

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PARMA

DOTTORATO DI RICERCA  
IN FISIOPATOLOGIA RESPIRATORIA SPERIMENTALE  
XXIII CICLO

TESI DI DOTTORATO

**PATOGENESI DELLA  
BRONCOPNEUMOPATIA CRONICA OSTRUTTIVA:  
IL RUOLO DI IL-32**

COORDINATORE: Ch.mo Prof. EMILIO MARANGIO

TUTOR: Ch.ma Prof.ssa MARINA SAETTA

DOTTORANDA: Dott.ssa KIM LOKAR OLIANI



## INDICE

RIASSUNTO.....	pag. 1
ABSTRACT.....	pag. 3
INTRODUZIONE.....	pag. 5
BRONCOPNEUMOPATIA CRONICA OSTRUTTIVA (BPCO):	
Definizione.....	pag. 5
Epidemiologia.....	pag. 7
Fattori di rischio.....	pag. 10
Fisiopatologia.....	pag. 15
Diagnosi.....	pag. 20
Classificazione di gravità.....	pag. 21
Anatomia Patologica.....	pag. 25
Infiammazione sistemica.....	pag. 30
Patogenesi.....	pag. 31
IL-32.....	pag. 47
SCOPO DELLA TESI.....	pag. 53
MATERIALI E METODI.....	pag. 55
RISULTATI.....	pag. 62
DISCUSSIONE.....	pag. 73
REFENZE BIBLIOGRAFICHE.....	pag. 77



# RIASSUNTO

## INTRODUZIONE

La broncopneumopatia cronica ostruttiva (BPCO) rappresenta una delle principali cause di morbilità e mortalità nel mondo. Nel 2001 l'Organizzazione Mondiale della Sanità, infatti, ha dichiarato che la BPCO era la quinta causa di morte nei paesi ad alto reddito e la sesta in quelli a medio e basso reddito e si stima che nel 2020 la BPCO diverrà la terza causa di morte in tutto il mondo.

La BPCO è definita "una malattia prevenibile e trattabile con importanti effetti extrapolmonari che, nei singoli pazienti, possono contribuire alla gravità della patologia. La sua componente polmonare è caratterizzata da una limitazione al flusso aereo non completamente reversibile, progressiva ed associata ad un'anomala risposta infiammatoria conseguente all'inalazione di particelle nocive o gas".

La BPCO è una patologia a predisposizione genetica, quindi l'esposizione a fattori di rischio estrinseci, primo tra tutti il fumo di sigaretta, non costituisce una condizione sufficiente allo sviluppo delle manifestazioni cliniche proprie della malattia, ma si deve sovrapporre ad uno stato di suscettibilità individuale.

Numerosi studi hanno dimostrato che i pazienti con BPCO sviluppano una risposta infiammatoria anomala, in quanto amplificata ed in grado di automantenersi anche una volta rimosso l'agente irritante. Nella BPCO l'infiammazione cronica interessa le vie aeree centrali e periferiche, il parenchima polmonare, i vasi polmonari e si estende anche al di fuori del tessuto polmonare, coinvolgendo i linfonodi loco-regionali e la circolazione sistemica. Il processo infiammatorio è caratterizzato dall'infiltrazione tissutale da parte di linfociti T CD8<sup>+</sup>, i quali presentano un'aumentata espressione delle citochine che caratterizzano la risposta immunitaria di tipo 1, tra cui l'IFN- $\gamma$ .

IL-32 è una citochina di recente scoperta, la cui espressione è indotta in vitro nei linfociti T, nelle cellule natural killers, nelle cellule epiteliali polmonari e nei monociti, stimolati da citochine proinfiammatorie tipiche della risposta immunitaria di tipo 1, quali IFN- $\gamma$ , IL-18, IL-1 $\beta$  e IL-12. Il gene che codifica per IL-32 è localizzato nel cromosoma 16p13.3 ed è formato da otto esoni, che mediante splicing alternativo, danno origine alle sei varianti note della citochina (IL-32 $\alpha$ , IL-32 $\beta$ , IL-32 $\delta$ , IL-32 $\gamma$ ,  $\epsilon$  e  $\zeta$ ). IL-32 può indurre l'espressione di TNF- $\alpha$  e di altre citochine attraverso l'attivazione del fattore nucleare- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) e della protein-chinasi attivata dai mitogeni p38 (MAPK-p38), dimostrando di possedere caratteristiche tipiche delle citochine proinfiammatorie. Inoltre, recenti studi in vitro ed in vivo hanno evidenziato che IL-32 potrebbe rivestire un ruolo importante nella risposta immune sia innata che acquisita. In particolare un'aumentata produzione di IL-32 è stata dimostrata nei soggetti affetti da artrite reumatoide e dal Morbo di Crohn. L'espressione di IL-32 non è mai stata indagata nella

BPCO, malattia infiammatoria cronica delle vie aeree la cui patogenesi, secondo ipotesi recenti, potrebbe contemplare una componente autoimmune. Abbiamo quindi ritenuto particolarmente interessante analizzare il ruolo di questa nuova citochina nella patogenesi BPCO.

## **OBIETTIVI**

Lo scopo di questa tesi è stato quello di quantificare l'espressione di IL-32 in pazienti affetti da BPCO a differenti stadi di gravità e di confrontarla con quella presente in soggetti fumatori con funzionalità respiratoria normale e in soggetti di controllo non fumatori. L'espressione di IL-32 è stata quindi correlata alla risposta infiammatoria cellulare e ai parametri clinico-funzionali caratteristici della malattia. Il ruolo di IL-32 e dell'attivazione linfocitaria è stato inoltre indagato in pazienti affetti da BPCO molto grave a patogenesi diversa, quantificando l'espressione di questa citochina ed il numero di follicoli linfoidi presenti nei polmoni nativi di soggetti sottoposti a trapianto polmonare per enfisema in stadio avanzato con e senza deficit di alfa1-antitripsina (AAT). Inoltre, al fine di studiare l'espressione polmonare di IL-32 tramite manovre non invasive, abbiamo analizzato l'espressione di questa citochina nelle cellule dell'espettorato indotto di pazienti affetti da BPCO e l'abbiamo confrontata con quella presente in soggetti fumatori e non fumatori sani.

## **METODI**

L'espressione di IL-32 è stata quantificata in campioni chirurgici polmonari prelevati da 40 soggetti con BPCO (VEMS  $38 \pm 4\%$  del teorico), 11 fumatori asintomatici con funzionalità polmonare nella norma (VEMS  $101 \pm 3\%$  del teorico) e 9 controlli non fumatori (VEMS  $107 \pm 6\%$  del teorico). Su questi campioni di tessuto è stata eseguita l'analisi morfometrica al fine di quantificare la produzione di IL-32 e di TNF- $\alpha$  nei macrofagi alveolari, nelle pareti alveolari, nei bronchioli e nelle arteriole. L'espressione di IL-32 è stata inoltre correlata al livello di fosforilazione di p38 MAPK, al numero di neutrofili e di linfociti T CD8<sup>+</sup> infiltranti le pareti alveolari e al grado di ostruzione delle vie aeree.

L'espressione di IL-32 è stata poi valutata in campioni chirurgici polmonari ottenuti da 10 soggetti affetti da BPCO molto grave (GOLD IV) con deficit di AAT (VEMS  $19 \pm 2\%$  del teorico), 12 soggetti con BPCO molto grave (GOLD IV) e normali livelli di AAT (VEMS  $18 \pm 2\%$  del teorico), 11 fumatori di controllo (VEMS  $102 \pm 3\%$  del teorico) e 9 non fumatori di controllo, asintomatici e con funzionalità respiratoria nella norma (VEMS  $108 \pm 6\%$  del teorico). IL-32 è stata quantificata a livello dei macrofagi alveolari, delle cellule dei setti alveolari e dei follicoli linfoidi del parenchima polmonare.

Inoltre abbiamo quantificato il numero e la distribuzione dei follicoli linfoidi nei polmoni nativi di 9 soggetti affetti da BPCO molto grave (GOLD IV) con deficit di AAT (VEMS  $19 \pm 2\%$  del teorico) e 27 soggetti con BPCO molto grave e livelli normali di AAT (VEMS  $20 \pm 2\%$  del teorico),

sottoposti a trapiantato polmonare per enfisema in stadio avanzato. Infine, per studiare l'espressione di IL-32 a livello polmonare tramite metodiche non invasive, abbiamo quantificando l'espressione di questa citochina nelle cellule dell'espettorato indotto di 19 pazienti affetti da BPCO e l'abbiamo confrontata con quella presente in 17 soggetti fumatori e 12 non fumatori con funzionalità polmonare nella norma.

## **RISULTATI**

Nei macrofagi alveolari, nelle pareti alveolari e nell'epitelio bronchiolare l'espressione di IL-32 era aumentata in modo significativo nei fumatori con BPCO rispetto ai soggetti di controllo fumatori e non fumatori ( $p=0.0014$  e  $p<0.0001$ ). L'espressione di TNF- $\alpha$  era significativamente aumentata nei soggetti affetti da BPCO rispetto ai controlli non fumatori sia nei macrofagi alveolari ( $p<0.0001$ ) che nelle pareti alveolari ( $p<0.018$ ). Inoltre l'espressione di IL-32 correlava positivamente con l'espressione di TNF- $\alpha$  ( $p<0.0001$ ,  $r=0.7$ ), con il numero di cellule CD8<sup>+</sup> ( $p=0.006$ ,  $r=0.46$ ) e con il livello di fosforilazione della p38 MAPK ( $p=0.005$ ,  $r=0.51$ ), e negativamente con i valori di VEMS ( $p<0.0001$ ,  $r=-0.53$ ).

Per quanto riguarda la quantificazione di IL-32 in soggetti affetti da BPCO molto grave, nessuna differenza significativa è stata evidenziata nell'espressione di questa citochina tra i soggetti con deficit di AAT e quelli con livelli normali di questa antiproteasi. In particolare l'espressione di IL-32 nei macrofagi alveolari e nelle pareti alveolari era significativamente aumentata nei soggetti con BPCO sia con deficit di AAT che in quelli con livelli normali di AAT, rispetto ai fumatori con funzionalità polmonare nella norma e ai controlli non fumatori ( $p<0.005$  per ogni confronto). Nei follicoli linfoidi l'espressione di IL-32 era significativamente aumentata nei soggetti con BPCO e livelli normali di AAT rispetto ai fumatori e ai non fumatori di controllo ( $p<0.05$  per ogni confronto). Un trend simile è stato osservato per i pazienti con deficit di AAT ( $p<0.06$  per ogni confronto).

La quantificazione dei follicoli linfoidi parenchimali nei soggetti affetti da BPCO molto grave ha dimostrato che il numero totale di follicoli era aumentato nei soggetti con deficit di AAT, rispetto ai soggetti con livelli di AAT nella norma ( $p=0.0002$ ).

Infine l'espressione di IL-32 è stata osservata a livello delle cellule macrofagiche dell'espettorato indotto, soprattutto a livello citoplasmatico. Tale espressione è risultata elevata sia nei soggetti affetti da BPCO che nei soggetti fumatori e non fumatori sani, senza differenze significative tra i tre gruppi di soggetti esaminati.

## **CONCLUSIONI**

In conclusione, il nostro lavoro ha dimostrato un importante aumento dell'espressione di IL-32 nel polmone periferico dei pazienti affetti da BPCO rispetto ai soggetti di controllo fumatori e non fumatori. Inoltre l'espressione di IL-32 è risultata aumentata sia nei pazienti affetti da BPCO molto grave con livelli di AAT nella norma che in quelli con deficit di AAT. Questi risultati

suggeriscono che IL-32 possa avere un ruolo importante nella persistenza della risposta infiammatoria, contribuendo alle alterazioni anatomopatologiche tipiche della BPCO. Nei pazienti con deficit di AAT i meccanismi patogenetici sembrano inoltre coinvolgere un'importante risposta immunitaria, in cui l'espressione di IL-32 e l'attivazione linfocitaria potrebbero contribuire alla perpetuazione del danno polmonare.

I nostri dati suggeriscono infine che l'analisi dell'espettorato indotto, quale metodica non invasiva, potrebbe non riflettere accuratamente i meccanismi patogenetici presenti nel polmone profondo. Le cellule a livello delle vie aeree centrali infatti potrebbero essere soggette ad una stimolazione infiammatoria diversa rispetto alle cellule del parenchima polmonare.



## ABSTRACT

### BACKGROUND

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is a leading cause of morbidity and mortality in countries of high, middle, and low income. Estimates from WHO's Global Burden of Disease show that in 2001, COPD was the fifth leading cause of death in high-income countries and the sixth in nations of low and middle income.

The working definition of COPD is "a preventable and treatable disease with some significant extrapulmonary effects that may contribute to the severity in individual patients. Its pulmonary component is characterized by airflow limitation that is not fully reversible. The airflow limitation is usually progressive and associated with an abnormal inflammatory response of the lungs to noxious particles or gases". COPD is a classic gene-by-environment disease with various manifestations that reflect both the individual susceptibility and the degree of exposure to irritants, of which cigarette smoking is the most frequent. A number of studies in the past have demonstrated that, in patients with COPD, a chronic inflammation is present throughout the airways, lung parenchyma and pulmonary vasculature and extends even outside the lung, involving lymph nodal stations and the systemic circulation. This inflammatory response is characterized by tissue infiltration of CD 8+ T lymphocytes, which are shifted toward a type 1 profile with production of IFN- $\gamma$  among other cytokines.

