulmonars. Aquesta troballa suggeria l'existència de la relació entre SLPI i NE independentment de la seva activitat proteasa.

Finalment, vam voler estudiar el paper dels nivells pulmonars de PAMs en la predicció de futures aguditzacions registrades durant un any de seguiment. Vam observar que aquells pacients que havien patit tres o més aguditzacions durant el seguiment, presentaven nivells elevats de LL-37 i nivells reduïts de SLPI comparat amb els pacients que havien patit una o dues aguditzacions i els pacients que no n'havien patit cap. Pel que fa a la Lactoferrina i la Lisozima, no vam trobar cap implicació amb la predicció de futures aguditzacions. D'acord amb els nivells de LL-37 i SLPI, vam establir com a punt de tall els valors per sobre i per sota de la mediana. Aquest anàlisi va revelar que els pacients que presentaven nivells elevats de LL-37 i nivells reduïts de SLPI, de manera independent, s'associaven amb un major risc de patir aguditzacions més aviat des del moment de la inclusió a l'estudi que la resta de la població. A més, també els nivells de LL-37 i SLPI predeïen l'hospitalització en casos d'aguditzacions severes.

5.2.2. Discussió i rellevància

La principal troballa d'aquest estudi és la capacitat de predir en pacients amb bronquièctasis estable el nombre d'aguditzacions futures, el temps que trigaran a patir-les i les hospitalitzacions en cas d'aguditzacions severes, utilitzant només dos elements

claus de la resposta immune innata, com són els PAMs LL-37 i SLPI. A més, junt amb la Lactoferrina i la Lisozima, és rellevant l'associació d'aquestes molècules amb la presència d'infecció respiratòria i amb el grau de severitat de la malaltia.

Aquest estudi suggereix que nivells pulmonars elevats de PAMs no contribueixen en l'eliminació dels bacteris causants de les infeccions respiratòries en un context d'inflamació crònica. Una de les explicacions per l'elevada quantitat de LL-37 però ineficient, pel que fa a la seva funció antimicrobiana, seria que la LL-37 és capaç d'interaccionar amb DNA i GAGs que, en un context inflamatori, inhibeixen la seva capacitat bactericida. Tot i així, aquesta interacció es desconeix en les bronquièctasis i caldrien futurs estudis per establir la relació d'aquestes alteracions amb els nivells de PAMs en pacients amb bronquièctasis. En resum, la rellevància d'aquest estudi és que els resultats sòlids aportats obren la porta al disseny d'estudis prospectius per validar LL-37 i SLPI com a biomarcadors de predicció de risc d'aguditzacions en pacients amb bronquièctasis.

5.3. ARTICLE III

A cluster analysis of bronchiectasis patients based on the airway immune profile

Lidia Perea*, Elisabet Cantó*, Guillermo Suarez-Cuartin, Stefano Aliberti, James D Chalmers, Oriol Sibila#, Silvia Vidal#.

En revisió a la revista *Chest*

5.3.1. Resum global de resultats

L'anàlisi de l' heterogeneïtat clínica en les bronquièctasis ha donat lloc a la identificació de diversos fenotips clínics de pacients. També l'agrupació dels pacients basada en l' heterogeneïtat biològica, coneguda com a endotips, és important per estudiar els mecanismes patobiològics de la malaltia. En malalties respiratòries cròniques com la MPOC i l'asma s'han establert clústers immunològics de pacients basats en citocines, quimiocines i poblacions cel·lulars locals i sistèmiques que permeten identificar grups de pacients amb diferent freqüència d'aguditzacions. Tot i així, encara no s'ha aplicat aquesta estratègia de clústers immunològics en l'estudi de l' heterogeneïtat clínica dels pacients amb bronquièctasis.

En primer lloc, aquest estudi es va dissenyar amb l'objectiu d'aplicar l'estratègia de clústers basada en els nivells pulmonars de PAMs per tal d'identificar grups de pacients. En segon lloc, es va estudiar la validesa clínica d'aquests clústers immunològics pel que fa a la freqüència d'infecció respiratòria i la severitat de la malaltia. En tercer lloc, es van analitzar en cada clúster les associacions entre els PAMs, la inflamació pulmonar i el dany i remodelació tissular. Finalment, es va estudiar la relació entre aquests clústers immunològics i el risc a patir de futures aguditzacions. Les mostres recollides van ser esputs com a representació pulmonar.

A l'estudi es van incloure 128 pacients amb bronquièctasis en fase estable i 8 voluntaris sense cap condició respiratòria i amb una funció pulmonar mantinguda. Per fer l'anàlisi de clústers es van escollir aquelles variables que eren independents entre elles: LL-37 i SLPI. Així es van generar tres clústers (Clúster 1, Clúster 2, Clúster 3) on els nivells pulmonars de Lactoferrina, Lisozima, LL-37 i SLPI eren diferents significativament entre ells. Amb l'anàlisi de les variables clíniques prèvies a la inclusió, vam observar que el Clúster 3 incloïa un percentatge elevat de pacients que havien estat tractats amb corticoesteroides inhalats (71%), amb beta-agonistes de llarga acció (81%) i que havien patit un episodi d'infecció per *Bordetella pertussis* (27%).

Quan vam comparar els nivells pulmonars de PAMs dels pacients amb bronquièctasis amb els controls inclosos, vam observar que els pacients amb bronquièctasis presentaven nivells pulmonars elevats de LL-37 i nivells reduïts de SLPI. Els nivells pulmonars de Lactoferrina i Lisozima eren els mateixos que en els controls. El Clúster 1 era el grup de pacients més similar als controls en quant als nivells pulmonars de PAMs.

Pel que fa a la infecció respiratòria, vam observar que el Clúster 1 presentava el menor percentatge d'infecció amb un 42.4%, seguit pel Clúster 2 amb un 67.6% i finalment, pel Clúster 3 amb un 85.7%. El mateix patró s'observava quan analitzàvem el percentatge d'infecció respiratòria causada per *P.aeruginosa*: el Clúster 1 presentava un 12.1%, el Clúster 2 un 31.1% i el Clúster 3 un 52.4%.

En l'anàlisi de la severitat clínica de cada clúster també s'observaven diferents graus de severitat avaluada mitjançant l'índex BSI, l'índex FACED i paràmetres individuals inclosos dins d'aquests índex com són l'IMC i el FEV₁. El Clúster 3 presentava un grau de severitat clínica major que el Clúster 2 i que el Clúster 1.

Per avaluar la inflamació pulmonar vam utilitzar els paràmetres: IL-8, TGF- β i IL-6. Vam observar que els nivells més elevats de IL-8 es trobaven en el Clúster 3. Entre el Clúster 2 i el Clúster 1 també trobàvem diferències en quant als nivells de TGF- β i IL-6. Degut a què està descrit que en les bronquièctasis predomina una inflamació

neutrofílica, vam voler estudiar si el contingut de factors solubles dels esputs procedents dels tres clústers tenien una capacitat diferent d'atreure neutròfils sans, per tal de reproduir el que podia estar passant *in vivo*. Aquest assaig el vam fer *in vitro* utilitzant *transwells* de cultiu cel·lular dins dels quals afegíem una concentració coneguda de neutròfils aïllats de sang perifèrica de donants sans, i al pouet de la part inferior de la placa de cultius afegíem medi de cultiu suplementat amb el 10% de sobrenedant d'esput. Un cop passat el temps d'incubació de 4 hores, recuperàvem els neutròfils que havien passat a través del *transwell* i que s'havien dipositat en el pouet i després fèiem el recompte per citometria de flux. Tot i que no vam trobar diferències significatives entre els tres clústers, sí que vam observar que els esputs que contenien major nivells de IL-8 i de LL-37 eren capaços d'atreure més neutròfils.

Per mesurar els nivells de remodelació i dany tissular vam determinar els GAGs, l'activitat de la NE i MMP-9, i el ADN total i bacterià. Seguint la mateixa gradació que anteriorment, el Clúster 3 era el que presentava nivells més elevats de GAGs, NE i MMP-9 activa, ADN total i bacterià. A més, vam observar que el Clúster 2 tendia a presentar nivells més elevats de GAGs que el Clúster 1.

Per tenir una visió global de la resposta immune innata en cadascun dels clústers de pacients amb bronquièctasis, vam analitzar les associacions entre els nivells pulmonars de PAMs, la inflamació local i la remodelació i dany tissular. Aquest anàlisi va revelar diferents patrons d'associacions entre aquests paràmetres immunològics en cadascun dels clústers. L'associació entre els nivells pulmonars de PAMs i la inflamació local era molt similar entre el Clúster 1 i el 2 però no s'observava en el Clúster 3. De fet, l'única correlació que es mantenia en els tres clústers era aquella entre Lisozima i TGF- β , però en el Clúster 1 i 2 era una correlació directa mentre que en el Clúster 3 era indirecta. Tampoc vam observar cap associació entre nivells de PAMs i remodelació i dany tissular en el Clúster 3. En canvi, sí que vam observar associacions noves més potents en el Clúster 2 comparat amb el Clúster 1. És interessant que l'única associació mantinguda en els tres clústers que vam trobar era entre la Lactoferrina i el ADN total.

Finalment, vam voler estudiar si aquests clústers immunològics podien predir el risc de futures aguditzacions. Els pacients que havien patit tres o més aguditzacions durant un any de seguiment representaven un 24.2% en el Clúster 1, un 37.8% en el Clúster 2 i un 66.7% en el Clúster 3. A més, també de manera gradual, els pacients del Clúster 3 patien més aguditzacions severes que requerien hospitalització comparat amb els pacients del Clúster 1 i del Clúster 2. Respecte al temps que trigaven a patir una futura agudització des del moment de la inclusió a l'estudi, els pacients del Clúster 3 eren els que trigaven menys temps a aguditzar, seguits dels pacients del Clúster 2 i finalment, els que més trigaven a fer-ho eren els del Clúster 1.

5.3.2. Discussió i rellevància

La principal troballa d'aquest estudi és que l'estratègia de clústers basada en els nivells pulmonars de PAMs permet identificar tres clústers immunològics associats amb diferents perfils d'inflamació local, remodelació i dany tissular. Això suggereix que existeixen diferents associacions entre els PAMs, les molècules de la resposta immune innata i el grau de severitat clínica del pacient.

La rellevància d'aquest estudi recau en que l'anàlisi de la combinació de diferents paràmetres de la resposta immune innata mostra una clara validesa clínica. Aquesta afirmació és recolzada pels resultats que mostren que aquests clústers immunològics representen grups de pacients amb diferents graus de severitat clínica, tant referent al passat (tractaments seguits i infeccions patides), com al present (infecció respiratòria, índexs de severitat i activitat de la malaltia), com al futur (nombre, severitat i temps que trigaran a patir aguditzacions futures). Tot i així, seria interessant incloure en futurs estudis mostres recollides de manera prospectiva per tal d'analitzar l'estabilitat a llarg termini d'aquests clústers immunològics. En resum, aquest estudi remarca la importància d'identificar pacients amb bronquièctasis en diferents graus de severitat clínica basant-se en els perfils pulmonars de la seva resposta immune per tal de desenvolupar teràpies que ajudin a restablir la seva homeòstasi pulmonar immunitària.

6. CONCLUSIONS

6.1. CONCLUSIONS

1. Els nivells pulmonars de FABP4 es troben reduïts en els pacients amb MPOC comparats amb els controls. Així, l'alteració pulmonar, mesurada pels canvis en FABP4, es confirma a la patologia de la MPOC.
2. Dins dels pacients amb MPOC, aquells que presenten infecció respiratòria i major severitat clínica són els que tenen els nivells pulmonars més reduïts de FABP4. En canvi, aquestes troballes no s'observen a nivell sistèmic. Per tant, es suggereix el paper protector dels nivells pulmonars de FABP4 enfront les infeccions respiratòries.
3. Els nivells pulmonars de FABP4 es correlacionen amb la quantitat de macròfags alveolars però, aquests últims, no s'associen amb la presència d'infecció respiratòria ni severitat clínica.
4. Els pacients amb bronquièctasis presenten nivells pulmonars elevats de LL-37 i nivells reduïts de SLPI comparat amb els controls, associant així aquests canvis a la patologia de les bronquièctasis.
5. Dins dels pacients amb bronquièctasis, aquells que presenten infecció respiratòria per *P.aeruginosa*, major severitat clínica i major risc d'aguditzacions futures són els que tenen, de manera independent, els nivells pulmonars més elevats de LL-37 i els nivells més reduïts de SLPI. Aquestes troballes no s'observen a nivell sistèmic, de manera que suggereixen el paper inflamatori dels nivells pulmonars de LL-37 i el paper protector de SLPI enfront les infeccions respiratòries.
6. Els nivells pulmonars reduïts de SLPI en les bronquièctasis són deguts a la presència de NE que inhibeix la secreció de SLPI per part de les cèl·lules epitelials, mitjançant mecanismes independents de la seva funció proteasa.

7. L'anàlisi de conglomerats basada en els nivells pulmonars de PAMs genera tres clústers immunològics de pacients amb bronquièctasis amb diferents perfils d'inflamació local, remodelació i dany tissular. A més, aquests clústers representen pacients amb diferències en quant a la presència d'infecció respiratòria, severitat clínica i risc de patir futures aguditzacions.
8. Les mesures indirectes de la presència de neutròfils, com són la IL-8 i la NE, suggereixen que els pacients del Clúster 3, amb major freqüència d'infeccions, severitat i risc d'aguditzacions, són els que tenen també una major inflamació neutrofilica.
9. L'estudi del grau de correlació entre els diferents mediadors immunològics mesurats permet identificar el clúster amb major desregulació de la resposta immune innata, corresponent al Clúster 3.

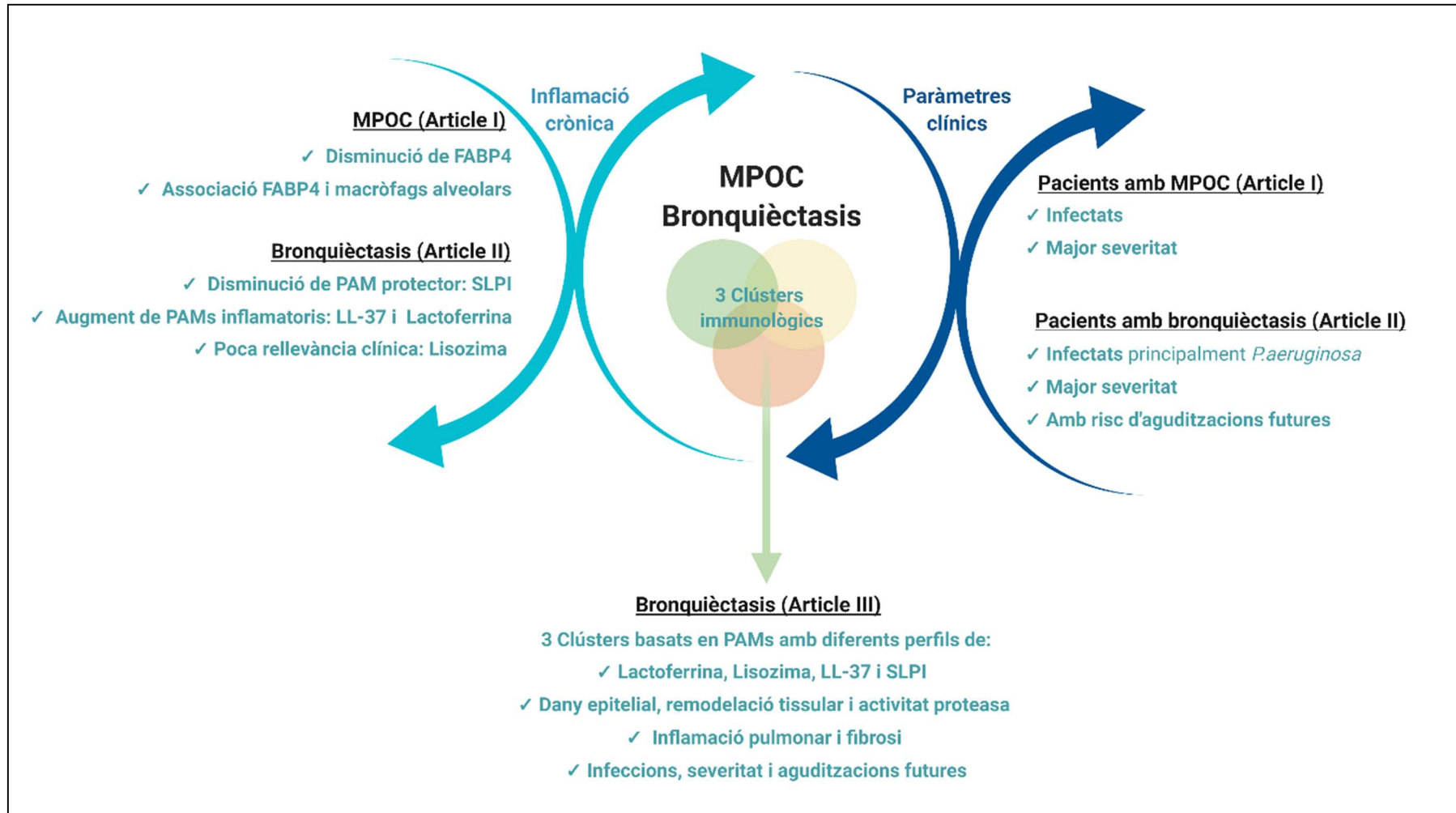


Figura 14. Esquema final del model presentat en la hipòtesi amb els resultats més rellevants de la tesi.