Interleukin (IL)-32 is a recently described cytokine produced by T lymphocytes, natural killer (NK) cells, monocytes and epithelial cell lines. Of particular importance, IL-32 is prominently induced by interferon (IFN)- $\gamma$  in lung epithelial cells and monocytes in vitro. The gene encoding IL-32, which is organized into eight exons, is located on human chromosome 16p13.3 and may be transcribed in six splice variants (IL-32 $\alpha$ , IL-32 $\beta$ , IL-32 $\delta$ , IL-32 $\gamma$ ,  $\epsilon$  and  $\zeta$ ). IL-32 exhibits several properties typical of proinflammatory cytokines. For example, it has been described as an inducer of TNF- $\alpha$  and many other cytokines through the activation of nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) and p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK). IL-32 has recently emerged as an important player in innate and adaptive immune responses in vitro. In humans, there are only two in vivo studies which have demonstrated upregulation of IL-32, one in rheumatoid arthritis and the other in Crohn's disease. Whether IL-32 is also implicated in the pathogenesis of COPD still remains to be investigated.

### AIM

The aim of this study was to quantify the expression of IL-32 in the lung tissue of COPD patients at different stages of severity. Moreover, we compared it with the production of IL-32 in smokers with normal lung function and in non-smoking controls. Indeed, the expression of IL-32 was correlated with the cellular inflammatory infiltration and with the spirometrical parameters that characterize the disease. The role of IL-32 and lymphocyte activation was

also investigated in very severe COPD patients with different pathogenesis. We quantified the expression of IL-32 and the lymphoid follicle number in the native lung parenchyma of COPD subjects undergoing lung transplantation for end-stage emphysema with and without alpha1-antitrypsin (AAT) deficiency. Moreover to study the expression of IL-32 in the lung using non invasive tools, we analyzed the expression of this cytokine in the induced sputum of COPD patients and we compared these results with those obtained from control smokers and non-smokers.

## **METHODS**

The expression of IL-32 was quantified in surgically resected specimens from 40 smokers with COPD (FEV1  $38\pm 4\%$  pred), 11 asymptomatic smokers with normal lung function (FEV1  $101\pm 3\%$  pred) and 9 non-smoking controls (FEV1  $107\pm 6\%$  pred). In fact, in these lung specimens we performed morphometric analysis to quantify IL-32 and TNF- $\alpha$  in alveolar macrophages, alveolar walls, bronchioles and arterioles. Moreover, the expression of IL-32 was correlated with phosphorylation of p38 MAPK, with the number of neutrophils and CD8<sup>+</sup> T cells infiltrating the alveolar walls, and with the degree of airway obstruction.

The expression of IL-32 was also analyzed in surgical lung samples from 10 very severe COPD (GOLD IV) with AAT deficiency (FEV1  $19\pm 2\%$  pred), 12 very severe COPD (GOLD IV) with normal levels of AAT (FEV1  $18\pm 2\%$  pred), 11 asymptomatic smokers with normal lung function (FEV1  $102\pm 3\%$  pred) and 9 non-smoking controls (FEV1  $108\pm 6\%$  pred). We quantified IL-32 expression in alveolar macrophages, alveolar walls and parenchymal lymphoid follicles. Moreover, we numbered and characterized the distribution of lymphoid follicles in the native lungs of 9 very severe COPD (GOLD IV) with AAT deficiency (FEV1  $19\pm 2\%$  pred) and 27 very severe COPD (GOLD IV) with normal levels of AAT (FEV1  $20\pm 2\%$  pred) undergoing lung transplantation for end-stage emphysema.

Finally to study IL-32 expression in the lung using non invasive methods, we analyzed the expression of this cytokine in the sputum cells of 19 COPD patients and we compared these results with those obtained from 17 control smokers and 12 control non-smokers.

## **RESULTS**

IL-32<sup>+</sup> macrophages were increased in smokers with COPD compared to control smokers and non-smokers ( $p=0.0014$  and  $p<0.0001$ ). A similar pattern was observed even in alveolar walls and bronchiolar epithelium. TNF- $\alpha$  expression was increased in smokers with COPD as compared to non-smokers both in alveolar macrophages ( $p<0.0001$ ) and alveolar walls ( $p=0.018$ ). Moreover, IL-32 expression was positively correlated with TNF- $\alpha$  ( $p<0.0001$ ,  $r=0.7$ ), CD8<sup>+</sup> cells ( $p=0.006$ ,  $r=0.46$ ) and phospho p38 MAPK ( $p=0.005$ ,  $r=0.51$ ), and negatively with FEV1 values ( $p<0.0001$ ,  $r=-0.53$ ).

IL-32 expression was similar in very severe COPD patients with and without AAT deficiency. In particular IL-32<sup>+</sup> macrophages and IL-32<sup>+</sup> alveolar wall cells were increased in these two COPD patient groups compared to smokers and non-smokers with normal lung function ( $p < 0.005$  for all). IL-32 expression was increased in lymphoid follicles with COPD and normal levels of AAT compared to smoker and non-smokers controls ( $p < 0.05$  for all). A similar trend was observed for COPD patients with AAT deficiency ( $p < 0.06$  for all).

The quantification of lymphoid follicles showed that these were a frequent occurrence in subjects with severe emphysema both with and without AAT deficiency. In particular the total number of lymphoid follicles was increased in patients with AAT deficiency as compared to subjects with normal levels of AAT and this was mainly due to a higher number of parenchymal lymphoid follicles ( $p = 0.0002$ ).

Finally, IL-32 expression was observed in the macrophages of induced sputum, particularly in the cytoplasm. This expression was high not only in COPD subjects but also in smoker and non-smoker controls.

## **CONCLUSIONS**

This study demonstrates, for the first time, upregulation of IL-32 in the peripheral lung of COPD patients that was correlated with the production of TNF- $\alpha$  and with the degree of airway obstruction. IL-32 expression was also increased in peripheral lung of very severe COPD either with AAT deficiency or without AAT deficiency. From these results we can gather that IL-32 may play a role in the persistence of the immune response leading to tissue damage in COPD. Moreover, in AAT deficient patients as well the pathogenetic mechanisms seem to involve an important immune response characterized by IL-32 expression and lymphoid activation leading to perpetuated lung damage.

Finally, we conclude that induced sputum analysis may not accurately reflect the pathogenetic mechanisms of peripheral lung. In fact, cells in the central airways could be stimulated by an inflammatory process different from that present in the lung parenchyma.



## INTRODUZIONE

### LA BRONCOPNEUMOPATIA CRONICA OSTRUTTIVA (BPCO)

#### DEFINIZIONE

*La Broncopneumopatia Cronica Ostruttiva è una malattia prevenibile e trattabile con significativi effetti extrapolmonari che possono contribuire alla gravità della malattia nei singoli pazienti. La sua componente polmonare è caratterizzata da una limitazione al flusso aereo che non è completamente reversibile. La limitazione al flusso è generalmente progressiva e associata ad una risposta infiammatoria polmonare anomala a particelle nocive o gas [1].*

Il fumo di sigaretta è ritenuto a livello mondiale il principale fattore di rischio per lo sviluppo di BPCO, anche se nei Paesi in via di sviluppo l'inquinamento derivante dalla combustione del legno e di altre biomasse rappresenta un importante fattore predisponente allo sviluppo di tale patologia. L'esposizione al fumo di sigaretta determina il reclutamento di cellule infiammatorie, in particolar modo macrofagi e neutrofili, e le induce a secernere sostanze in grado di attivare i linfociti T perpetuando l'infiammazione. L'infiammazione cronica comporta il rimodellamento e il restringimento delle piccole vie aeree (bronchiolite) e causa la distruzione del parenchima e la perdita degli attacchi alveolari che sono responsabili della riduzione del ritorno elastico polmonare (enfisema).

Rispetto al passato l'attuale definizione di BPCO non comprende più l'enfisema e la bronchite cronica come entità cliniche distinte, poiché questi non rappresentano due fenotipi che si escludono mutualmente, anzi molto spesso le due condizioni coesistono e si sovrappongono [2]. L'enfisema viene diagnosticato su base anatomo-patologica, mentre la bronchite cronica è definita sulla base di criteri clinici. Infatti, il termine enfisema polmonare definisce una condizione che si presenta con abnorme e permanente dilatazione degli spazi aerei distali al bronchiolo terminale, distruzione delle loro pareti ed assenza di evidenti segni di fibrosi [2]. La bronchite cronica viene definita invece clinicamente, sulla base della presenza di tosse ed espettorazione per almeno tre mesi l'anno, per due anni consecutivi [2]. La definizione di BPCO, assunta a livello internazionale, mette in risalto la presenza di un'ostruzione *non completamente reversibile* come caratteristica fondamentale di tale patologia e che consente di porre diagnosi differenziale con l'asma bronchiale che, invece, si caratterizza per la presenza di un'ostruzione reversibile. Tuttavia i confini tra asma bronchiale e BPCO sono alquanto sfumati, infatti l'asma costituisce un fattore di rischio per lo

sviluppo di un'ostruzione persistente al flusso aereo, ed è altrettanto possibile che le due patologie coesistano indipendenti nello stesso paziente [1].

La recente definizione, inoltre, non considera più la BPCO una semplice malattia respiratoria, ma una malattia sistemica con *significativi effetti extrapolmonari* che possono influenzare lo stato di salute e qualità di vita del paziente [1]. La BPCO si associa, infatti, ad altre malattie croniche definite comorbidità che hanno un significativo effetto sulla prognosi. Le principali comorbidità si riscontrano a livello del sistema cardiovascolare: insufficienza cardiaca cronica, coronaropatie, infarto del miocardio, aritmie, vasculopatie periferiche ed embolia polmonare [1,3,4]. Le altre comorbidità riguardano le alterazioni del metabolismo osseo (osteopenia, osteoporosi), ematologiche (anemia normocitica, normocromica), muscolari (perdita della massa muscolare), alterazioni nutrizionali e cachessia (aumento del dispendio energetico e del catabolismo), infiammazione sistemica (aumento di PCR, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , cellule infiammatorie e circolanti, stress ossidativo sistemico), depressione. Esiste, inoltre, una associazione con il carcinoma polmonare, il cui significato non è totalmente chiaro [1,4]; infatti è possibile che tale associazione sia dovuta a fattori di rischio comuni tra BPCO e carcinoma polmonare, alla presenza di una predisposizione genetica o ad un'alterata clearance dei carcinogeni, che favorirebbero l'insorgenza di entrambe queste due malattie.

## **EPIDEMIOLOGIA**

La BPCO è una delle principali cause di morbidità e mortalità nel mondo ed è correlata ad un costo economico e sociale in costante aumento. La prevalenza, la morbidità e la mortalità sono maggiori nei Paesi industrializzati a causa dell'abitudine tabagica e dell'invecchiamento della popolazione, tuttavia sono elevate anche nei Paesi in via di sviluppo per l'esposizione all'inquinamento di combustibili del legno ed altre biomasse [1].

## **PREVALENZA**

La BPCO colpisce tutte le popolazioni, ma la sua prevalenza è maggiore nei paesi industrializzati e aumenta con la senescenza, anche se può colpire l'età giovanile. Studi epidemiologici hanno dimostrato che il 10% dei soggetti tra i 20 e i 44 anni presenta tosse ed espettorato senza segni di ostruzione bronchiale e che il 3,6% presenta sintomi con ostruzione bronchiale (stadio GOLD I-III). La BPCO interessa entrambi i sessi, con una predilezione per il sesso maschile. In realtà negli ultimi anni si è registrato un netto incremento del tasso di prevalenza nel sesso femminile dovuto alla diffusione dell'abitudine tabagica [1,5,6]. La prevalenza complessiva, che in Europa è del 4-6%, è caratterizzata da un continuo incremento rispetto ai dati degli anni '80.

## MORBILITÀ

Nel 1990 la BPCO era la 12° causa al mondo di "perdita di anni di vita in buone condizioni di salute" (DALYs, Disability Adjusted Life Years), responsabile del 2,1 % del totale. Secondo le previsioni nel 2020 occuperà il 5° posto dopo la cardiopatia ischemica, la depressione grave, gli incidenti stradali e le vasculopatie cerebrali. Questo sostanziale aumento, riflette in gran parte, l'aumentato uso di tabacco in molti Paesi e l'aumento dell'aspettativa di vita nelle popolazioni dei Paesi in via di sviluppo [1]. In Italia la BPCO risulta al settimo posto nella classifica delle malattie che più frequentemente richiedono l'ospedalizzazione; secondo una recente statistica, condotta dal Ministero della Salute, dal 2000 al 2003 si sarebbe verificato un incremento dei ricoveri annuali in regime ordinario per riacutizzazione di BPCO. Nella stima di morbilità per BPCO sarebbe corretto considerare solo il ricorso all'atto medico, direttamente correlato alle conseguenze della malattia, ma non è sempre facile distinguere le cause che hanno portato il paziente a richiedere una prestazione medica. Si spiega quindi perché la morbilità per BPCO sia influenzata da altre comorbilità che possono avere un impatto sullo stato di benessere generale del paziente o che possono interferire con il trattamento della malattia. Viceversa l'impatto della BPCO viene sottostimato se la morbilità per questa malattia è attribuita ad un'altra malattia coesistente. In ogni caso i dati a disposizione dimostrano che la morbilità è superiore nel sesso maschile e che aumenta con l'età.