7. BIBLIOGRAFIA

7.1. BIBLIOGRAFIA

1. WHO - World Health Organization - Chronic respiratory diseases. https://www.who.int/health-topics/chronic-respiratory-diseases#tab=tab_1
2. Bousquet J, Kiley J, Bateman ED, Viegi G, Cruz AA, Khaltaev N, et al. Prioritised research agenda for prevention and control of chronic respiratory diseases. *Eur Respir J*. 2010;36(5):995-1001.
3. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease - GOLD. <https://goldcopd.org/>
4. Global Initiative for Asthma - GINA. <https://ginasthma.org/>
5. Crummy F, Piper AJ, Naughton MT. Obesity and the lung: 2 · Obesity and sleep-disordered breathing. *Thorax*. 2008;63(8):738-746.
6. Agustí A, Bel E, Thomas M, Vogelmeier C, Brusselle G, Holgate S, et al. Treatable traits: Toward precision medicine of chronic airway diseases. *Eur Respir J*. 2016;47(2):410-419.
7. Agustí A, Bafadhel M, Beasley R, Bel EH, Faner R, Gibson PG, et al. Precision medicine in airway diseases: moving to clinical practice. *Eur Respir J*. 2017;50(4).
8. Agustí A, Celli B, Faner R. What does endotyping mean for treatment in chronic obstructive pulmonary disease? *Lancet*. 2017;390(10098):980-987.
9. Bateman ED, Reddel HK, van Zyl-Smit RN, Agustí A. The asthma-COPD overlap syndrome: Towards a revised taxonomy of chronic airways diseases? *Lancet Respir Med*. 2015;3(9):719-728.
10. Wedzicha JA, Miravittles M, Hurst JR, Calverley PMA, Albert RK, Anzueto A, et al. Management of COPD exacerbations: A European Respiratory Society/American Thoracic Society guideline. *Eur Respir J*. 2017;50(4).
11. Dicker D, Nguyen G, Abate D, Abate KH, Abay SM, Abbafati C, et al. *Global, Regional, and National Age-Sex-Specific Mortality for 282 Causes of Death in 195 Countries and Territories, 1980-2017: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2017 GBD 2017 Causes of Death Collaborators**. Vol 392. Lancet Publishing Group; 2018.
12. Vogelmeier CF, Criner GJ, Martinez FJ, Anzueto A, Barnes PJ, Bourbeau J, et al. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive lung disease 2017 report. *Am J Respir Crit Care Med*. 2017;195(5):557-582.
13. Su YC, Jalalvand F, Thegerström J, Riesbeck K. The interplay between immune response and bacterial infection in COPD: Focus Upon non-typeable *Haemophilus influenzae*. *Front Immunol*. 2018;9:2530.
14. MacNee W. ABC of chronic obstructive pulmonary disease: Pathology, pathogenesis, and

- pathophysiology. *BMJ*. 2006;332(7551):1202.
15. Agrawal R, Moghtader S, Ayyala U, Bandi V, Sharafkhaneh A. Update on management of stable chronic obstructive pulmonary disease. *J Thorac Dis*. 2019;11(Suppl 14):S1800-S1809.
 16. Singh D, Agusti A, Anzueto A, Barnes PJ, Bourbeau J, Celli BR, et al. Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Lung Disease: the GOLD science committee report 2019. *Eur Respir J*. 2019;53(5):1900164.
 17. Gross N, Tashkin D, Miller R, Oren J, Coleman W, Linberg S. Inhalation by nebulization of albuterol-ipratropium combination (Dey combination) is superior to either agent alone in the treatment of chronic obstructive pulmonary disease. *Respiration*. 1998;65(5):354-362.
 18. Bone R, Boyars M, Braun SR, Buist AS, Campbell S, Chick T, et al. In chronic obstructive pulmonary disease, a combination of ipratropium and albuterol is more effective than either agent alone: An 85-day multicenter trial. *Chest*. 1994;105(5):1411-1419.
 19. Karner C, Chong J, Poole P. Tiotropium versus placebo for chronic obstructive pulmonary disease. *Cochrane Database Syst Rev*. 2014;(7).
 20. Wedzicha JA, Calverley PM, Rabe KF. Roflumilast: A review of its use in the treatment of COPD. *Int J COPD*. 2016;11:81-90.
 21. Yang IA, Clarke MS, Sim EH, Fong KM. Inhaled corticosteroids for stable chronic obstructive pulmonary disease. *Cochrane Database Syst Rev*. 2012;(7).
 22. Zheng Y, Zhu J, Liu Y, Lai W, Lin C, Qiu K, et al. Triple therapy in the management of chronic obstructive pulmonary disease: systematic review and meta-analysis. *BMJ*. 2018;363:k4388.
 23. Martinez FJ, Rabe KF, Calverley PMA, Fabbri LM, Sethi S, Pizzichini E, et al. Determinants of response to roflumilast in severe chronic obstructive pulmonary disease: Pooled analysis of two randomized trials. *Am J Respir Crit Care Med*. 2018;198(10):1268-1278.
 24. Albert RK, Connett J, Bailey WC, Casaburi R, Cooper JAD, Criner GJ, et al. Azithromycin for prevention of exacerbations of COPD. *N Engl J Med*. 2011;365(8):689-698.
 25. Culver BH. Assessment of severity and prognosis in COPD: Moving beyond percent of predicted. *Eur Respir J*. 2018;52(2).
 26. Smith LJE, Moore E, Ali I, Smeeth L, Stone P, Quint JK. Prognostic variables and scores identifying the end of life in COPD: A systematic review. *Int J COPD*. 2017;12:2239-2256.
 27. Keistinen T, Säynäjäkangas O, Tuuponen T, Kivelä SL. Bronchiectasis: an orphan disease with a poorly-understood prognosis. *Eur Respir J*. 1997;10(12):2784-2787.

28. Chalmers JD, Aliberti S, Polverino E, Vendrell M, Crichton M, Loebinger M, et al. The EMBARC European Bronchiectasis Registry: protocol for an international observational study. *ERJ open Res.* 2016;2(1).
29. Martínez-García MA, Villa C, Dobarganes Y, Girón R, Maíz L, García-Clemente M, et al. RIBRON: The spanish Online Bronchiectasis Registry. Characterization of the First 1912 Patients. *Arch Bronconeumol.* Published online 2020.
30. Chalmers JD, Chang AB, Chotirmall SH, Dhar R, McShane PJ. Bronchiectasis. *Nat Rev Dis Prim.* 2018;4(1).
31. Lonni S, Chalmers JD, Goeminne PC, McDonnell MJ, Dimakou K, De Soyza A, et al. Etiology of non-cystic fibrosis bronchiectasis in adults and its correlation to disease severity. *Ann Am Thorac Soc.* 2015;12(12):1764-1770.
32. Chalmers JD, Aliberti S, Blasi F. Management of bronchiectasis in adults. *Eur Respir J.* 2015;45(5):1446-1462.
33. Chalmers JD, Goeminne P, Aliberti S, McDonnell MJ, Lonni S, Davidson J, et al. The bronchiectasis severity index. An international derivation and validation study. *Am J Respir Crit Care Med.* 2014;189(5):576-585.
34. McDonnell MJ, Aliberti S, Goeminne PC, Dimakou K, Zucchetti SC, Davidson J, et al. Multidimensional severity assessment in bronchiectasis: an analysis of seven European cohorts. *Thorax.* 2016;71(12):1110-1118.
35. Chalmers JD, McHugh BJ, Docherty C, Govan JRW, Hill AT. Vitamin-D deficiency is associated with chronic bacterial colonisation and disease severity in bronchiectasis. *Thorax.* 2013;68(1):39-47.
36. Sjögren P, Nilsson E, Forsell M, Johansson O, Hoogstraate J. A systematic review of the preventive effect of oral hygiene on pneumonia and respiratory tract infection in elderly people in hospitals and nursing homes: Effect estimates and methodological quality of randomized controlled trials. *J Am Geriatr Soc.* 2008;56(11):2124-2130.
37. Polverino E, Goeminne PC, McDonnell MJ, Aliberti S, Marshall SE, Loebinger MR, et al. European Respiratory Society guidelines for the management of adult bronchiectasis. *Eur Respir J.* 2017;50(3).
38. Lee AL, Burge AT, Holland AE. Airway clearance techniques for bronchiectasis. *Cochrane Database Syst Rev.* 2015;2015(11).
39. Muñoz G, De Gracia J, Buxó M, Alvarez A, Vendrell M. Long-term benefits of airway clearance in bronchiectasis: A randomised placebo-controlled trial. *Eur Respir J.* 2018;51(1).

40. Wong C, Sullivan C, Jayaram L. ELTGOL airway clearance in bronchiectasis: Laying the bricks of evidence. *Eur Respir J*. 2018;51(1).
41. Contoli M, Pauletti A, Rossi MR, Spanevello A, Casolari P, Marcellini A, et al. Long-term effects of inhaled corticosteroids on sputum bacterial and viral loads in COPD. *Eur Respir J*. 2017;50(4).
42. Chang AB, Bell SC, Torzillo PJ, King PT, Maguire GP, Byrnes CA, et al. Chronic suppurative lung disease and bronchiectasis in children and adults in Australia and New Zealand. *Med J Aust*. 2015;202(1):21-24.
43. Bedi P, Chalmers JD, Graham C, Clarke A, Donaldson S, Doherty C, et al. A Randomized Controlled Trial of Atorvastatin in Patients With Bronchiectasis Infected With *Pseudomonas Aeruginosa*: A Proof of Concept Study. *Chest*. 2017;152(2):368-378.
44. Mandal P, Chalmers JD, Graham C, Harley C, Sidhu MK, Doherty C, et al. Atorvastatin as a stable treatment in bronchiectasis: A randomised controlled trial. *Lancet Respir Med*. 2014;2(6):455-463.
45. De Soyza A, Pavord I, Elborn JS, Smith D, Wray H, Puu M, et al. A randomised, placebo-controlled study of the CXCR2 antagonist AZD5069 in bronchiectasis. *Eur Respir J*. 2015;46:1021-1032.
46. Konstan MW, Döring G, Heltshe SL, Lands LC, Hilliard KA, Koker P, et al. A randomized double blind, placebo controlled phase 2 trial of BIIL 284 BS (an LTB4 receptor antagonist) for the treatment of lung disease in children and adults with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*. 2014;13(2):148-155.
47. Chalmers JD, Haworth CS, Metersky ML, Loebinger MR, Blasi F, Sibila O, et al. Phase 2 Trial of the DPP-1 Inhibitor Brensocatib in Bronchiectasis. *N Engl J Med*. Published online September 7, 2020.
48. Kelly C, Chalmers JD, Crossingham I, Relph N, Felix LM, Evans DJ, et al. Macrolide antibiotics for bronchiectasis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2018;(3).
49. Köhler T, Perron GG, Buckling A, van Delden C. Quorum sensing inhibition selects for virulence and cooperation in *pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Pathog*. 2010;6(5):1-6.
50. Serisier DJ, Martin ML, McGuckin MA, Lourie R, Chen AC, Brain B, et al. Effect of long-term, low-dose erythromycin on pulmonary exacerbations among patients with non-cystic fibrosis bronchiectasis: The BLESS randomized controlled trial. *JAMA - J Am Med Assoc*. 2013;309(12):1260-1267.
51. Wong C, Jayaram L, Karalus N, Eaton T, Tong C, Hockey H, et al. Azithromycin for