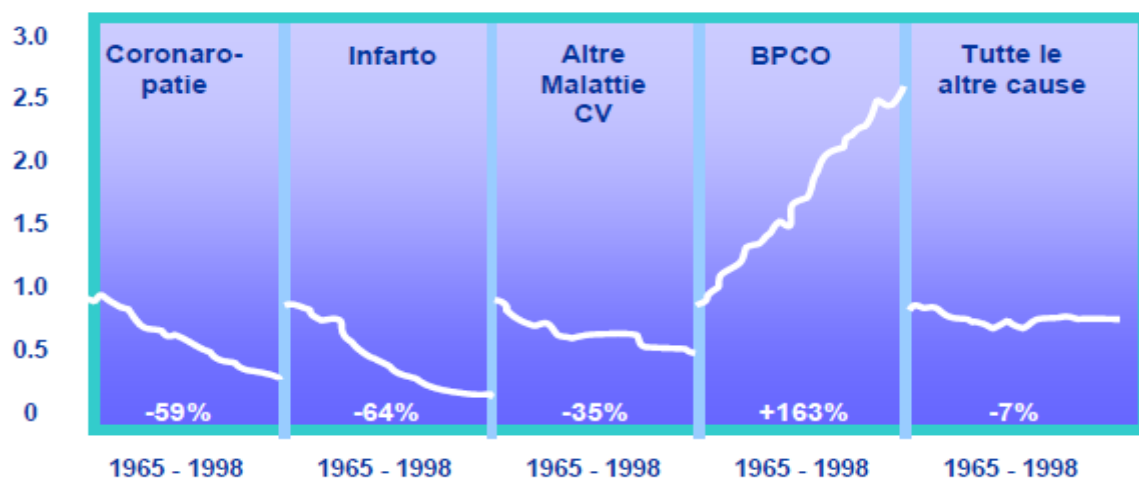
## MORTALITÀ

La BPCO è una delle più importanti cause di morte; a livello mondiale si stima, infatti, che rappresenti la quinta causa di morte e negli Stati Uniti la quarta causa di morte dopo le malattie cardiovascolari, le neoplasie e le malattie cerebrovascolari. Secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità, la BPCO ha provocato 2,8 milioni di decessi nel 2000 e ha previsto che nel 2020 diventerà la terza causa di morte [7]. Le più recenti linee guida dimostrano che dal 1965 al 1998 si è verificato un costante incremento della mortalità per BPCO al contrario di quanto osservato per altre patologie croniche, in particolare le coronaropatie, l'infarto e le malattie cerebrovascolari (**Figura 1**). Per quanto riguarda l'Italia, le malattie dell'apparato respiratorio rappresentano la terza causa di morte, e il 50% è attribuibile alla BPCO.

Le fasce di età più colpite sono quelle più avanzate, dove la malattia si presenta più facilmente negli stadi grave e molto grave, e dove sono spesso presenti comorbilità che influenzano negativamente il decorso della malattia e inficiano la qualità di vita del paziente. Attualmente la distribuzione della mortalità nella popolazione dimostra una predilezione per l'età anziana e per il sesso maschile (dove la mortalità è 2-3 volte maggiore rispetto al sesso femminile), ma non si esclude che nei prossimi anni la mortalità per BPCO nel

semplice eguaglianza, o addirittura supererà, quella del sesso maschile, ricalcando l'andamento della prevalenza della BPCO.

Tra i fattori correlati con l'aumento del rischio di mortalità spicca il ruolo della riduzione della funzionalità respiratoria, non soltanto per la mortalità attribuibile alla BPCO, ma anche per altre cause [8]. In particolare si ricorda che una riduzione del 10% del valore del VEMS teorico (Volume Espiratorio Massimo nel primo Secondo) aumenta del 14% il rischio di mortalità per tutte le cause e del 28% per malattie cardiovascolari; inoltre aumenta l'incidenza di eventi coronarici non fatali del 20% [9].



**Figura 1.** Variazione percentuale della mortalità, aggiustata per l'età, in USA 1965-1998. Tratta da: Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) 2008. <http://www.goldcopd.org>.

## IMPATTO ECONOMICO E SOCIALE

La BPCO rappresenta un'importante fonte di spesa sanitaria, che risulta tanto maggiore quanto più grave è la malattia; inoltre, nei Paesi Sviluppati, le riacutizzazioni sono responsabili dell'onere maggiore per il servizio sanitario [1].

La BPCO è una patologia che richiede frequenti visite mediche, ospedalizzazioni, accessi al pronto soccorso, il ricorso alla ventilazione meccanica ed interventi chirurgici; questi costi diretti richiedono, a livello Europeo, una spesa pari al 6% dell'ammontare dell'intero budget sanitario [1].

I costi per BPCO sono elevati ed aumenteranno proporzionalmente all'invecchiamento della popolazione, all'incremento della prevalenza della malattia e al costo degli interventi medici e di salute pubblica già esistenti [1].

La dimensione globale della BPCO crescerà enormemente quando si manifesteranno le conseguenze del diffondersi dell'abitudine tabagica nei Paesi in via di sviluppo.



## FATTORI DI RISCHIO

La prima fase dello sviluppo delle strategie di prevenzione e trattamento della BPCO si basa sull'identificazione dei fattori di rischio; ad esempio, l'identificazione del fumo di sigaretta come il più importante fattore di rischio, ha contribuito alla realizzazione di programmi di disassuefazione dal fumo come elemento chiave nella prevenzione dello sviluppo della BPCO.

La BPCO è una malattia a patogenesi multifattoriale, nella quale giocano un ruolo determinante, sia fattori individuali (in genere non modificabili), sia l'esposizione a fattori ambientali. Possiamo pertanto dire che esiste una componente intrinseca di malattia, determinata dalla predisposizione individuale del soggetto, e una componente estrinseca, che invece dipende dall'ambiente in cui il soggetto è inserito e dal suo stile di vita (**Tabella 1**). Spesso nello stesso soggetto è possibile individuare la compresenza di più fattori di rischio per lo sviluppo di BPCO, che, quindi, potranno avere un effetto sinergico, potenziandosi l'un l'altro. Talvolta, invece, la malattia può insorgere in soggetti apparentemente non a rischio.

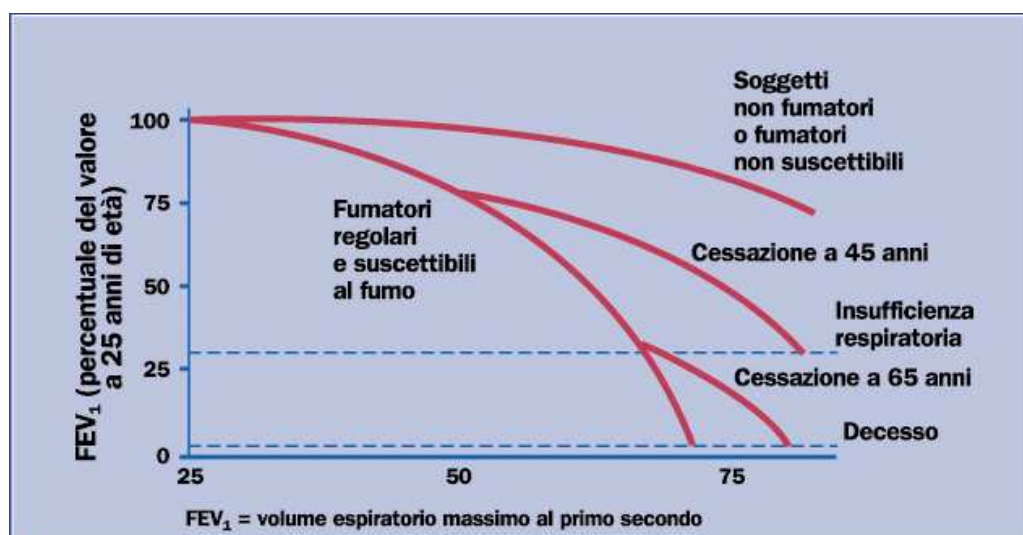
Ambientali	Individuali
⌘ Fumo di sigaretta	⌘ Deficit di $\alpha$ 1-antitripsina
⌘ Inquinamento outdoor e indoor	⌘ Altri fattori genetici
⌘ Esposizione professionale (polveri organiche e inorganiche)	⌘ Età
⌘ Stato socio-economico	⌘ Comorbilità
⌘ Nutrizione	⌘ Peso alla nascita
⌘ Infezioni	⌘ Accrescimento polmonare

**Tabella 1.** Fattori di rischio per lo sviluppo della BPCO.

## FATTORI AMBIENTALI

- **Fumo di sigaretta (attivo/passivo/materno).** E' il principale fattore di rischio per la BPCO, infatti è responsabile del 90% di tutti i casi di BPCO. Si stima inoltre che il 30% dei fumatori oltre i 40 anni presenti una limitazione al flusso aereo. Nonostante ciò il fumo non costituisce un fattore sufficiente per lo sviluppo di malattia come confermato dal fatto

che solo il 15-20% dei forti fumatori sviluppa BPCO [1]. I costituenti del fumo più lesivi sono i radicali liberi e l'ossido di azoto che danneggiano il tessuto polmonare mediante diversi meccanismi: aumentano la liberazione di enzimi proteolitici da parte dei macrofagi e dei neutrofili, interagiscono direttamente con i costituenti cellulari (causando, ad esempio, perossidazione dei lipidi di membrana ed il clivaggio delle proteine) e interferiscono con le difese antiproteolitiche del polmone [10]. Parallelamente si assiste, da un punto di vista istologico, alla comparsa di infiltrati infiammatori e di fenomeni di riparazione tessutale del polmone. Questi processi conducono da un lato all'ispessimento delle pareti bronchiali, con riduzione del calibro delle vie aeree, dall'altro alla distruzione dei setti alveolari. Clinicamente i fumatori hanno la più alta prevalenza di sintomi respiratori e un aumentato tasso di declino annuo del VEMS. Fletcher e Peto, in uno studio prospettico di otto anni su lavoratori londinesi hanno dimostrato che il declino medio del VEMS nei fumatori (60 ml/anno) è più rapido rispetto ai non fumatori (30 ml/anno) e che i fumatori affetti da BPCO hanno un declino medio del VEMS addirittura superiore ai 60 ml all'anno [11]. È stato dimostrato che il danno da fumo di sigaretta sull'apparato respiratorio è cumulativo, cioè dipende dalla quantità e dalla durata dell'esposizione, ovvero dal numero di sigarette fumate ogni giorno [12] e dal numero di anni passati a fumare. L'unico intervento utile per rallentare il processo patologico indotto dal fumo è smettere di fumare [11,13,14,15]. Chi smette di fumare in età adulta, tra i 35 e i 45 anni, presenta una curva di riduzione del VEMS che si pone a metà strada fra quella dei non fumatori e quella dei fumatori persistenti. Inoltre anche smettendo di fumare in età avanzata, ad esempio a 65 anni, la riduzione del VEMS è sempre minore di quella dei fumatori persistenti (**Figura 2**).



**Figura 2.** Declino annuo del VEMS nella popolazione generale in relazione all'esposizione al fumo di sigaretta. (Adattata, da Fletcher and Peto, Br Med J 1977; 1: 1645-48).

- **Inquinamento outdoor/indoor.** L'inquinamento outdoor, ovvero l'inquinamento atmosferico, agisce come cofattore, contribuendo ad aumentare la quantità totale di particelle inalate. Numerosi studi evidenziano l'esistenza di un'associazione fra l'esposizione a lungo termine all'inquinamento da traffico veicolare, il declino della funzionalità polmonare e la presenza di BPCO [16]. Inoltre indagini epidemiologiche indicano che l'esposizione all'inquinamento atmosferico può causare anche effetti acuti, quali l'incremento dei ricoveri ospedalieri e l'aumento del numero giornaliero di decessi [17]. L'inquinamento indoor deriva dalla combustione di biomasse usate per la cottura dei cibi e il riscaldamento in ambienti scarsamente ventilati [18-24] Questo tipo di inquinamento è un importante fattore di rischio nei Paesi in via di sviluppo, soprattutto nel sesso femminile.
- **Esposizione professionale.** L'esposizione professionale a polveri e ad agenti chimici può essere responsabile dei sintomi e delle alterazioni funzionali caratteristici della BPCO [17]. Le sostanze maggiormente coinvolte sono la polvere del grano, le fibre tessili, il cadmio, il carbone, i metalli pesanti e le esalazioni da saldature e sostanze adesive. Circa il 15-19% delle BPCO che insorgono nei fumatori può essere riconducibile ad esposizioni professionali e questa percentuale sale al 30% nei soggetti non fumatori che sviluppano la malattia [25]. Un recente studio epidemiologico ha dimostrato che l'esposizione a polveri predispone ad un accelerato declino della funzione polmonare che si associa allo sviluppo di sintomi respiratori. La riduzione del flusso aereo comporta un aumento della mortalità per patologie cardiovascolari e respiratorie non neoplastiche [26].
- **Stato socio-economico.** Un basso stato socioeconomico è direttamente correlato con lo sviluppo della BPCO; i motivi non sono totalmente chiariti, anche se, è possibile una correlazione con l'inquinamento outdoor/indoor e con lo sviluppo polmonare fetale [27].
- **Nutrizione.** La malnutrizione e la perdita di peso sono responsabili della riduzione della massa muscolare con conseguenti ripercussioni sulla forza e sulla resistenza dei muscoli respiratori.
- **Infezioni.** Le infezioni, virali e batteriche, oltre ad essere le principali cause di riacutizzazione della malattia, sono anche importanti fattori di rischio per lo sviluppo e la progressione della BPCO. Studi effettuati su bambini, con iperreattività bronchiale scatenata da infezioni gravi, dimostrano un'associazione con la limitazione al flusso aereo nell'adulto [27,28].