- prevention of exacerbations in non-cystic fibrosis bronchiectasis (EMBRACE): A randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet*. 2012;380(9842):660-667.
52. Altenburg J, De Graaff CS, Stienstra Y, Sloos JH, Van Haren EHJ, Koppers RJH, et al. Effect of azithromycin maintenance treatment on infectious exacerbations among patients with non-cystic fibrosis bronchiectasis: The BAT randomized controlled trial. *JAMA - J Am Med Assoc*. 2013;309(12):1251-1259.
 53. Valery PC, Morris PS, Byrnes CA, Grimwood K, Torzillo PJ, Bauert PA, et al. Long-term azithromycin for Indigenous children with non-cystic-fibrosis bronchiectasis or chronic suppurative lung disease (Bronchiectasis Intervention Study): A multicentre, double-blind, randomised controlled trial. *Lancet Respir Med*. 2013;1(8):610-620.
 54. Chalmers JD, Smith MP, McHugh BJ, Doherty C, Govan JR, Hill AT. Short- and long-term antibiotic treatment reduces airway and systemic inflammation in non-cystic fibrosis bronchiectasis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012;186(7):657-665.
 55. Barker AF, Couch L, Fiel SB, Gotfried MH, Ilowite J, Meyer KC, et al. Tobramycin solution for inhalation reduces sputum *Pseudomonas aeruginosa* density in bronchiectasis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;162(2 Pt 1):481-485.
 56. Haworth CS, Foweraker JE, Wilkinson P, Kenyon RF, Bilton D. Inhaled colistin in patients with bronchiectasis and chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Am J Respir Crit Care Med*. 2014;189(8):975-982.
 57. Murray MP, Govan JRW, Doherty CJ, Simpson AJ, Wilkinson TS, Chalmers JD, et al. A randomized controlled trial of nebulized gentamicin in non-cystic fibrosis bronchiectasis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011;183(4):491-499.
 58. Barker AF, O'Donnell AE, Flume P, Thompson PJ, Ruzi JD, De Gracia J, et al. Aztreonam for inhalation solution in patients with non-cystic fibrosis bronchiectasis (AIR-BX1 and AIR-BX2): Two randomised double-blind, placebo-controlled phase 3 trials. *Lancet Respir Med*. 2014;2(9):738-749.
 59. Aksamit T, De Soyza A, Bandel T-J, Criollo M, Elborn JS, Operschall E, et al. RESPIRE 2: a phase III placebo-controlled randomised trial of ciprofloxacin dry powder for inhalation in non-cystic fibrosis bronchiectasis. *Eur Respir J*. 2018;51(1):1702053.
 60. Sibila O, Laserna E, Shoemark A, Keir HR, Finch S, Rodrigo-Troyano A, et al. Airway Bacterial Load and Inhaled Antibiotic Response in Bronchiectasis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2019;200(1):33-41.
 61. Chalmers JD, Aliberti S, Filonenko A, Shteinberg M, Goeminne PC, Hill AT, et al. Characterization of the "frequent exacerbator phenotype" in bronchiectasis. *Am J Respir Crit*

- Care Med.* 2018;197(11):1410-1420.
62. Chalmers JD, Moffitt KL, Suarez-Cuartin G, Sibila O, Finch S, Furrrie E, et al. Neutrophil elastase activity is associated with exacerbations and lung function decline in bronchiectasis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2017;195(10):1384-1393.
 63. Zalacain R, Sobradillo V, Amilibia J, Barrón J, Achótegui V, Pijoan JI, et al. Predisposing factors to bacterial colonization in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J.* 1999;13(2):343-348.
 64. Cabello H, Torres A, Celis R, El-Ebiary M, Puig de la Bellacasa J, Xaubet A, et al. Bacterial colonization of distal airways in healthy subjects and chronic lung disease: a bronchoscopic study. *Eur Respir J.* 1997;10(5):1137-1144.
 65. Monsó E, Rosell A, Bonet G, Manterola J, Cardona PJ, Ruiz J, et al. Risk factors for lower airway bacterial colonization in chronic bronchitis. *Eur Respir J.* 1999;13(2):338-342.
 66. Metersky ML, Aksamit TR, Barker A, Choate R, Daley CL, Daniels LA, et al. The prevalence and significance of *Staphylococcus aureus* in patients with non-cystic fibrosis bronchiectasis. *Ann Am Thorac Soc.* 2018;15(3):365-370.
 67. Patel IS, Seemungal TAR, Wilks M, Lloyd-Owen SJ, Donaldson GC, Wedzicha JA. Relationship between bacterial colonisation and the frequency, character, and severity of COPD exacerbations. *Thorax.* 2002;57(9):759-764.
 68. Cigana C, Lorè NI, Bernardini ML, Bragonzi A. Dampening host sensing and avoiding recognition in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *J Biomed Biotechnol.* 2011;2011:852513.
 69. Finch S, McDonnell MJ, Abo-Leyah H, Aliberti S, Chalmers JD. A Comprehensive Analysis of the Impact of *Pseudomonas aeruginosa* Colonization on Prognosis in Adult Bronchiectasis. *Ann Am Thorac Soc.* 2015;12(11):1602-1611.
 70. Araújo D, Shteinberg M, Aliberti S, Goeminne PC, Hill AT, Fardon TC, et al. The independent contribution of *Pseudomonas aeruginosa* infection to long-term clinical outcomes in bronchiectasis. *Eur Respir J.* 2018;51(2).
 71. Mantero M, Rogliani P, Di Pasquale M, Polverino E, Crisafulli E, Guerrero M, et al. Acute exacerbations of COPD: Risk factors for failure and relapse. *Int J COPD.* 2017;12:2687-2693.
 72. Amati F, Simonetta E, Gramegna A, Tarsia P, Contarini M, Blasi F, et al. The biology of pulmonary exacerbations in bronchiectasis.
 73. Quint JK, Millett ERC, Joshi M, Navaratnam V, Thomas SL, Hurst JR, et al. Changes in the incidence, prevalence and mortality of bronchiectasis in the UK from 2004 to 2013: A population-based cohort study. *Eur Respir J.* 2016;47(1):186-193.

74. Seitz AE, Olivier KN, Steiner CA, De Oca RM, Holland SM, Prevots DR. Trends and burden of bronchiectasis-associated hospitalizations in the United States, 1993-2006. *Chest*. 2010;138(4):944-949.
75. Celli BR, Barnes PJ. Exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J*. 2007;29(6):1224-1238.
76. Soler-Cataluña JJ, Martínez-García MÁ, Román Sánchez P, Salcedo E, Navarro M, Ochando R. Severe acute exacerbations and mortality in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax*. 2005;60(11):925-931.
77. Dalal AA, Shah M, D'Souza AO, Rane P. Costs of COPD exacerbations in the emergency department and inpatient setting. *Respir Med*. 2011;105(3):454-460.
78. White AJ, Gompertz S, Stockley RA. Chronic obstructive pulmonary disease . 6: The aetiology of exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax*. 2003;58(1):73-80.
79. Duell BL, Su YC, Riesbeck K. Host–pathogen interactions of nontypeable *Haemophilus influenzae*: from commensal to pathogen. *FEBS Lett*. 2016;590(21):3840-3853.
80. Rodrigo-Troyano A, Melo V, Marcos PJ, Laserna E, Peiro M, Suarez-Cuartin G, et al. *Pseudomonas aeruginosa* in chronic obstructive pulmonary disease patients with frequent hospitalized exacerbations: A prospective multicentre study. *Respiration*. 2018;96(5):417-424.
81. Rodrigo-Troyano A, Suarez-Cuartin G, Peiró M, Barril S, Castillo D, Sanchez-Reus F, et al. *Pseudomonas aeruginosa* resistance patterns and clinical outcomes in hospitalized exacerbations of COPD. *Respirology*. 2016;21(7):1235-1242.
82. Seemungal T, Harper-Owen R, Bhowmik A, Moric I, Sanderson G, Message S, et al. Respiratory viruses, symptoms, and inflammatory markers in acute exacerbations and stable chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;164(9):1618-1623.
83. Miravittles M, Ferrer M, Pont A, Zalacain R, Alvarez-Sala JL, Masa F, et al. Effect of exacerbations on quality of life in patients with chronic obstructive pulmonary disease: a 2 year follow up study. *Thorax*. 2004;59(5):387-395.
84. Han MK, Quibrera PM, Carretta EE, Graham Barr R, Bleecker ER, Bowler RP, et al. Frequency of Exacerbations in COPD: An Analysis of the SPIROMICS Cohort HHS Public Access. *Lancet Respir Med*. 2017;5(8):619-626.
85. Le Rouzic O, Roche N, Cortot AB, Tillie-Leblond I, Masure F, Perez T, et al. Defining the “Frequent Exacerbator” Phenotype in COPD: A Hypothesis-Free Approach. *Chest*. 2018;153(5):1106-1115.
86. Hurst JR, Vestbo J, Anzueto A, Locantore N, Müllerova H, Tal-Singer R, et al. Susceptibility to

- exacerbation in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med.* 2010;363(12):1128-1138.
87. Cole PJ. Inflammation: A two-edged sword - The model of bronchiectasis. *Eur J Respir Dis.* 1986;69(SUPPL. 147):6-15.
 88. Paulsson M, Riesbeck K. How bacteria hack the matrix and dodge the bullets of immunity. *Eur Respir Rev.* 2018;27(148).
 89. Wittekindt OH. Tight junctions in pulmonary epithelia during lung inflammation. *Pflugers Arch Eur J Physiol.* 2017;469(1):135-147.
 90. Fahy J V., Dickey BF. Airway mucus function and dysfunction. *N Engl J Med.* 2010;363(23):2233-2247.
 91. Rock JR, Randell SH, Hogan BLM. Airway basal stem cells: A perspective on their roles in epithelial homeostasis and remodeling. *DMM Dis Model Mech.* 2010;3(9-10):545-556.
 92. Rawlins EL, Okubo T, Que J, Xue Y, Clark C, Luo X, et al. Epithelial stem/progenitor cells in lung postnatal growth, maintenance, and repair. In: *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology.* Vol 73. Cold Spring Harb Symp Quant Biol; 2008:291-295.
 93. Kesimer M, Kirkham S, Pickles RJ, Henderson AG, Alexis NE, Demaria G, et al. Tracheobronchial air-liquid interface cell culture: A model for innate mucosal defense of the upper airways? *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol.* 2009;296(1).
 94. Evans SE, Xu Y, Tuvim MJ, Dickey BF. Inducible Innate Resistance of Lung Epithelium to Infection. *Annu Rev Physiol.* 2010;72(1):413-435.
 95. Saetta M, Turato G, Baraldo S, Zanin A, Braccioni F, Mapp CE, et al. Goblet cell hyperplasia and epithelial inflammation in peripheral airways of smokers with both symptoms of chronic bronchitis and chronic airflow limitation. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;161(3 I):1016-1021.
 96. Houtmeyers E, Gosselink R, Gayan-Ramirez G, Decramer M. Regulation of mucociliary clearance in health and disease. *Eur Respir J.* 1999;13(5):1177-1188.
 97. Walker WT, Jackson CL, Allan RN, Collins SA, Kelso MJ, Rineh A, et al. Primary ciliary dyskinesia ciliated airway cells show increased susceptibility to Haemophilus influenzae biofilm formation. *Eur Respir J.* 2017;50(3).
 98. Smallman LA, Hill SL, Stockley RA. Reduction of ciliary beat frequency in vitro by sputum from patients with bronchiectasis: A serine proteinase effect. *Thorax.* 1984;39(9):663-667.
 99. Gilley SK, Stenbit AE, Pasek RC, Sas KM, Steele SL, Amria M, et al. Deletion of airway cilia results in noninflammatory bronchiectasis and hyperreactive airways. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol.* 2014;306(2).

100. Barkauskas CE, Crouse MJ, Rackley CR, Bowie EJ, Keene DR, Stripp BR, et al. Type 2 alveolar cells are stem cells in adult lung. *J Clin Invest*. 2013;123(7):3025-3036.
101. Goerke J. Pulmonary surfactant: Functions and molecular composition. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis*. 1998;1408(2-3):79-89.
102. Crouch E, Wright JR. Surfactant Proteins A and D and Pulmonary Host Defense. *Annu Rev Physiol*. 2001;63(1):521-554.
103. Mercado N, Ito K, Barnes PJ. Accelerated ageing of the lung in COPD: New concepts. *Thorax*. 2015;70(5):482-489.
104. Thornton DJ, Sheehan JK. From mucins to mucus: toward a more coherent understanding of this essential barrier. *Proc Am Thorac Soc*. 2004;1(1):54-61.
105. Cone RA. Barrier properties of mucus. *Adv Drug Deliv Rev*. 2009;61(2):75-85.
106. Rubin BK. Mucus and Mucins. *Otolaryngol Clin North Am*. 2010;43(1):27-34.
107. Smart JD. The basics and underlying mechanisms of mucoadhesion. *Adv Drug Deliv Rev*. 2005;57(11):1556-1568.
108. D'Anna C, Cigna D, Di Sano C, Di Vincenzo S, Dino P, Ferraro M, et al. Exposure to cigarette smoke extract and lipopolysaccharide modifies cytoskeleton organization in bronchial epithelial cells. *Exp Lung Res*. 2017;43(9-10):347-358.
109. Aghapour M, Rhee P, Moghaddam SJ, Hiemstra PS, Heijink IH. Airway epithelial barrier dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease: Role of cigarette smoke exposure. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2018;58(2):157-169.
110. Burgstaller G, Oehrle B, Gerckens M, White ES, Schiller HB, Eickelberg O. The instructive extracellular matrix of the lung: Basic composition and alterations in chronic lung disease. *Eur Respir J*. 2017;50(1).
111. Papi A, Casoni G, Caramori G, Guzzinati I, Boschetto P, Ravenna F, et al. COPD increases the risk of squamous histological subtype in smokers who develop non-small cell lung carcinoma. *Thorax*. 2004;59(8):679-681.
112. Devalia JL, Davies RJ. Airway epithelial cells and mediators of inflammation. *Respir Med*. 1993;87(6):405-408.
113. Chalmers JD, Hill AT. Mechanisms of immune dysfunction and bacterial persistence in non-cystic fibrosis bronchiectasis. *Mol Immunol*. 2013;55(1):27-34.
114. Åhrman E, Hallgren O, Malmström L, Hedström U, Malmström A, Bjermer L, et al. Quantitative proteomic characterization of the lung extracellular matrix in chronic obstructive

- pulmonary disease and idiopathic pulmonary fibrosis. *J Proteomics*. 2018;189:23-33.
115. Sandhaus RA, Turino G. Neutrophil elastase-mediated lung disease. *COPD J Chronic Obstr Pulm Dis*. 2013;10(S1):60-63.
 116. Finch S, Shoemark A, Dicker AJ, Keir HR, Smith A, Ong S, et al. Pregnancy zone protein is associated with airway infection, neutrophil extracellular trap formation, and disease severity in bronchiectasis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2019;200(8):992-1001.
 117. Faiz A, Heijink IH, Vermeulen CJ, Guryev V, van den Berge M, Nawijn MC, et al. Cigarette smoke exposure decreases CFLAR expression in the bronchial epithelium, augmenting susceptibility for lung epithelial cell death and DAMP release. *Sci Rep*. 2018;8(1).
 118. Yoshida M, Minagawa S, Araya J, Sakamoto T, Hara H, Tsubouchi K, et al. Involvement of cigarette smoke-induced epithelial cell ferroptosis in COPD pathogenesis. *Nat Commun*. 2019;10(1).
 119. Hadzic S, Wu CY, Avdeev S, Weissmann N, Schermuly RT, Kosanovic D. Lung epithelium damage in COPD – An unstoppable pathological event? *Cell Signal*. 2020;68.
 120. Oliveira-Nascimento L, Massari P, Wetzler LM. The role of TLR2 in infection and immunity. *Front Immunol*. 2012;3(APR).
 121. Kawasaki T, Kawai T. Toll-like receptor signaling pathways. *Front Immunol*. 2014;5(SEP).
 122. Vaure C, Liu Y. A comparative review of toll-like receptor 4 expression and functionality in different animal species. *Front Immunol*. 2014;5(JUL).
 123. Summers C, Rankin SM, Condliffe AM, Singh N, Peters AM, Chilvers ER. Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends Immunol*. 2010;31(8):318-324.
 124. Butler A, Walton GM, Sapey E. Neutrophilic Inflammation in the Pathogenesis of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *COPD J Chronic Obstr Pulm Dis*. 2018;15(4):392-404.
 125. Quint JK, Wedzicha JA. The neutrophil in chronic obstructive pulmonary disease. *J Allergy Clin Immunol*. 2007;119(5):1065-1071.
 126. Watt AP, Brown V, Courtney J, Kelly M, Garske L, Elborn JS, et al. Neutrophil apoptosis, proinflammatory mediators and cell counts in bronchiectasis. *Thorax*. 2004;59(3):231-236.
 127. Angrill J, Agustí C, De Celis R, Filella X, Rañó A, Elena M, et al. Bronchial inflammation and colonization in patients with clinically stable bronchiectasis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;164(9):1628-1632.
 128. RP S, SV B, B F, BS B. Do Cytokines Play a Role in Leukocyte Recruitment and Activation in the Lungs? *Am Rev Respir Dis*. 1991;143(5 Pt 1).