## FATTORI INDIVIDUALI

- **Deficit di  $\alpha$ 1-antitripsina (AAT).** La carenza di AAT è la principale anomalia genetica che sia stata specificatamente correlata con la BPCO soprattutto di insorgenza in giovane età. L'AAT è un inibitore delle proteasi seriche, la cui sintesi avviene a livello epatico e, in

misura minore, nei neutrofili e nei monoliti. L'AAT viene secreta nel torrente circolatorio dove contrasta l'azione dell'elastasi dei neutrofili. Esistono 75 alleli noti di AAT ereditati con modalità autosomica codominante, che sono generalmente classificati come normali (MM), deficitari, nulli o alterati. L'allele deficitario più comune, denominato ZZ (o fenotipo PiZZ) origina da una singola sostituzione amminoacidica (342 Glu→Lys) che determina una polimerizzazione spontanea del polipeptide, impedendone il suo rilascio dal fegato nel torrente circolatorio. Il materiale ritenuto a livello epatico provoca cirrosi epatica, mentre la riduzione dei livelli circolanti porta a carenza antiproteasica e a conseguente sviluppo precoce di enfisema polmonare, anche nei non fumatori [29].

- **Altri fattori genetici.** Lo sviluppo della BPCO è correlata ad altri fattori ereditari, quali i polimorfismi dell'  $\alpha$ 1- antichimotripsina (un'altra proteina inibitrice delle proteasi), il deficit dell'epossido idrolasi microsomiale e del glutatione-S-transferasi, proteine che riducono l'azione ossidante del fumo di tabacco e dell'eme-ossigenasi-1 [30,31]. L'associazione tra lo sviluppo di BPCO e il gruppo sanguigno (sistema AB0, secretore ABH, di Lewis), la proteina di legame con la vitamina D, l'antigene di istocompatibilità HLA e il TNF- $\alpha$  sono ancora oggetto di studio [32,33].
- **Età/Sesso.** La broncoostruzione cronica si manifesta prevalentemente nei soggetti sopra i 65 anni come conseguenza di una maggiore esposizione ai fattori di rischio. Studi epidemiologici del passato dimostrano una netta prevalenza nel sesso maschile (soprattutto nei Paesi industrializzati); tuttavia, i cambiamenti dell'abitudine al fumo di tabacco hanno portato ad una riduzione del divario della prevalenza nei due sessi. Sembra, inoltre, che il sesso femminile presenti una maggior suscettibilità al fumo di sigaretta e che pertanto abbia, a parità di storia cumulativa di fumo, una predisposizione maggiore allo sviluppo di BPCO, rispetto al sesso maschile [5,6].
- **Sviluppo polmonare.** Qualsiasi fattore che condiziona lo sviluppo polmonare durante la gestazione e l'infanzia predispone allo sviluppo di BPCO nella vita adulta, infatti è stata dimostrata una correlazione fra basso peso alla nascita e VEMS nell'adulto. Una possibile spiegazione deriva dall'associazione fra immaturità polmonare ed infezioni delle vie respiratorie contratte nell'età infantile che predisporrebbero allo sviluppo della BPCO nell'età adulta [27,34].

## FISIOPATOLOGIA

La BPCO è una malattia con ripercussioni a livello polmonare ed extrapolmonare. La componente polmonare è caratterizzata da anomalie responsabili della riduzione del flusso aereo e della compromissione degli scambi gassosi; la componente extrapolmonare, invece, si associa a disfunzione dei muscoli respiratori, malattie cardiovascolari, disfunzione renale, anemia, cachessia ed osteoporosi.

### **Riduzione del flusso aereo**

I principali fattori determinanti il flusso aereo, come evidenziato dalle più recenti linee guida, sono la pressione di spinta che genera il flusso stesso e le resistenze che vi si oppongono. La pressione di spinta dipende dalla forza di retrazione elastica del polmone, le resistenze invece sono determinate dall'ostruzione delle vie aeree periferiche. Le cause della riduzione del flusso aereo possono essere classificate in reversibili e irreversibili (**Tabella 2**).

CAUSE IRREVERSIBILI	CAUSE REVERSIBILI
Fibrosi della parete bronchiale	Accumulo di cellule infiammatorie, muco ed essudato nei bronchi
Riduzione del ritorno elastico	Contrazione della muscolatura liscia
Distruzione del supporto alveolare	Iperinsufflazione dinamica durante l'esercizio fisico

**Tabella 2.** Cause della riduzione del flusso aereo nella BPCO.

Tratta da Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD 2008): <http://www.goldcopd.org>.

La distruzione del tessuto polmonare, che caratterizza il quadro enfisematoso, determina la riduzione degli scambi ventilatori e l'intrappolamento d'aria nelle vie aeree distali provocando iperinflazione alveolare; inoltre aumenta la collassabilità delle vie aeree periferiche per la perdita della trazione radiale che sostiene le stesse e che è normalmente esercitata dagli attacchi alveolari.

Secondo la distribuzione del processo di distruzione alveolare, l'enfisema può essere classificato in centroacinare e panacinare. Nei pazienti con BPCO i due tipi di enfisema spesso coesistono, ma nelle forme più gravi si osserva la prevalenza del tipo panacinare.

L'enfisema panacinare è caratterizzato dall'interessamento completo ed uniforme dell'acino, con disorganizzazione totale del suo quadro architettonico. Gli alveoli normali

sono rimpiazzati da larghi spazi a parete sottile e di forma irregolare, mentre i bronchioli respiratori diventano difficilmente identificabili nelle aree colpite. Questo tipo di enfisema predilige prevalentemente i lobi inferiori, è associato al deficit genetico di AAT e, per questo motivo, si riscontra prevalentemente in soggetti giovani. È stato osservato che nei fumatori con enfisema prevalentemente panacinare, la riduzione del flusso aereo è correlata alla perdita di retrazione elastica ma non al grado di infiammazione delle vie aeree [35].

L'enfisema centroacinare è caratterizzato da distruzione e dilatazione dei bronchioli respiratori con spazi aerei anomali localizzati attorno ai bronchioli terminali nella zona centrale dell'acino, circondati da parenchima intatto. La localizzazione degli spazi aerei distrutti, vicino al centro dei lobuli secondari, spiega perché l'enfisema centroacinare è detto anche centrolobulare. Le pareti degli spazi enfisematosi spesso mostrano la presenza di un infiltrato flogistico che può essere associato ad aspetti fibrotici. Tale forma di enfisema si localizza prevalentemente a livello dei lobi polmonari superiori, è caratteristico di soggetti con lunga storia di esposizione al fumo di sigaretta e predilige individui di età avanzata. Nei fumatori con enfisema prevalentemente centroacinare la riduzione del flusso aereo è correlata al grado di infiammazione delle vie aeree e non alla perdita di retrazione elastica del polmone [35].

Alla luce di queste considerazioni, si può ipotizzare che la riduzione del flusso aereo nei due tipi di enfisema abbia meccanismi fisiopatogenetici diversi: nel tipo panacinare la limitazione al flusso aereo deriverebbe dalla perdita di retrazione elastica determinata dalla distruzione parenchimale, viceversa, nell'enfisema centroacinare potrebbe prevalere l'aumento delle resistenze dovuto all'infiammazione delle vie aeree periferiche. Sulla base di queste considerazioni è stato ipotizzato che l'enfisema centroacinare possa essere una malattia "airborne", cioè che origina dalle vie aeree infiammate, mentre l'enfisema panacinare sarebbe una malattia "blood-borne", che origina da uno squilibrio delle sostanze circolanti nei vasi sanguigni, come nel caso del deficit di AAT [35].

Il secondo fattore che contribuisce alla riduzione del flusso aereo è rappresentato dall'ostruzione delle vie aeree periferiche. Quest'ultima è determinata principalmente dalla presenza di infiammazione cronica con accumulo di cellule infiammatorie nella mucosa. Alla riduzione del calibro delle vie aeree contribuiscono anche l'iperplasia delle cellule caliciformi mucipare e l'ipersecrezione di muco, l'ipertrofia delle cellule muscolari lisce e la loro contrazione spastica e infine la fibrosi peribronchiale.

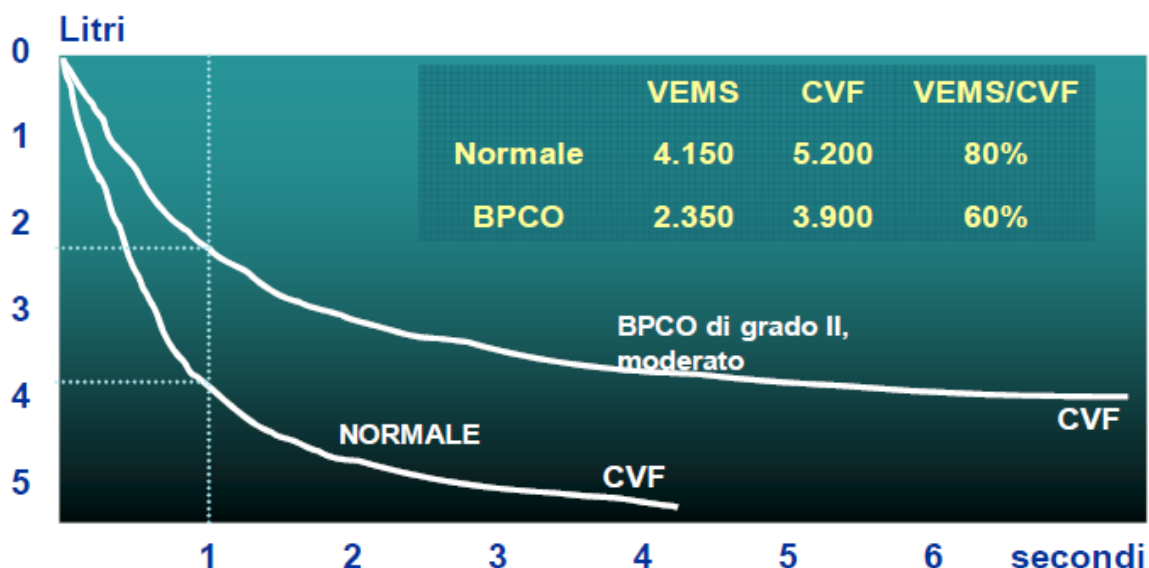
Le vie aeree maggiormente coinvolte nella genesi della limitazione al flusso aereo sono i bronchioli, e in particolare quelli compresi tra la nona e la diciassettesima generazione delle ramificazioni bronchiali, cioè quelle vie periferiche con diametro interno inferiore ai 2 mm, prive di supporto cartilagineo. L'aumento delle resistenze, pertanto, è principalmente imputabile all'aumento di spessore della parete delle piccole vie aeree e alla perdita degli

attacchi alveolari, la quale aumenta la collassabilità dei bronchioli terminali e facilita il fenomeno dell'air-trapping [36].

Queste alterazioni strutturali si traducono in alterazioni funzionali, che possono essere misurate attraverso l'esecuzione di una spirometria, indagine non invasiva che rappresenta il gold standard nella diagnosi e nel follow-up di BPCO.

### Misura della limitazione del flusso aereo

Tutti i soggetti che presentano dispnea, tosse cronica con o senza espettorazione, una storia di esposizione ai fattori di rischio per la malattia, dovrebbero essere sottoposti ad un esame spirometrico attraverso il quale è possibile valutare la presenza di alterazioni ostruttive. La spirometria consente non solo una prima valutazione del paziente, ma anche il follow-up successivo alla diagnosi, in quanto è un esame standardizzato, oggettivo, riproducibile e non invasivo [1]. I valori osservati vengono confrontati con valori di riferimento teorici ottenuti da una popolazione sana con caratteristiche antropometriche ed etniche simili. La spirometria misura direttamente il volume espirato durante il primo secondo (VEMS), la capacità vitale forzata (CVF), e il loro rapporto (VEMS/CVF); quest'ultimo parametro, denominato anche indice di Tiffenau, consente di discriminare i soggetti ostruiti dai soggetti non ostruiti ponendo come limite di normalità 0,7. Pertanto i soggetti con broncoostruzione hanno un rapporto VEMS/CVF < 70%, mentre la gravità dell'ostruzione è determinata dal valore del VEMS (% teorico) (Figura 3) [37].



**Figura 3.** Spirometria normale e spirometria caratteristica del paziente con BPCO da lieve a moderata a confronto. Tratto da Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) 2008. <http://www.golddcopd.org>.

Recentemente è stato introdotto il concetto di "limite inferiore di norma (LLN, Low Limit of Normal)" dell'indice di Tiffenau, calcolato come rapporto tra volume espirato nel primo secondo e capacità vitale lenta; l'uso del LLN del rapporto VEMS/CV consente di definire patologici i soggetti che si collocano al di sotto del quinto percentile della popolazione di riferimento. Ciò implica solo un 5% di falsi positivi ed è, quindi, considerato un metodo statisticamente accettabile.

La spirometria consente anche di stabilire la presenza di iperinflazione alveolare, caratteristica dei pazienti affetti da BPCO con componente prevalentemente enfisematosa. Si parla di iperinflazione alveolare quando il rapporto tra volume residuo (RV) e capacità polmonare totale (CPT), cioè l'indice di Motley (RV/CPT), è superiore al 35% in assoluto con un volume residuo maggiore del 120% rispetto al valore teorico. L'aumento del volume residuo e l'iperinflazione alveolare incrementano il lavoro respiratorio alterando la meccanica respiratoria e favoriscono l'instaurarsi di insufficienza ventilatoria.