129. Schaaf B, Wieghorst A, Aries SP, Dalhoff K, Braun J. Neutrophil inflammation and activation in bronchiectasis: Comparison with pneumonia and idiopathic pulmonary fibrosis. *Respiration*. 2000;67(1):52-59.
130. Wang H, Anthony D, Selemidis S, Vlahos R, Bozinovski S. Resolving viral-induced secondary bacterial infection in COPD: A concise review. *Front Immunol*. 2018;9(OCT).
131. Keatings VM, Barnes PJ. Granulocyte activation markers in induced sputum: Comparison between chronic obstructive pulmonary disease, asthma, and normal subjects. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997;155(2):449-453.
132. Fischer BM, Voynow JA. Neutrophil elastase induces MUC5AC gene expression in airway epithelium via a pathway involving reactive oxygen species. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2002;26(4):447-452.
133. Tamashiro E, Xiong G, Anselmo-Lina WT, Kreindler JL, Palmer JN, Cohen NA. Cigarette smoke exposure impairs respiratory epithelial ciliogenesis. *Am J Rhinol Allergy*. 2009;23(2):117-122.
134. Tosi MF, Zakem H, Berger M. Neutrophil elastase cleaves C3bi on opsonized pseudomonas as well as CR1 on neutrophils to create a functionally important opsonin receptor mismatch. *J Clin Invest*. 1990;86(1):300-308.
135. 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 (Inmunofeón). *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;163(7):1578-1583.
136. Voglis S, Quinn K, Tullis E, Liu M, Henriques M, Zubrinich C, et al. Human neutrophil peptides and phagocytic deficiency in bronchiectatic lungs. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009;180(2):159-166.
137. Segal AW. How neutrophils kill microbes. *Annu Rev Immunol*. 2005;23(1):197-223.
138. Noguera A, Batle S, Miralles C, Iglesias J, Busquets X, MacNee W, et al. Enhanced neutrophil response in chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax*. 2001;56(6):432-437.
139. Rahman I. The role of oxidative stress in the pathogenesis of COPD: Implications for therapy. *Treat Respir Med*. 2005;4(3):175-200.
140. Brinkmann V, Zychlinsky A. Beneficial suicide: Why neutrophils die to make NETs. *Nat Rev Microbiol*. 2007;5(8):577-582.
141. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*. 2004;303(5663):1532-1535.
142. Buchanan JT, Simpson AJ, Aziz RK, Liu GY, Kristian SA, Kotb M, et al. DNase expression

- allows the pathogen group A Streptococcus to escape killing in neutrophil extracellular traps. *Curr Biol*. 2006;16(4):396-400.
143. Urban CF, Reichard U, Brinkmann V, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* and hyphal forms. *Cell Microbiol*. 2006;8(4):668-676.
 144. Grabcanovic-Musija F, Obermayer A, Stoiber W, Krautgartner WD, Steinbacher P, Winterberg N, et al. Neutrophil extracellular trap (NET) formation characterises stable and exacerbated COPD and correlates with airflow limitation. *Respir Res*. 2015;16(1).
 145. Italiani P, Boraschi D. From monocytes to M1/M2 macrophages: Phenotypical vs. functional differentiation. *Front Immunol*. 2014;5(OCT).
 146. Zimmermann HW, Trautwein C, Tacke F. Functional role of monocytes and macrophages for the inflammatory response in acute liver injury. *Front Physiol*. 2012;3 OCT.
 147. Hamilton JA. Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(7):533-544.
 148. Gasson JC. Molecular physiology of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood*. 1991;77(6):1131-1145.
 149. Taylor AE, Finney-Hayward TK, Quint JK, Thomas CMR, Tudhope SJ, Wedzicha JA, et al. Defective macrophage phagocytosis of bacteria in COPD. *Eur Respir J*. 2010;35(5):1039-1047.
 150. Lea S, Dungwa J, Ravi A, Singh D. Alveolar macrophage size is increased in COPD patients compared to controls. In: *European Respiratory Journal*. Vol 50. European Respiratory Society (ERS); 2017:PA1011.
 151. Zheng L, Shum IH, Tipoe GL, Leung R, Lam WK, Ooi GC, et al. Macrophages, neutrophils and tumour necrosis factor- α expression in bronchiectatic airways in vivo. *Respir Med*. 2001;95(10):792-798.
 152. Hoppstädter J, Diesel B, Zarbock R, Breinig T, Monz D, Koch M, et al. Differential cell reaction upon Toll-like receptor 4 and 9 activation in human alveolar and lung interstitial macrophages. *Respir Res*. 2010;11(1).
 153. Yu YRA, Hotten DF, Malakhau Y, Volker E, Ghio AJ, Noble PW, et al. Flow cytometric analysis of myeloid cells in human blood, bronchoalveolar lavage, and lung tissues. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2016;54(1):13-24.
 154. Bharat A, Bhorade SM, Morales-Nebreda L, McQuattie-Pimentel AC, Soberanes S, Ridge K, et al. Flow cytometry reveals similarities between lung macrophages in humans and mice. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2016;54(1):147-149.
 155. Lyons C, Toews G, Weissler J, Stastny P, Lipscomb M. Inability of Human Alveolar

- Macrophages to Stimulate Resting T Cells Correlates With Decreased Antigen-Specific T Cell-Macrophage Binding. *J Immunol.* 1986;137 (4):1173-1180.
156. Green GM. The J. Burns Amberson Lecture--in defense of the lung. *Am Rev Respir Dis.* 1970;102(5):691-703.
157. Blumenthal RL, Campbell DE, Hwang P, DeKruyff RH, Frankel LR, Umetsu DT. Human alveolar macrophages induce functional inactivation in antigen-specific CD4 T cells. *J Allergy Clin Immunol.* 2001;107(2):258-264.
158. Beck-Schimmer B, Schwendener R, Pasch T, Reyes L, Booy C, Schimmer RC. Alveolar macrophages regulate neutrophil recruitment in endotoxin-induced lung injury. *Respir Res.* 2005;6(1).
159. Fathi M, Johansson A, Lundborg M, Orre L, Sköld CM, Camner P. Functional and Morphological Differences between Human Alveolar and Interstitial Macrophages. *Exp Mol Pathol.* 2001;70(2):77-82.
160. Hodge S, Upham JW, Pizzutto S, Petsky HL, Yerkovich S, Baines KJ, et al. Is alveolar macrophage phagocytic dysfunction in children with protracted bacterial bronchitis a forerunner to bronchiectasis? *Chest.* 2016;149(2):508-515.
161. Hodge S, Hodge G, Scicchitano R, Reynolds PN, Holmes M. Alveolar macrophages from subjects with chronic obstructive pulmonary disease are deficient in their ability to phagocytose apoptotic airway epithelial cells. *Immunol Cell Biol.* 2003;81(4):289-296.
162. Vandivier RW, Fadok VA, Hoffmann PR, Bratton DL, Penvari C, Brown KK, et al. Elastase-mediated phosphatidylserine receptor cleavage impairs apoptotic cell clearance in cystic fibrosis and bronchiectasis. *J Clin Invest.* 2002;109(5):661-670.
163. Wood AM, Bassford C, Webster D, Newby P, Rajesh P, Stockley RA, et al. Vitamin D-binding protein contributes to COPD by activation of alveolar macrophages. *Thorax.* 2011;66(3):205-210.
164. Hodge S, Hodge G, Jersmann H, Matthews G, Ahern J, Holmes M, et al. Azithromycin improves macrophage phagocytic function and expression of mannose receptor in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008;178(2):139-148.
165. Russell REK, Thorley A, Culpitt S V., Dodd S, Donnelly LE, Demattos C, et al. Alveolar macrophage-mediated elastolysis: Roles of matrix metalloproteinases, cysteine, and serine proteases. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol.* 2002;283(4 27-4).
166. Reddy VY, Zhang QY, Weiss SJ. Pericellular mobilization of the tissue-destructive cysteine proteinases, cathepsins B, L, and S, by human monocyte-derived macrophages. *Proc Natl Acad*

- Sci U S A*. 1995;92(9):3849-3853.
167. Houghton AMG, Quintero PA, Perkins DL, Kobayashi DK, Kelley DG, Marconcini LA, et al. Elastin fragments drive disease progression in a murine model of emphysema. *J Clin Invest*. 2006;116(3):753-759.
 168. Shapiro SD. The macrophage in chronic obstructive pulmonary disease. In: *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. Vol 160. Am J Respir Crit Care Med; 1999.
 169. Kapellos TS, Bassler K, Aschenbrenner AC, Fujii W, Schultze JL. Dysregulated functions of lung macrophage populations in COPD. *J Immunol Res*. 2018;2018:2349045.
 170. Pease JE, Sabroe I. *The Role of Interleukin-8 and Its Receptors in Inflammatory Lung Disease Implications for Therapy*. Vol 1.; 2002.
 171. Mukaida N. Pathophysiological roles of interleukin-8/CXCL8 in pulmonary diseases. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol*. 2003;284(4 28-4):L566-L577.
 172. Lehnert BE. Pulmonary and thoracic macrophage subpopulations and clearance of particles from the lung. In: *Environmental Health Perspectives*. Vol 97. Environ Health Perspect; 1992:17-46.
 173. Oppenheim JJ, Zachariae COC, Mukaida N, Matsushima K. Properties of the novel proinflammatory supergene “intercrine” cytokine family. *Annu Rev Immunol*. 1991;9:617-648.
 174. Yamamoto C, Yoneda T, Yoshikawa M, Fu A, Tokuyama T, Tsukaguchi K, et al. Airway inflammation in COPD assessed by sputum levels of interleukin-8. *Chest*. 1997;112(2):505-510.
 175. Hill AT, Bayley D, Stockley RA. The interrelationship of sputum inflammatory markers in patients with chronic bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;160(3):893-898.
 176. Kramer EL, Clancy JP. TGF β as a therapeutic target in cystic fibrosis. *Expert Opin Ther Targets*. 2018;22(2):177-189.
 177. Hogg JC, Chu F, Utokaparch S, Woods R, Elliott WM, Buzatu L, et al. The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med*. 2004;350(26):2645-2653.
 178. Pohlers D, Brenmoehl J, Löffler I, Müller CK, Leipner C, Schultze-Mosgau S, et al. TGF- β and fibrosis in different organs - molecular pathway imprints. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis*. 2009;1792(8):746-756.
 179. Saharinen J, Keski-Oja J. Specific sequence motif of 8-Cys repeats of TGF- β binding proteins, LTBPs, creates a hydrophobic interaction surface for binding of small latent TGF- β . *Mol Biol Cell*. 2000;11(8):2691-2704.
 180. Davis MR, Andersson R, Severin J, de Hoon M, Bertin N, Baillie JK, et al. Transcriptional

- profiling of the human fibrillin/LTBP gene family, key regulators of mesenchymal cell functions. *Mol Genet Metab.* 2014;112(1):73-83.
181. Robertson IB, Horiguchi M, Zilberberg L, Dabovic B, Hadjiolova K, Rifkin DB. Latent TGF- β -binding proteins. *Matrix Biol.* 2015;47:44-53.
182. Hinz B. The extracellular matrix and transforming growth factor- β 1: Tale of a strained relationship. *Matrix Biol.* 2015;47:54-65.
183. Stefano A Di, Sangiorgi C, Gnemmi I, Casolari P, Brun P, Fabio ;, et al. TGF-beta; Signaling Pathways in Different Compartments of the Lower Airways of Patients With Stable COPD. *Chest.* 2018;153(4):851-862.
184. Chua F, Laurent GJ. Neutrophil elastase: Mediator of extracellular matrix destruction and accumulation. In: *Proceedings of the American Thoracic Society.* Vol 3. ; 2006:424-427.
185. Saito A, Horie M, Nagase T. TGF- β signaling in lung health and disease. *Int J Mol Sci.* 2018;19(8).
186. Beeh KM, Kornmann O, Buhl R, Culpitt S V., Giembycz MA, Barnes PJ. Neutrophil chemotactic activity of sputum from patients with COPD: Role of interleukin 8 and leukotriene B4. *Chest.* 2003;123(4):1240-1247.
187. Polverino E, Rosales-Mayor ; Edmundo, Dale GE, Dembowsky K, Torres A. The Role of Neutrophil Elastase Inhibitors in Lung Diseases. Published online 2017.
188. Bédard M, McClure CD, Schiller NL, Francoeur C, Cantin A, Denis M. Release of interleukin-8, interleukin-6, and colony-stimulating factors by upper airway epithelial cells: implications for cystic fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1993;9(4):455-462.
189. Voglis S, Quinn K, Tullis E, Liu M, Henriques M, Zubrinich C, et al. Human neutrophil peptides and phagocytic deficiency in bronchiectatic lungs. *Am J Respir Crit Care Med.* 2009;180(2):159-166.
190. Chalmers JD, Chang AB, Chotirmall SH, Dhar R, McShane PJ. Bronchiectasis. *Nat Rev Dis Prim.* 2018;4(1):45.
191. Amitani R, Wilson R, Rutman A, Read R, Ward C, Burnett D, et al. Effects of human neutrophil elastase and *Pseudomonas aeruginosa* proteinases on human respiratory epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1991;4(1):26-32.
192. Pang JA, Cheng A, Chan HS, French G. The bacteriology of bronchiectasis in Hong Kong investigated by protected catheter brush and bronchoalveolar lavage. *Am Rev Respir Dis.* 1989;139(1):14-17.
193. Greenlee KJ, Werb Z, Kheradmand F. Matrix metalloproteinases in lung: Multiple,

- multifarious, and multifaceted. *Physiol Rev.* 2007;87(1):69-98.
194. Taylor SL, Rogers GB, Chen ACH, Burr LD, McGuckin MA, Serisier DJ. Matrix metalloproteinases vary with airway microbiota composition and lung function in non-cystic fibrosis bronchiectasis. *Ann Am Thorac Soc.* 2015;12(5):701-707.
 195. Trask BC, Malone MJ, Lum EH, Welgus HG, Crouch EC, Shapiro SD. Induction of Macrophage Matrix Metalloproteinase Biosynthesis by Surfactant Protein D. *J Biol Chem.* 2001;276(41):37846-37852.
 196. Beisswenger C, Bals R. Antimicrobial peptides in lung inflammation. *Chem Immunol Allergy.* 2005;86:55-71.
 197. Hiemstra PS, Amatngalim GD, van der Does AM, Taube C. Antimicrobial Peptides and Innate Lung Defenses. *Chest.* 2016;149(2):545-551.
 198. Ganz T, Selsted ME, Szklarek D, Harwig SS, Daher K, Bainton DF, et al. Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils. *J Clin Invest.* 1985;76(4):1427-1435.
 199. McCray PB, Bentley L. Human Airway Epithelia Express a β -defensin. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1997;16(3):343-349.
 200. Singh PK, Jia HP, Wiles K, Hesselberth J, Liu L, Conway BAD, et al. Production of β -defensins by human airway epithelia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(25):14961-14966.
 201. Duits LA, Ravensbergen B, Rademaker M, Hiemstra PS, Nibbering PH. Expression of β -defensin 1 and 2 mRNA by human monocytes, macrophages and dendritic cells. *Immunology.* 2002;106(4):517-525.
 202. Bals R, Wang X, Zasloff M, Wilson JM. The peptide antibiotic LL-37/hCAP-18 is expressed in epithelia of the human lung where it has broad antimicrobial activity at the airway surface. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(16):9541-9546.
 203. Agerberth B, Charo J, Werr J, Olsson B, Idali F, Lindbom L, et al. The Human Antimicrobial and Chemotactic Peptides LL-37 and Alpha-Defensins Are Expressed by Specific Lymphocyte and Monocyte Populations. *Blood.* 2000;96 (9):3086-3093.
 204. Sørensen OE, Follin P, Johnsen AH, Calafat J, Sandra Tjabringa G, Hiemstra PS, et al. Human cathelicidin, hCAP-18, is processed to the antimicrobial peptide LL-37 by extracellular cleavage with proteinase 3. *Blood.* 2001;97(12):3951-3959.
 205. Amatngalim GD, van Wijck Y, de Mooij-Eijk Y, Verhoosel RM, Harder J, Lekkerkerker AN, et al. Basal Cells Contribute to Innate Immunity of the Airway Epithelium through Production of the Antimicrobial Protein RNase 7. *J Immunol.* 2015;194(7):3340-3350.
 206. Hiemstra PS. Epithelial antimicrobial peptides and proteins: Their role in host defence and

- inflammation. *Paediatr Respir Rev.* 2001;2(4):306-310.
207. Neumann A, Berends ETM, Nerlich A, Molhoek EM, Gallo RL, Meerloo T, et al. The antimicrobial peptide LL-37 facilitates the formation of neutrophil extracellular traps. *Biochem J.* 2014;464(1):3-11.
 208. Neumann A, Völlger L, Berends ETM, Molhoek EM, Stapels DAC, Midon M, et al. Novel Role of the Antimicrobial Peptide LL-37 in the Protection of Neutrophil Extracellular Traps against Degradation by Bacterial Nucleases. *J Innate Immun.* 2014;6(6):860-868.
 209. Yang D, Chertov O, Bykovskaia SN, Chen Q, Buffo MJ, Shogan J, et al. β -Defensins: Linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. *Science (80-).* 1999;286(5439):525-528.
 210. Van Wetering S, Mannesse-Lazeroms SPG, Van Sterkenburg MAJA, Daha MR, Dijkman JH, Hiemstra PS. Effect of defensins on interleukin-8 synthesis in airway epithelial cells. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol.* 1997;272(5 16-5).
 211. Panyutich A V., Hiemstra PS, van Wetering S, Ganz T. Human neutrophil defensin and serpins form complexes and inactivate each other. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1995;12(3):351-357.
 212. Pace E, Ferraro M, Minervini MI, Vitulo P, Pipitone L, Chiappara G, et al. Beta Defensin-2 Is Reduced in Central but Not in Distal Airways of Smoker COPD Patients. Hartl D, ed. *PLoS One.* 2012;7(3):e33601.
 213. Chen CIU, Schaller-Bals S, Paul KP, Wahn U, Bals R. β -defensins and LL-37 in bronchoalveolar lavage fluid of patients with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros.* 2004;3(1):45-50.
 214. Beisswenger C, Kandler K, Hess C, Garn H, Felgentreff K, Wegmann M, et al. Allergic Airway Inflammation Inhibits Pulmonary Antibacterial Host Defense. *J Immunol.* 2006;177(3):1833-1837.
 215. Pezzulo AA, Tang XX, Hoegger MJ, Abou Alaiwa MH, Ramachandran S, Moninger TO, et al. Reduced airway surface pH impairs bacterial killing in the porcine cystic fibrosis lung. *Nature.* 2012;487(7405):109-113.
 216. Alaiwa MHA, Reznikov LR, Gansemer ND, Sheets KA, Horswill AR, Stoltz DA, et al. pH modulates the activity and synergism of the airway surface liquid antimicrobials β -defensin-3 and LL-37. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(52):18703-18708.
 217. Taggart CC, Greene CM, Smith SG, Levine RL, McCray PB, O'Neill S, et al. Inactivation of Human β -Defensins 2 and 3 by Elastolytic Cathepsins. *J Immunol.* 2003;171(2):931-937.
 218. 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. *Am J Respir Crit Care Med.* 2012;186(11):1117-1124.
219. Bucki R, Byfield FJ, Janmey PA. Release of the antimicrobial peptide LL-37 from DNA/F-actin bundles in cystic fibrosis sputum. *Eur Respir J.* 2007;29(4):624-632.
 220. Parameswaran GI, Sethi S, Murphy TF. Effects of bacterial infection on airway antimicrobial peptides and proteins in COPD. *Chest.* Published online 2011.
 221. Anderson RL, Hiemstra PS, Ward C, Forrest IA, Murphy D, Proud D, et al. Antimicrobial peptides in lung transplant recipients with bronchiolitis obliterans syndrome. *Eur Respir J.* 2008;32(3):670-677.
 222. Rohde G, Message SD, Haas JJ, Keadze T, Parker H, Laza-Stanca V, et al. CXC chemokines and antimicrobial peptides in rhinovirus-induced experimental asthma exacerbations. *Clin Exp Allergy.* 2014;44(7):930-939.
 223. Mukae H, Ishimoto H, Yanagi S, Ishii H, Nakayama S, Ashitani J ichi, et al. Elevated BALF concentrations of α - and β -defensins in patients with pulmonary alveolar proteinosis. *Respir Med.* 2007;101(4):715-721.
 224. Amiri M, Yousefnia S, Seyed Forootan F, Peymani M, Ghaedi K, Nasr Esfahani MH. Diverse roles of fatty acid binding proteins (FABPs) in development and pathogenesis of cancers. *Gene.* 2018;676:171-183.
 225. Storch J, Thumser AEA. The fatty acid transport function of fatty acid-binding proteins. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids.* 2000;1486(1):28-44.
 226. Liang X, Gupta K, Quintero JR, Cernadas M, Kobzik L, Christou H, et al. Macrophage FABP4 is required for neutrophil recruitment and bacterial clearance in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *FASEB J.* 2018;33(3):3562-3574.
 227. Makowski L, Brittingham KC, Reynolds JM, Suttles J, Hotamisligil GS. The Fatty Acid-binding Protein, aP2, Coordinates Macrophage Cholesterol Trafficking and Inflammatory Activity. *J Biol Chem.* 2005;280(13):12888-12895.
 228. Furuhashi M. Fatty Acid-Binding Protein 4 in Cardiovascular and Metabolic Diseases. *J Atheroscler Thromb.* 2019;26(3):216-232.
 229. Gally F, Chu HW, Bowler RP. Cigarette Smoke Decreases Airway Epithelial FABP5 Expression and Promotes *Pseudomonas aeruginosa* Infection. *PLoS One.* 2013;8(1).
 230. Rao DM, Phan DT, Choo MJ, Weaver MR, Oberley-Deegan RE, Bowler RP, et al. Impact of fatty acid binding protein 5-deficiency on COPD exacerbations and cigarette smoke-induced inflammatory response to bacterial infection. *Clin Transl Med.* 2019;8(1):7.
 231. Green RM, Gally F, Keeney JG, Alper S, Gao B, Han M, et al. Impact of cigarette smoke