La spirometria consente inoltre la valutazione degli scambi gassosi che avvengono attraverso la membrana alveolo-capillare. In base alla legge di Fick, la diffusibilità di un gas attraverso una membrana è direttamente proporzionale alla differenza di concentrazione del gas fra i due compartimenti di scambio (ovvero fra i due lati della membrana alveolo-capillare) e alla superficie di scambio, mentre è inversamente proporzionale allo spessore della membrana.

Nella BPCO il principale parametro alterato è l'estensione della superficie di scambio, legato alla distruzione enfisematosa dei setti alveolari, con conseguente riduzione della diffusione dei gas attraverso la membrana alveolo-capillare. L'efficacia degli scambi gassosi viene valutata durante l'indagine spirometrica misurando la DLco/VA, ovvero la capacità di diffusione del monossido di carbonio (DLco) per litro di volume alveolare (VA).

Nei pazienti che presentano una sensibile riduzione della DLco è opportuno eseguire anche un'emogasanalisi arteriosa, perché la ridotta capacità di scambio polmonare può diminuire la pressione parziale di ossigeno (PaO<sub>2</sub>) e aumentare quella di anidride carbonica (PaCO<sub>2</sub>) nel sangue, causando anche un'alterazione dell'equilibrio acido-base. L'emogasanalisi rappresenta una guida all'atto terapeutico, permette infatti di valutare la necessità di fornire al paziente l'ossigenoterapia e/o un supporto ventilatorio.

Lo stadio più grave di BPCO può essere complicato dalla comparsa di ipertensione polmonare, definita come l'aumento della pressione polmonare (PAP) media a riposo oltre i 20 mmHg. I meccanismi alla base dell'ipertensione polmonare sono molteplici; i più importanti sono l'ipoventilazione alveolare e la distruzione dei setti alveolari. Il primo meccanismo innesca un riflesso nervoso che porta a costrizione locale del letto arteriolare, che se prolungata nel tempo tende a mantenersi per comparsa di fibrosi pervasale. L'ipossia, derivante dall'ipoventilazione, causa vasocostrizione e successivamente un aumento di spessore dei vasi polmonari, associato a perdita di elasticità della parete degli stessi. La distruzione dei setti alveolari determina un danno a carico del letto capillare e riduce la



sezione vascolare polmonare totale, con conseguente aumento delle resistenze complessive del piccolo circolo.

La gravità dell'ipertensione polmonare correla con il grado di ostruzione delle vie aeree e con le alterazioni degli scambi gassosi [38]. Nella maggior parte dei casi di BPCO il grado dell'ipertensione polmonare è lieve-moderato (pressione polmonare tra 25 e 30 mmHg) e si associa ad una portata cardiaca normale, diversamente da quanto si riscontra nell'ipertensione polmonare da altre cause, dove la PAP raggiunge valori elevati con conseguente riduzione della portata cardiaca [39,40]. Tuttavia, con la progressione della malattia, l'ipertensione polmonare porta ad un incremento del post-carico che si traduce in un aumentato lavoro del ventricolo destro, il quale andrà incontro ad ipertrofia e a scompenso cardiaco destro (definito cuore polmonare cronico) [41,42]. Clinicamente il cuore polmonare cronico si manifesta con edemi declivi e turgore giugulare.

### **DIAGNOSI DI BPCO**

La diagnosi di BPCO dovrebbe sempre essere presa in considerazione nei pazienti che presentano dispnea, tosse cronica ed espettorazione e/o una storia di esposizione a fattori di rischio per la malattia. Per poter porre diagnosi di BPCO è quindi necessario eseguire un'anamnesi accurata associata ad un'indagine spirometrica [1].

La sola indagine spirometrica non permette di effettuare una diagnosi certa di BPCO perché esistono altre malattie polmonari in grado di causare una ostruzione al flusso aereo quali l'asma, la fibrosi cistica e le bronchiectasie. Nell'ambito della diagnosi differenziale è innanzi tutto necessario determinare se l'ostruzione al flusso possiede caratteristiche di reversibilità o di persistenza, per distinguere il soggetto affetto da BPCO dal soggetto asmatico.

Nella pratica clinica ciò significa eseguire una prima spirometria in condizioni basali in pazienti che non abbiano assunto la dose giornaliera dell'eventuale terapia broncodilatatrice prescritta, successivamente somministrare un broncodilatatore a breve durata d'azione e ripetere la spirometria a distanza di circa 20 minuti.

Quando il rapporto VEMS/CVF (%) post broncodilatatore rimane inferiore al 70% l'ostruzione al flusso si definisce persistente o non completamente reversibile e la gravità dell'ostruzione è determinata dal valore del VEMS (% teorico). La reversibilità dell'ostruzione, tipica nel paziente asmatico, è definita da un aumento del VEMS del 12% e di almeno 200 ml [1].

Clinicamente la BPCO si manifesta con dispnea progressiva, tosse secca o produttiva, iperproduzione di espettorato. A differenza dei pazienti asmatici, che in caso di malattia non controllata presentano una sintomatologia dall'ampia variabilità giornaliera, i pazienti affetti da BPCO presentano sintomi prevalentemente stazionari.

L'indagine spirometrica andrebbe completata con la misurazione della diffusione alveolo-capillare al monossido di carbonio per valutare la compromissione della superficie di

scambio dei gas; inoltre, attraverso una spirometria globale o la pletismografia corporea è opportuno misurare il volume residuo (RV) che valuta il grado di iperdistensione polmonare. Nel paziente con BPCO già diagnosticata, è inoltre utile completare l'inquadramento clinico mediante l'esecuzione di un emogasanalisi, tecniche di imaging (radiografia del torace ed eventualmente TC torace), esami ematochimici e microbiologici, specie in corso di riacutizzazione di malattia.

### **CLASSIFICAZIONE DI GRAVITÀ**

La spirometria rappresenta il gold standard per misurare la limitazione al flusso; esiste una classificazione spirometrica di gravità della BPCO che utilizza la misura del VEMS post broncodilatatore quale parametro indicativo della severità e dello stadio di malattia (**Tabella 3**). Questa classificazione ha un ruolo fondamentale nella scelta della terapia più adeguata. Le ultime linee guida prevedono, inoltre, il calcolo del BODE index che, attraverso alcuni parametri, permette di ottenere un quadro più completo delle condizioni generali del paziente e quindi della gravità della malattia. Il BODE index tiene conto non solo della funzionalità respiratoria (VEMS), ma anche della tolleranza all'esercizio fisico, dell'indice di massa corporea e del grado di dispnea (**Tabella 4**) [43].

STADIO	CARATTERISTICHE
I: LIEVE	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ VEMS*/CVF &lt; 70%;</li> <li>○ VEMS* ≥ 80% del teorico;</li> <li>○ Con o senza sintomi cronici (tosse, espettorazione).</li> </ul>
II: MODERATA	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ VEMS*/CVF &lt; 70%;</li> <li>○ 50% ≤ VEMS* &lt; 80% del teorico;</li> <li>○ Con o senza sintomi cronici (tosse, espettorazione, dispnea).</li> </ul>
III: GRAVE	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ VEMS*/CVF &lt; 70%;</li> <li>○ 30% ≤ VEMS* &lt; 50% del teorico;</li> <li>○ Con o senza sintomi cronici (tosse, espettorazione, dispnea).</li> </ul>
IV: MOLTO GRAVE	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ VEMS*/CVF &lt; 70%;</li> <li>○ VEMS* &lt; 30% del teorico oppure</li> <li>○ VEMS* &lt; 50% del teorico, in presenza di insufficienza respiratoria o di segni clinici di scompenso cardiaco destro.</li> </ul>

**Tabella 3.** Classificazione di gravità della BPCO. (\* VEMS post-broncodilatatore)

GRADO DI DISPNEA	CARATTERISTICHE
0	Assenza di dispnea
1	Dispnea camminando in salita
2	Dispnea camminando in pianura
3	Necessità di fermarsi camminando in pianura
4	Dispnea al minimo sforzo

**Tabella 4.** Grado di dispnea (Tratto da Celli BR et al, NEJM 2004; 350: 2635-2637).

L'indice BODE è dato dalla somma dei punteggi assegnati a ciascun parametro (**Tabella 5**) e rappresenta un indice predittivo di mortalità.

VARIABILI	PUNTEGGIO NEL BODE INDEX			
	0	1	2	3
VEMS (% del teorico)	> 65	64-50	49-36	< 35
Distanza percorsa in 6 minuti (metri)	< 350	349-250	249-150	< 149
Gradi di dispnea (MMRC)	0-1	2	3	4
Body-mass index	> 21	< 21		

**Tabella 5.**

Determinazione del BODE-index (adattata da Celli BR et al, NEJM 2005;350:1005-12).

Un altro indicatore della gravità della malattia è rappresentato dalla frequenza delle riacutizzazioni di BPCO. Una riacutizzazione di BPCO è definita come *un evento nel decorso naturale della malattia caratterizzato da una variazione dei sintomi di base del paziente, dispnea, tosse, e/o espettorazione, di entità superiore alla normale variabilità giornaliera con esordio acuto e che può richiedere un cambiamento nella terapia regolare in un paziente con BPCO* [1]. Le riacutizzazioni hanno un importante impatto, non solo sulla qualità di vita, ma anche sui costi socio-economici e sulla funzionalità polmonare [44]. Pazienti con un elevato numero di riacutizzazioni presentano un declino annuo del VEMS superiore a quello dei soggetti con poche riacutizzazioni, inoltre in questi pazienti si osserva un'accelerata progressione della malattia verso l'insufficienza respiratoria cronica.

Le principali cause di riacutizzazione sono le infezioni virali e batteriche dell'albero tracheobronchiale e cause non infettive quali l'inquinamento atmosferico; tuttavia, in circa un terzo dei casi la causa resta ignota. I microrganismi maggiormente coinvolti sono i Rinovirus, responsabili del 50% delle riacutizzazioni gravi, l'*Haemophilus Influenzae*, lo *Streptococcus Pneumoniae*, la *Moraxella Catarrhalis* [45]. Durante una riacutizzazione si assiste ad un aumento dell'iperinflazione polmonare con riduzione del flusso espiratorio che spiegano l'aggravamento della dispnea; si osserva anche un peggioramento del rapporto ventilazione/perfusione che causa ipossiemia grave.

L'impatto della BPCO nel singolo paziente non dipende solo dal grado di limitazione al flusso aereo, ma anche dalla gravità dei sintomi quali la dispnea e l'intolleranza all'esercizio fisico. Non esiste una relazione diretta tra grado di limitazione al flusso aereo e condizione clinica. Infatti, mentre nella maggior parte dei pazienti, i sintomi respiratori precedono anche di anni lo sviluppo di una significativa limitazione al flusso aereo, in altri le prove di funzionalità respiratoria segnalano la presenza di una patologia ostruttiva in assenza di sintomatologia riferita [2].

Nonostante la presenza di un'ampia variabilità interindividuale, generalmente si riscontra un aggravamento della sintomatologia parallelamente alla progressione della limitazione al flusso aereo (**Tabella 6**).

STADIO	SINTOMATOLOGIA
I: LIEVE	I soggetti possono essere completamente asintomatici oppure presentare tosse cronica ed espettorato. I soggetti sono generalmente inconsapevoli della loro ridotta funzionalità polmonare.
II: MODERATA	Dispnea tipicamente da sforzo, associata talvolta a tosse cronica ed espettorato. In questo stadio il soggetto si rivolge generalmente al medico per la presenza di sintomi respiratori cronici o per esacerbazioni della malattia.
III: GRAVE	Peggioramento della dispnea, associata ad intolleranza allo sforzo fisico e affaticamento, oltre ai sintomi respiratori cronici. Le riacutizzazioni di malattia sono frequenti e condizionano la qualità di vita del soggetto.
IV: MOLTO GRAVE	Possibile insorgenza di insufficienza respiratoria cronica ( $PaO_2 < 60$ mmHg +/- $PaCO_2 > 50$ mmHg) che può condurre a cuore polmonare cronico (turgore delle vene giugulari e edemi declivi pretibiali e perimalleolari). Altri pazienti, invece, non sviluppano insufficienza cardio respiratoria, ma presentano ripetute riacutizzazioni di malattia gravate da un alto tasso di mortalità.

**Tabella 6.** Sintomatologia della BPCO correlata allo stadio di malattia.

La BPCO è anche associata ad altre malattie definite comorbidità, che contribuiscono agli effetti extrapolmonari della malattia. Tali effetti riguardano soprattutto l'apparato muscolo-scheletrico con perdita di massa magra (cachessia), e atrofia dei muscoli scheletrici come conseguenza di un quadro infiammatorio sistemico (caratterizzato dall'attivazione del TNF- $\alpha$ ), dell'inattività muscolare e dell'apoptosi cellulare.

Le comorbidità peggiorano notevolmente la prognosi di pazienti con BPCO, influenzandone mortalità e sopravvivenza. L'insufficienza respiratoria cronica spiega solo un terzo della mortalità legata a BPCO, altri fattori pertanto devono avere un ruolo causale importante. Infatti, nei pazienti con BPCO, il 40-50% dei casi di morte è imputabile a cause cardiovascolari e un terzo dei pazienti con cardiopatie è affetto anche da BPCO, che ne aumenta il rischio di morte [1].