- exposure on innate immunity: A *Caenorhabditis elegans* model. *PLoS One*. 2009;4(8).
232. Malhotra S, Hayes D, Wozniak DJ. Cystic fibrosis and pseudomonas aeruginosa: The host-microbe interface. *Clin Microbiol Rev*. 2019;32(3).
 233. U D, JH H, C S. *Between Pathogenicity and Commensalism*. Vol 358. (Dobrindt U, Hacker JH, Svanborg C, eds.). Springer Berlin Heidelberg; 2013.
 234. Qu J, Lesse AJ, Brauer AL, Cao J, Gill SR, Murphy TF. Proteomic expression profiling of *Haemophilus influenzae* grown in pooled human sputum from adults with chronic obstructive pulmonary disease reveal antioxidant and stress responses. *BMC Microbiol*. 2010;10:162.
 235. Soong G, Parker D, Magargee M, Prince AS. The type III toxins of *Pseudomonas aeruginosa* disrupt epithelial barrier function. *J Bacteriol*. 2008;190(8):2814-2821.
 236. Finlay BB, McFadden G. Anti-immunology: Evasion of the host immune system by bacterial and viral pathogens. *Cell*. 2006;124(4):767-782.
 237. Malloy JL, Veldhuizen RAW, Thibodeaux BA, O'Callaghan RJ, Wright JR. *Pseudomonas aeruginosa* protease IV degrades surfactant proteins and inhibits surfactant host defense and biophysical functions. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol*. 2005;288(2 32-2).
 238. Kuang Z, Hao Y, Walling BE, Jeffries JL, Ohman DE, Lau GW. *Pseudomonas aeruginosa* Elastase Provides an Escape from Phagocytosis by Degrading the Pulmonary Surfactant Protein-A. Bose S, ed. *PLoS One*. 2011;6(11):e27091.
 239. Schmidtchen A, Frick IM, Andersson E, Tapper H, Björck L. Proteinases of common pathogenic bacteria degrade and inactivate the antibacterial peptide LL-37. *Mol Microbiol*. 2002;46(1):157-168.
 240. Leidal KG, Munson KL, Johnson MC, Denning GM. Metalloproteases from *Pseudomonas aeruginosa* degrade human RANTES, MCP-1, and ENA-78. *J Interf Cytokine Res*. 2003;23(6):307-318.
 241. Murphy TF, Kirkham C, Jones MM, Sethi S, Kong Y, Pettigrew MM. Expression of IgA Proteases by *Haemophilus influenzae* in the Respiratory Tract of Adults with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *J Infect Dis*. 2015;212(10):1798-1805.
 242. Webster P, Wu S, Gomez G, Apicella M, Plaut AG, St. Geme JW. Distribution of bacterial proteins in biofilms formed by non-typeable *Haemophilus influenzae*. *J Histochem Cytochem*. 2006;54(7):829-842.
 243. Gallo MC, Kirkham C, Eng S, Bebawee RS, Kong Y, Pettigrew MM, et al. Changes in IgA protease expression are conferred by changes in genomes during persistent infection by nontypeable *Haemophilus influenzae* in chronic obstructive pulmonary disease. *Infect Immun*.

- 2018;86(8).
244. Murphy TF, Kirkham C, Gallo MC, Yang Y, Wilding GE, Pettigrew MM. Immunoglobulin a protease variants facilitate intracellular survival in epithelial cells by nontypeable haemophilus influenzae that persist in the human respiratory tract in chronic obstructive pulmonary disease. *J Infect Dis.* 2017;216(10):1295-1302.
 245. Clementi CF, Håkansson AP, Murphy TF. Internalization and trafficking of nontypeable Haemophilus influenzae in human respiratory epithelial cells and roles of IgA1 proteases for optimal invasion and persistence. *Infect Immun.* 2014;82(1):433-444.
 246. Choi J, Cox AD, Li J, McCready W, Ulanova M. Activation of innate immune responses by Haemophilus influenzae lipooligosaccharide. *Clin Vaccine Immunol.* 2014;21(5):769-776.
 247. Naylor EJ, Bakstad D, Biffen M, Thong B, Calverley P, Scott S, et al. *Haemophilus influenzae* Induces Neutrophil Necrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2007;37(2):135-143.
 248. Alhede M, Bjarnsholt T, Jensen P, Phipps RK, Moser C, Christophersen L, et al. Pseudomonas aeruginosa recognizes and responds aggressively to the presence of polymorphonuclear leukocytes. *Microbiology.* 2009;155(11):3500-3508.
 249. Garai P, Berry L, Moussouni M, Bleves S, Blanc-Potard AB. Killing from the inside: Intracellular role of T3SS in the fate of pseudomonas aeruginosa within macrophages revealed by mgtC and oprF mutants. *PLoS Pathog.* 2019;15(6).
 250. Kaufhold I, Osbahr S, Shima K, Marwitz S, Rohmann K, Drömann D, et al. Nontypeable Haemophilus influenzae (NTHi) directly interfere with the regulation of E-cadherin in lung epithelial cells. *Microbes Infect.* 2017;19(11):560-566.
 251. Nomura K, Obata K, Keira T, Miyata R, Hirakawa S, Takano K ichi, et al. Pseudomonas aeruginosa elastase causes transient disruption of tight junctions and downregulation of PAR-2 in human nasal epithelial cells. *Respir Res.* 2014;15(1):21.
 252. Puig C, Domenech A, Garmendia J, Langereis JD, Mayer P, Calatayud L, et al. Increased biofilm formation by nontypeable Haemophilus influenzae isolates from patients with invasive disease or otitis media versus strains recovered from cases of respiratory infections. *Appl Environ Microbiol.* 2014;80(22):7088-7095.
 253. Nazzari E, Torretta S, Pignataro L, Marchisio P, Esposito S. Role of biofilm in children with recurrent upper respiratory tract infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2015;34(3):421-429.
 254. Faure E, Kwong K, Nguyen D. Pseudomonas aeruginosa in Chronic Lung Infections: How to Adapt Within the Host? *Front Immunol.* 2018;9:2416.
 255. Jensen ET, Kharazmi A, Garred P, Kronborg G, Fomsgaard A, Mollnes TE, et al.

- Complement activation by pseudomonas aeruginosa biofilms. *Microb Pathog.* 1993;15(5):377-388.
256. Jensen PØ, Bjarnsholt T, Phipps R, Rasmussen TB, Calum H, Christoffersen L, et al. Rapid Necrotic Killing of Polymorphonuclear Leukocytes Is Caused by Quorum-Sensing-Controlled Production of Rhamnolipid by Pseudomonas Aeruginosa. *Microbiology.* 2007;153(Pt 5).
257. Ahearn CP, Gallo MC, Murphy TF. Insights on persistent airway infection by non-typeable Haemophilus influenzae in chronic obstructive pulmonary disease. 2017;75:42.