L'intervento terapeutico e la gestione del paziente deve quindi basarsi su un approccio multidisciplinare, che consenta di gestire le condizioni morbose concomitanti, particolarmente frequenti nei soggetti con un'età superiore ai 65 anni.

## **ANATOMIA PATOLOGICA**

Nella BPCO, le alterazioni anatomo-patologiche possono interessare le vie aeree prossimali, le vie aeree periferiche, il parenchima polmonare e i vasi polmonari e possono assumere caratteristiche peculiari nelle diverse fasi cliniche della malattia. Le alterazioni anatomo-patologiche comprendono modificazioni strutturali causate dall'infiammazione cronica caratterizzata da macrofagi e da linfociti T, soprattutto CD8+ a livello di tutti i compartimenti polmonari [46].

### ***Vie aeree prossimali***

Le vie aeree prossimali sono costituite dalla trachea e dai grossi bronchi con diametro interno superiore ai 2 mm. Queste strutture sono responsabili dell'iperproduzione di muco e quindi della presenza dei sintomi di tosse ed espettorato che caratterizzano la BPCO. Istologicamente l'epitelio delle vie respiratorie prossimali dei pazienti con BPCO è caratterizzato da metaplasia squamosa, iperplasia delle cellule caliciformi mucipare e atrofia delle cellule ciliate. La zona sottoepiteliale presenta un infiltrato infiammatorio, costituito prevalentemente da macrofagi e linfociti T, in particolare linfociti T CD8+ [47- 49].

Nel lume bronchiale dei fumatori con bronchite cronica si osserva un elevato numero di neutrofili, mentre nella sottomucosa non è in genere presente neutrofilia. Questa discordanza tra lume e parete può essere spiegata ipotizzando una rapida migrazione dei neutrofili, dai vasi del circolo bronchiale, verso il lume, attraverso la parete e l'epitelio; in questo modo il loro numero nella zona sottoepiteliale rimane sempre basso.

Le vie aeree prossimali sono il sito preferenziale della produzione di muco; l'eccesso di muco sembra derivare dagli effetti della flogosi cronica che avrebbe un effetto secretagogo sulle ghiandole bronchiali [50,51].

### ***Vie aeree periferiche***

Le vie aeree periferiche sono il sito responsabile dell'aumento delle resistenze e, quindi, della riduzione del flusso nei soggetti con BPCO [52]. Le vie aeree periferiche sono rappresentate

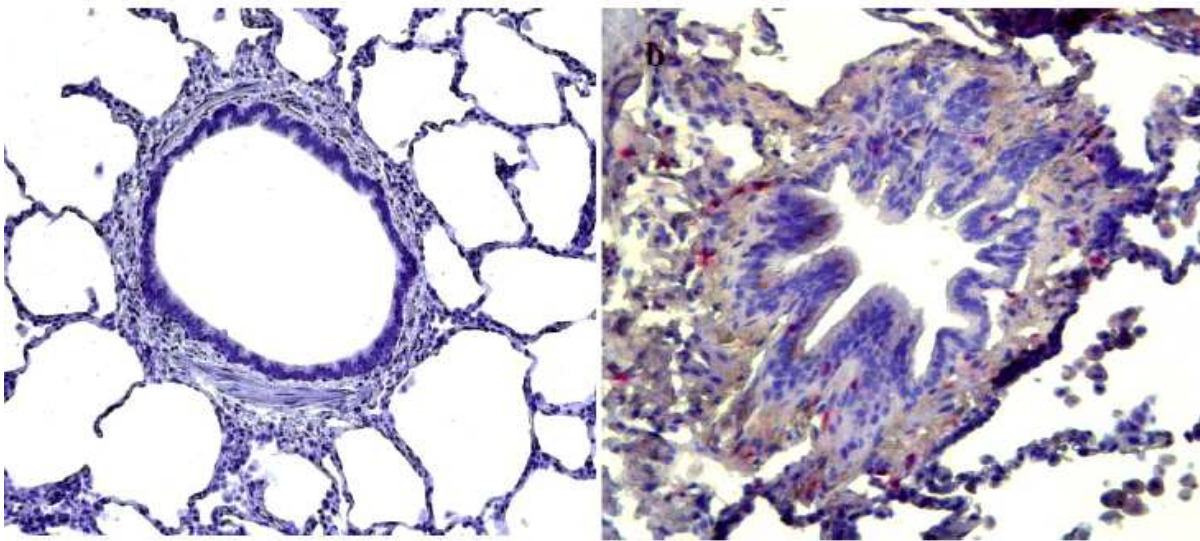
dai bronchioli con diametro interno inferiore ai 2 mm. Le principali alterazioni comprendono l'infiammazione, la fibrosi, l'ipertrofia del muscolo liscio, la distruzione degli attacchi alveolari e l'ipertrofia delle cellule caliciformi mucipare [36,47,53,54]. L'infiammazione cronica porta ad alterazioni strutturali, definite con il termine di rimodellamento delle vie aeree. Questi processi aumentano lo spessore della parete, causano il restringimento del lume e di conseguenza un aumento delle resistenze. I meccanismi alla base della limitazione al flusso aereo sono numerosi:

- L'infiammazione delle vie aeree favorisce la broncoostruzione attraverso la distruzione degli attacchi alveolari, cioè di quella parte della parete alveolare che, ancorandosi alle vie aeree, le tiene aperte. E' stato osservato che il grado di infiammazione degli attacchi alveolari correla positivamente con il grado di distruzione delle vie aeree [36]. E' stato ipotizzato che l'azione litica dei mediatori prodotti dalle cellule infiammatorie che infiltrano la parete bronchiale, indebolisca il tessuto alveolare, facilitandone la rottura, soprattutto nel punto di congiunzione tra parete delle vie aeree e parete alveolare, dove probabilmente lo stress meccanico è massimo.
- Un'altra alterazione anatomo-patologica presente nelle vie aeree periferiche che può contribuire alla riduzione del flusso aereo, è la sostituzione delle cellule del Clara con cellule caliciformi mucipare metaplasiche. Questa sostituzione determina un'iperproduzione di muco ed una diminuzione della produzione di surfactante bronchiolare, favorendo in questo modo la chiusura delle vie aeree, soprattutto durante l'espiazione.
- La limitazione al flusso aereo deriva da processi riparativi che esitano in fibrosi, cui consegue un restringimento persistente del lume delle vie aeree in seguito alla perdita di elasticità e all'aumento dello spessore della parete bronchiale. Quest'ultimo correla negativamente con i valori del VEMS ed è quindi fortemente associato alla progressione della malattia [55].
- Infine si osserva un aumento dei neutrofilii nei fasci di muscolatura liscia delle vie aeree periferiche, dove, grazie alla produzione di mediatori che stimolano la contrazione del muscolo liscio e la proliferazione delle cellule muscolari, sembrano contribuire alla broncoostruzione aumentando lo spessore della parete e restringendo il volume delle vie aeree [53-54].

L'infiltrato infiammatorio è caratterizzato da macrofagi, linfociti B e linfociti T CD8<sup>+</sup> nella zona sottoepiteliale (Figura 4) [47]. L'aumento del numero di linfociti T CD8<sup>+</sup> è evidente anche nel parenchima, nelle arterie polmonari e nei linfonodi dei soggetti con BPCO e in tutti questi compartimenti i valori riscontrati correlano con il grado di broncoostruzione.

È interessante notare che il processo infiammatorio si amplifica progressivamente con il progredire della malattia. Infatti, passando dallo stadio lieve allo stadio grave della malattia,

aumenta l'infiltrazione di neutrofili, macrofagi, linfociti CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> e linfociti B. E' stato osservato che nei pazienti più gravi, le cellule infiammatorie possono essere organizzate in veri e propri follicoli linfoidi con un centro germinale ricco di linfociti B, circondato da una regione periferica ricca di linfociti T. E' quindi possibile che con la progressione della malattia si sviluppi una risposta immunologica acquisita nei confronti di un antigene specifico [55]. Inizialmente, in considerazione del fatto che nei pazienti con BPCO grave le infezioni batteriche sono frequenti, è stato proposto che questo antigene fosse di natura infettiva. Tuttavia, visti anche i risultati controversi degli studi che hanno cercato di identificare questi antigeni infettivi, l'attenzione è stata rivolta verso antigeni endogeni (autoantigeni) prodotti dall'esposizione cronica al fumo di sigaretta. [56].



**Figura 4.** Infiltrazione dei linfociti T CD8<sup>+</sup> nelle vie aeree periferiche: via aerea normale (a), via aerea di paziente con BPCO (b).

#### **PARENCHIMA POLMONARE**

La principale alterazione strutturale del parenchima polmonare dei pazienti affetti da BPCO è la distruzione del parenchima che caratterizza l'enfisema e contribuisce alla riduzione del flusso attraverso la diminuzione della forza di retrazione elastica del polmone. L'enfisema è definito come la distruzione e l'allargamento degli spazi aerei distali al bronchiolo terminale in assenza di evidenti segni di fibrosi, ma alcuni studi hanno dimostrato che in realtà esiste una deposizione di collagene a livello interstiziale [57,58].

Il processo di distruzione parenchimale è associato alla presenza di una risposta infiammatoria costituita da linfociti T CD8<sup>+</sup> di tipo 1 e correla con il grado di broncoostruzione [59]. I linfociti T citotossici possono provocare un danno diretto a livello parenchimale attraverso due meccanismi: da un lato la liberazione di granuli citoplasmatici contenenti granzima B e perforine, che provocano la lisi osmotica della cellula, dall'altro l'induzione dell'apoptosi caspasi-dipendente [60].



È stato osservato che mentre nel parenchima polmonare di pazienti con BPCO di grado lieve è presente un processo infiammatorio caratterizzato da un aumento selettivo di linfociti T CD8<sup>+</sup>, quando la malattia progredisce negli stadi più avanzati si assiste ad un aumento di tutte le cellule infiammatorie con una netta prevalenza di neutrofili [61,62].

### **VASI POLMONARI**

Negli stadi avanzati della BPCO si può assistere all'insorgenza di ipertensione polmonare e cuore polmonare cronico; queste alterazioni sono la conseguenza della perdita del letto capillare che, a sua volta, dipende dalla distruzione del parenchima polmonare, della vasocostrizione polmonare ipossica e del rimodellamento delle arterie polmonari [63].

Quando la funzionalità respiratoria e la pressione a riposo nell'arteria polmonare sono ancora nella norma, possono essere già presenti le tipiche alterazioni strutturali caratteristiche del rimodellamento delle arterie polmonari, quali l'ispessimento della tonaca intima, dovuto alla deposizione di cellule elastiche e di collagene accompagnata allo sviluppo di fasci muscolari longitudinali, l'ispessimento della tonaca media muscolare, l'infiltrazione di linfociti CD8<sup>+</sup> nell'avventizia [59]. Questi cambiamenti strutturali sono spesso associati alle alterazioni funzionali dell'endotelio e ad una diminuita produzione di fattori che promuovono il rilascio del muscolo liscio vascolare. Probabilmente il fumo di sigaretta costituisce un insulto precoce, il quale provoca il potenziale danno endoteliale all'origine del rimodellamento vascolare nei soggetti con BPCO [63]. Attraverso questo meccanismo, i soggetti fumatori sono più suscettibili agli effetti dannosi da parte di altri fattori, quali l'ipossia o l'infiammazione, e quindi sono predisposti allo sviluppo delle modificazioni strutturali alla base dell'ipertensione polmonare.

### **INFIAMMAZIONE SISTEMICA**

E' ormai noto che nella BPCO è presente un'importante infiammazione sistemica associata a quella polmonare: ad esempio nel sangue periferico dei fumatori con BPCO si riscontra un aumento dei leucociti, della proteina C reattiva (PCR). Si pensa che l'infiammazione sistemica possa rappresentare l'anello di congiunzione tra la flogosi polmonare e numerose comorbidità della BPCO.

È risaputo che l'infiammazione sistemica rappresenta un fattore di rischio per l'insorgenza di eventi cardiovascolari e cerebrovascolari. Infatti, i livelli di PCR circolanti correlano positivamente con il rischio di eventi coronarici ed elevati livelli di fibrinogeno ematico rappresentano un fattore di rischio di mortalità per tutte le cause. Inoltre numerosi studi suggeriscono che l'infiammazione sistemica precede lo sviluppo di alterazioni vascolari o metaboliche e quindi lo stabilirsi delle comorbidità [64,65]. Le comorbidità sono quasi la regola nel paziente affetto da BPCO e almeno il 50% dei pazienti con BPCO presenta una o più componenti della sindrome metabolica [66].

L'infiammazione sistemica, inoltre, rappresenta il meccanismo comune grazie al quale fattori di rischio come il fumo di sigaretta, l'iperlipidemia, l'obesità e l'ipertensione aumentano la probabilità d'insorgenza di malattie infiammatorie croniche [67,68] e l'utilizzo della proteina C reattiva è stato proposto come marker umorale di tutti i disordini infiammatori cronici [69].

La relazione tra la patologia polmonare e l'infiammazione sistemica è invece sostenuta dal fatto che la flogosi polmonare e quella sistemica si sviluppano di pari passo, anche se non è stata ancora determinata la relazione temporale tra i due fenomeni. Uno studio recente, infatti, ha dimostrato che i soggetti affetti da BPCO presentano aumentati livelli di citochine appartenenti alla risposta infiammatoria di tipo Th1, sia a livello polmonare (nel liquido di lavaggio broncoalveolare e nel brushing bronchiale), che nel sangue periferico, rispetto ai soggetti fumatori di controllo per i quali si è evidenziata una risposta infiammatoria di tipo Th1 prevalentemente a livello locale polmonare [70].

Nel paziente con BPCO è anche presente uno stress ossidativo sistemico: pazienti con riacutizzazione di BPCO mostrano un'aumentata produzione di anione superossido da parte dei neutrofili circolanti nel sangue periferico rispetto a pazienti con BPCO stabilizzata [71]. È inoltre riscontrabile un incremento dei marker di danno ossidativo, infatti, nel plasma (ma anche nel liquido di lavaggio broncoalveolare) di fumatori e soprattutto di pazienti con BPCO riacutizzata si ritrovano livelli maggiori dei prodotti della perossidazione lipidica rispetto ai soggetti di controllo non fumatori [72].

L'importanza dello stress ossidativo è legata anche al fatto che esso è in grado di provocare danno tissutale a prescindere dall'infiltrazione di cellule della flogosi nel tessuto stesso: è stato dimostrato che lo stress ossidativo sistemico riduce la deformabilità dei neutrofili ed aumenta quindi il loro sequestro nei capillari polmonari. In tale sede i neutrofili rilasciano radicali liberi e proteasi che danneggiano gli alveoli contribuendo alla patogenesi dell'enfisema. Ciò significa che per determinare il danno alveolare non è strettamente necessaria la migrazione dei neutrofili negli alveoli, ma è sufficiente l'attivazione ossidativa dei neutrofili in sede capillare.

In conclusione la flogosi e lo stress ossidativo a livello sistemico sono due importanti meccanismi che giustificano le numerose comorbidità della BPCO e impongono una valutazione clinica globale del paziente.

## **PATOGENESI**

I meccanismi patogenetici alla base della BPCO non sono completamente noti. Il principale fattore di rischio è rappresentato dal fumo di sigaretta che induce una risposta infiammatoria cronica nelle vie aeree di tutti i fumatori; poiché solo il 15% dei fumatori sviluppa la BPCO e poiché tale patologia può insorgere anche in soggetti non fumatori, non è possibile considerare il fumo di sigaretta né un fattore sufficiente, né necessario. Il paziente con BPCO sviluppa una risposta infiammatoria anomala, in quanto amplificata e in grado di mantenersi

anche dopo la rimozione dell'agente irritante, ad esempio anche in seguito alla cessazione dell'abitudine tabagica. Il meccanismo che sta alla base di tale amplificazione non è ancora noto, ma sono state avanzate numerose ipotesi patogenetiche che potrebbero spiegare, almeno in parte, lo sviluppo della BPCO. Probabilmente i diversi meccanismi concorrono in misura più o meno rilevante allo sviluppo della malattia e non è detto che tutti debbano necessariamente coesistere nello stesso individuo.

Tradizionalmente l'ipotesi più accreditata è quella dello squilibrio locale fra proteasi (elastasi neutrofila, metalloproteasi di matrice, etc.) ed antiproteasi ( $\alpha$ 1-antitripsina,  $\alpha$ 1-antichimotripsina, etc.) che si realizza per un eccesso delle prime o per un difetto delle seconde, o per una coesistenza delle due situazioni. Mentre le proteasi che vengono prodotte dalle cellule infiammatorie e da quelle epiteliali provocano un danno alle componenti del tessuto connettivo, le antiproteasi proteggono da questo danno.

Un secondo meccanismo implicato nella patogenesi della BPCO è lo squilibrio tra fattori ossidanti ed antiossidanti: lo spostamento di tale equilibrio a favore degli agenti ossidanti è definito stress ossidativo. Il polmone è esposto ad ossidanti endogeni che vengono rilasciati dai fagociti o prodotti attraverso la catena di trasporto degli elettroni nella respirazione cellulare a livello mitocondriale; inoltre è esposto anche ad ossidanti esogeni, come quelli presenti nell'inquinamento atmosferico o nel fumo di sigaretta, sia nella fase gassosa, sia in quella corpuscolata [73]. Si stima che ogni boccata di fumo inalata contenga circa 1017 molecole ossidanti [74]. Nell'albero respiratorio i principali antiossidanti in grado di limitare il danno ossidativo sono rappresentati da mucine, glutathione ridotto, acido urico, proteine (soprattutto l'albumina) e acido ascorbico.

È stato dimostrato che nei fumatori c'è un aumento dello stress ossidativo. In particolare si ritrovano nell'aria esalata livelli più elevati di perossido di idrogeno e di un'isoforma delle prostaglandine generata mediante per ossidazione non enzimatica [74,75]. L'aumento di sostanze ossidanti nel polmone dei fumatori è almeno in parte attribuibile all'incremento nel numero di neutrofili e macrofagi ritrovati negli spazi alveolari. Studi in vitro hanno dimostrato che i macrofagi alveolari dei fumatori rilasciano spontaneamente un'augmentata quantità di ossidanti, come  $O_2$  e  $H_2O_2$ , rispetto a quelli dei non fumatori e che si ritrova un'augmentata quantità di ferro libero in forma ferrosa negli spazi aerei di pazienti con BPCO, in grado di catalizzare reazioni che generano radicali liberi dell'ossigeno (come le reazioni di Fenton e di Haber-Weiss) [74,76]. Secondo alcuni autori il fumo di sigaretta interferirebbe con la sintesi di elastina e con la sua riparazione, promuovendo in questo modo lo sviluppo di enfisema [77]. Recentemente è stato ipotizzato che anche l'apoptosi possa contribuire alla patogenesi dell'enfisema; l'apoptosi deriverebbe dalla disregolazione del fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGF) che svolge un ruolo nella crescita delle cellule endoteliali ed epiteliali; la disregolazione del VEGF interferirebbe quindi con la riparazione del danno polmonare indotto da particelle nocive, come ad esempio il fumo di sigaretta [78-81].

Gli agenti ossidanti e le aldeidi, che sono i maggiori costituenti della frazione volatile del fumo di sigaretta, giocherebbero un ruolo chiave nell'induzione dell'apoptosi cellulare [82]. Il danno imputabile allo stress ossidativo contribuisce quindi all'amplificazione e al mantenimento della risposta infiammatoria e rende il polmone più vulnerabile e più sensibile all'esposizione ad agenti chimici o infettivi presenti nell'aria respirata.

Non tutti i fumatori sviluppano BPCO, per cui altri fattori devono essere implicati nella complessa patogenesi della malattia. Alcuni studi hanno evidenziato la possibilità che la suscettibilità alla BPCO sia legata alle infezioni adenovirali latenti come suggerisce l'aumentata espressione di proteine adenovirali nel polmone di fumatori affetti da BPCO, rispetto a fumatori con prove di funzionalità respiratoria nella norma [83]. L'infezione virale potrebbe attivare il fattore Nucleare- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) e di conseguenza favorire la produzione di citochine pro infiammatorie come IL-8 e TNF- $\beta$ , che amplificano e mantengono la risposta infiammatoria [84,85]. I meccanismi molecolari implicati in tale amplificazione sono in realtà numerosi, visto che anche uno squilibrio fra l'acetilazione e la deacetilazione (a favore della prima) degli istoni potrebbe essere coinvolto nella patogenesi della BPCO. Tale squilibrio, infatti, si traduce in un rimodellamento della cromatina che promuove la trascrizione di geni implicati nella risposta infiammatoria [86,87].

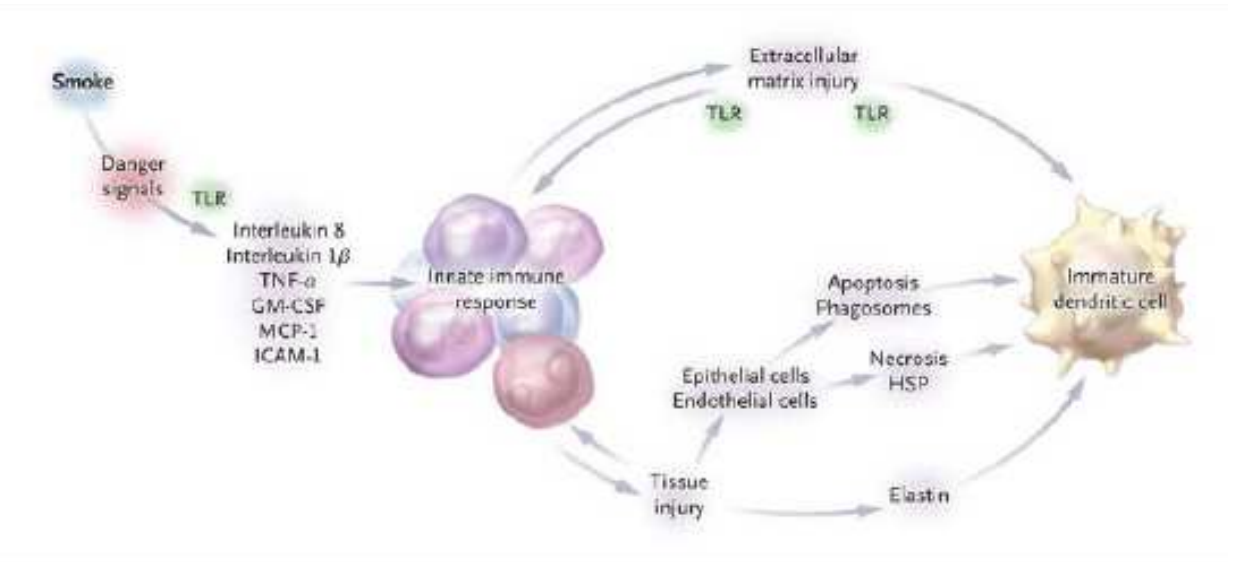
La teoria che è stata oggetto degli studi più recenti propone la presenza di una componente autoimmune che potrebbe spiegare la diversa suscettibilità allo sviluppo della BPCO nei diversi soggetti. Questa ipotesi è sostenuta da diverse caratteristiche presenti nella BPCO: la perpetuazione della risposta infiammatoria (che persiste anche eliminando l'esposizione ai fattori di rischio), la presenza di riacutizzazioni, la familiarità e la condivisione degli stessi mediatori e delle stesse cellule infiammatorie di malattie a patogenesi autoimmunitaria. Recentemente alcuni studi hanno ipotizzato che le alterazioni patologiche possano essere la conseguenza di una risposta immunitaria di tipo acquisito che si sviluppa contro epitomi self alterati formati in seguito al danno indotto dall'esposizione al fumo di sigaretta [88].

A sostegno di questa ipotesi, due importanti lavori hanno dimostrato l'attivazione dell'immunità cellulo-mediata e di quella umorale nei soggetti con BPCO. Lee e collaboratori hanno infatti riscontrato da un lato la presenza di una risposta infiammatoria linfocitaria di tipo 1, attivata da epitopi tissutali polmonari, e dall'altro, la secrezione di autoanticorpi diretti contro l'elastina da parte dei linfociti B presenti nei polmoni di soggetti enfisematosi. Più recentemente, Carol e collaboratori hanno dimostrato la presenza di IgG circolanti con alta avidità per le cellule epiteliali polmonari e la deposizione di immunocomplessi a livello dei setti alveolari e delle piccole vie aeree [89,90].

Alcuni autori, a supporto di questa nuova ipotesi patogenetica, in una recentissima review, pubblicata dal New England Journal of Medicine, hanno rivisitato i meccanismi immunologici che portano allo sviluppo della malattia proponendo un approccio a "gradini" [91]. Tale ipotesi prevede che la risposta immunitaria progredisca parallelamente con la riduzione della

funzionalità polmonare del paziente, e suddivide l'evoluzione della risposta immune in tre stadi di gravità che trovano una corrispondenza con gli stadi di gravità della malattia secondo le linee guida GOLD.

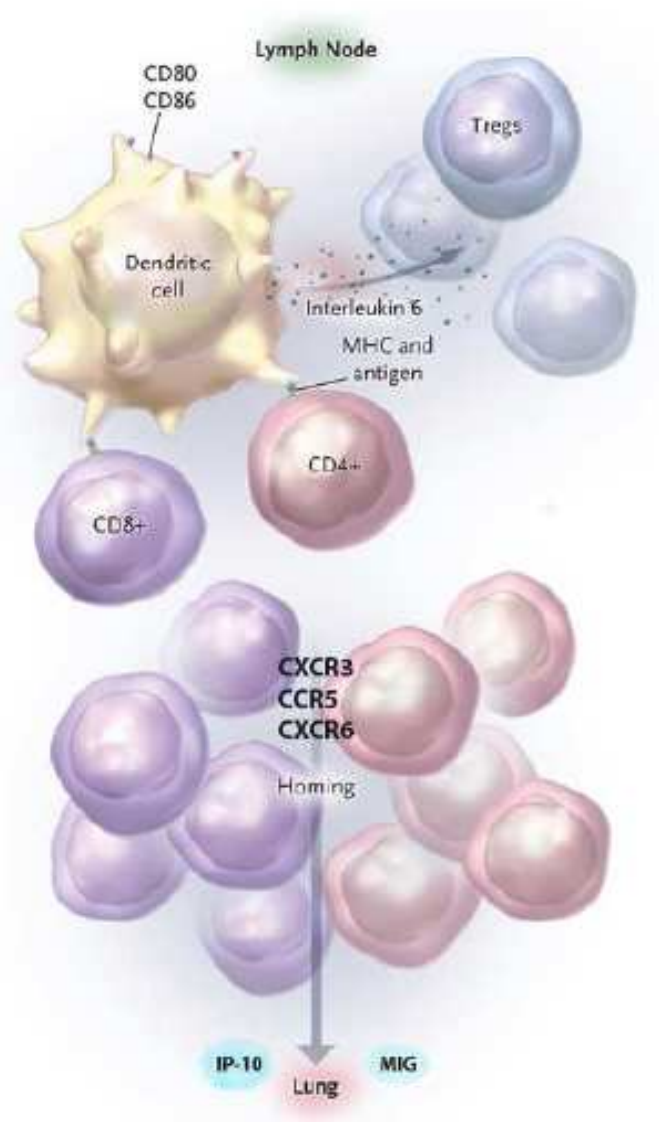
**STADIO 1:** presenza di "segnali di allerta" che attivano l'immunità innata, la cui entità viene controllata da fattori di regolazione. Si riscontra in soggetti in stadio GOLD I (**Figura 5**).



**Figura 5.** I "segnali di allerta" attivano l'immunità innata, la cui entità viene controllata da fattori di regolazione (ad esempio i TLRs).

Non è completamente chiaro come le sostanze irritanti possano scatenare una risposta immune; tuttavia, in base alle recenti acquisizioni, si ritiene che agenti, quali il fumo di sigaretta, inducano uno stress cellulare e un danno epiteliale iniziale che innescherebbero dei "segnali di allerta" cellulare [92]. Questi segnali, a loro volta, attiverebbero la risposta immune innata attraverso il legame con i TLRs (Tool Like Receptors) presenti sulle cellule epiteliali. L'attivazione di questi recettori è responsabile dell'attivazione del fattore nucleare NFκB che stimola la produzione di mediatori dell'infiammazione da parte delle cellule epiteliali stesse, quali TNF-α, IL-8, IL-1β, GM-CSF. L'attivazione dell'immunità innata amplificherebbe la risposta infiammatoria causando ulteriori danni sia a livello tissutale che della matrice extracellulare con la produzione di ulteriori sostanze antigeniche. Se i meccanismi che regolano la risposta immunitaria innata sono efficienti, questa non progredisce verso una risposta di tipo acquisito e il processo infiammatorio, parallelamente alla funzionalità polmonare del paziente, potrebbe arrestarsi a questo stadio. In caso contrario, gli antigeni liberati dal perpetuarsi della risposta infiammatoria attiverebbero le cellule presentanti l'antigene (APC), ed in particolare le cellule dendritiche.

**STADIO 2:** attivazione delle cellule tipiche dell'immunità acquisita, grado di tolleranza immunologica regolato dai Treg. Si riscontra in soggetti in stadio GOLD I-II (**Figura 6**).



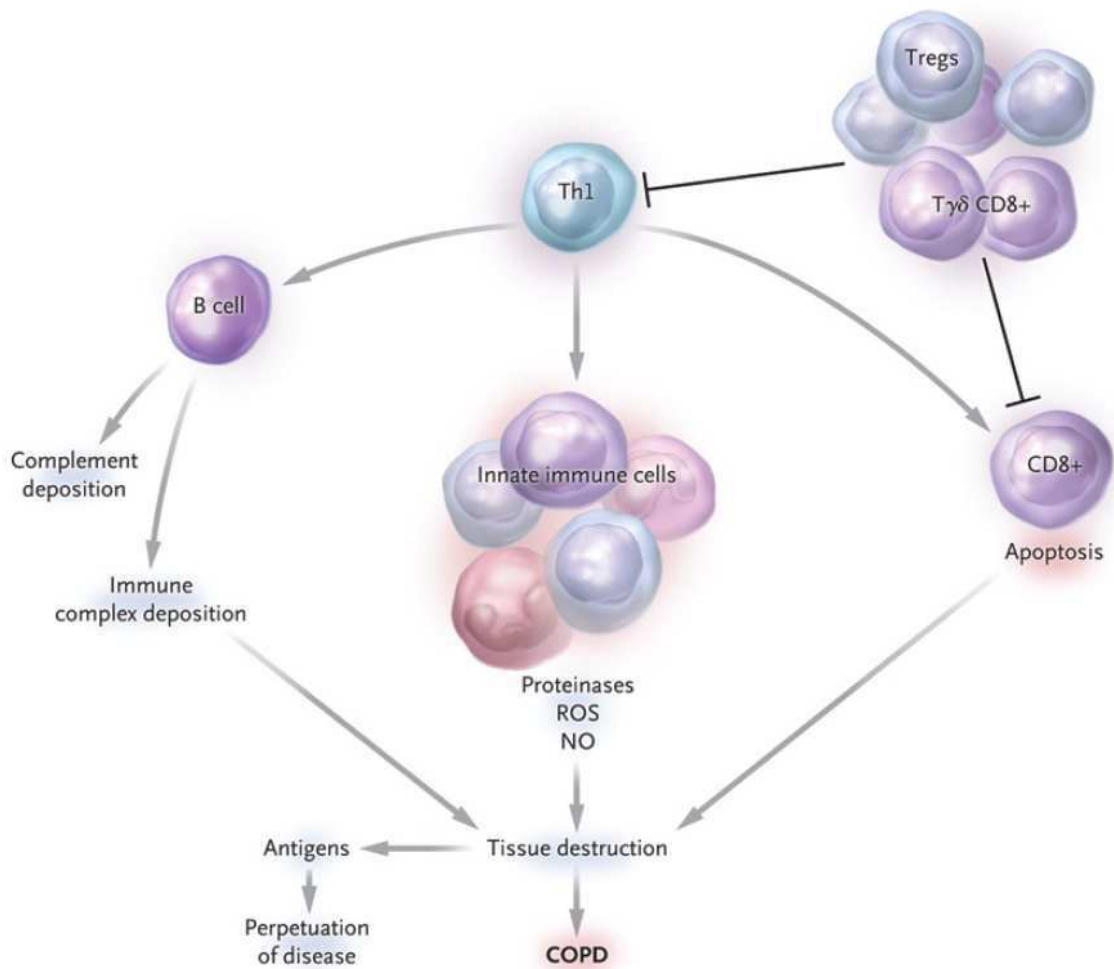
**Figura 6.** Attivazione delle cellule tipiche dell'immunità acquisita. Grado di tolleranza immunologica regolato dai Treg.

In questo stadio le cellule dendritiche attivate, dopo aver espresso i complessi MHCII e le molecole co-stimolatrici CD80-CD86, migrerebbero verso i linfonodi regionali, dove promuoverebbero la proliferazione e la differenziazione dei linfociti T immaturi in linfociti T CD4+ Th1 e CD8+ citotossici. I meccanismi di tolleranza immunologica verso il self sono controllati da due sottopopolazioni linfocitarie quali i linfociti Treg e i linfociti T  $\gamma\delta$  CD8+ che determinano il grado di proliferazione dei linfociti T; la perdita di questa tolleranza sembra correlare con la gravità della malattia.

E' stato dimostrato che nei soggetti fumatori con funzionalità polmonare nella norma è presente un importante aumento di questi due sottotipi linfocitari, rispetto ai non fumatori

mentre nei soggetti con BPCO ciò non avviene e il livello delle cellule regolatrici sembra essere significativamente più basso [93,94].

**STADIO 3:** riconoscimento di autoantigeni polmonari da parte delle cellule dell'immunità acquisita. Assenza di tolleranza verso il self. Si riscontra in soggetti in stadio GOLD III o IV (Figura 7).



**Figura 7.** Riconoscimento di auto-antigeni polmonari da parte delle cellule dell'immunità acquisita. Assenza di tolleranza verso il self (autoimmunità).

In questo stadio i linfociti attivati dalle cellule dendritiche, esprimono recettori per chemochine espresse dal tessuto polmonare danneggiato e vengono richiamati verso il polmone dove producono numerosi danni: i linfociti CD4<sup>+</sup> favoriscono lo stress ossidativo e la produzione di proteinasi, mentre i linfociti CD8<sup>+</sup> e i linfociti B, organizzati in follicoli linfoidi, agiscono favorendo la necrosi e l'apoptosi cellulare con conseguente rimodellamento delle vie aeree, enfisema e liberazione di ulteriori auto-antigeni che perpetuano il processo infiammatorio. Negli stadi più avanzati della malattia sembra quindi svilupparsi una risposta

immunitaria di tipo acquisito, diretta contro auto-antigeni polmonari, con tutte le caratteristiche proprie delle risposte di tipo autoimmune.

In conclusione, poiché la gravità clinica della malattia procede di pari passo con l'entità e il tipo di risposta infiammatoria instauratosi, la progressione verso gli stadi più avanzati potrebbe dipendere dal bilancio tra i meccanismi che spingono verso l'attivazione della risposta immune e quelli che controllano la tolleranza immunologica. Infatti, una piena tolleranza immunologica permetterebbe il contenimento della risposta infiammatoria allo stadio 1, una tolleranza moderata sarebbe associata allo stadio 2 e una mancata tolleranza porterebbe allo sviluppo di una risposta immunitaria di tipo acquisito-autoimmune, tipica dello stadio 3.



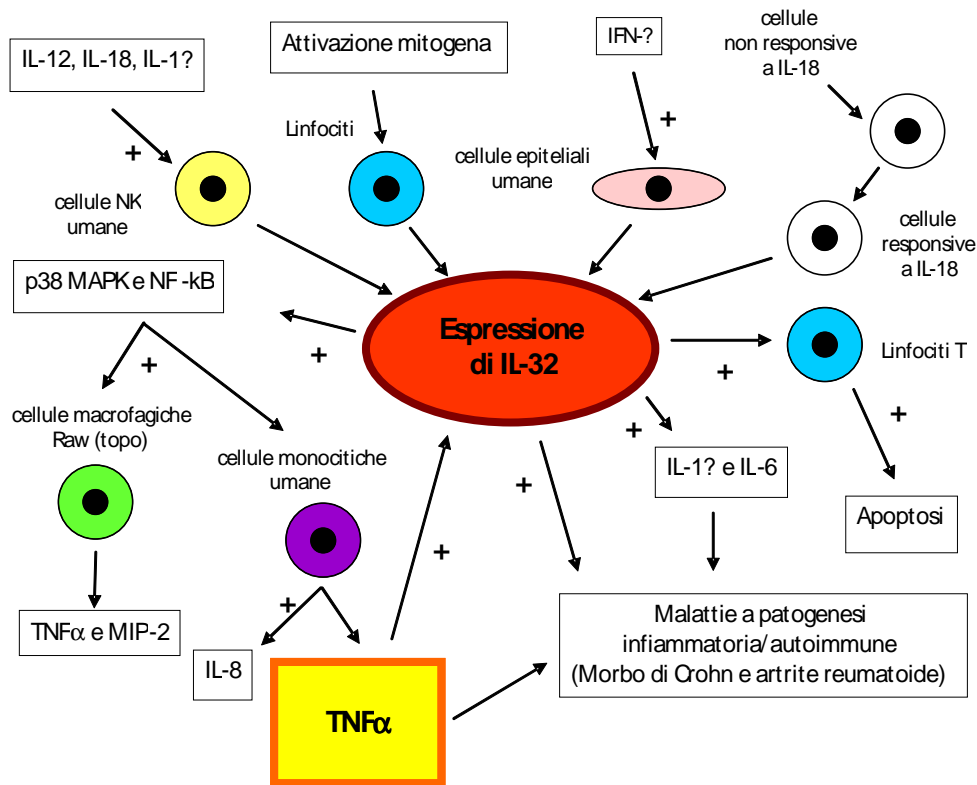
## IL-32

L'interleuchina 32 (IL-32) è una citochina proinfiammatoria che in origine fu denominata "trascritto 4 delle cellule Natural Killer (NK4)". Il nome NK4 deriva dalla sua prima identificazione come prodotto di trascrizione la cui espressione era aumentata nelle cellule natural killer stimulate da IL-2 [95]. La produzione di NK4 era inoltre aumentata nelle cellule mononucleate del sangue periferico (PBMCs) attivate da acetato forbole miristato. L'analisi della sequenza aminoacidica permise di scoprire che NK4 presentava una sequenza segnale, ma era privo della regione transmembrana, portando così ad ipotizzare che si trattasse del trascritto codificante per una proteina di secrezione.

Dalla sua scoperta NK4 è stato oggetto di numerosi studi che ne hanno dimostrato aumentati livelli di espressione nei linfociti T memoria rispetto ai linfociti T naive [96], nei linfociti B infettati dal virus di Epstein-Barr [97], nelle cellule progenitrici ematopoietiche [98] e nelle cellule di neuroblastoma attivate mediante un agente anti-neoplastico [99]. Tuttavia, non erano ancora state definite le caratteristiche funzionali ed il ruolo fisiologico del prodotto di traduzione di NK4. Uno degli studi più importanti svolti su NK4 è stato condotto da Kim et al., i quali hanno descritto la struttura genomica, il segnale di trascrizione, i meccanismi di regolazione dell'espressione e l'attività biologica di questo trascritto [100]. Gli autori hanno infatti scoperto che NK4 è espresso, oltre che dalle cellule NK, anche da due linee di cellule epiteliali umane, le cellule del carcinoma polmonare (A549) e le cellule Wish, stimulate da citochine proinfiammatorie quali IL-18, IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$  e IL-12. Il prodotto di traduzione di NK4 è risultato inoltre in grado di stimolare nelle cellule della linea monocitica l'espressione del fattore di necrosi tumorale  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), della proteina infiammatoria macrofagica (MIP)-2 e di IL-8 mediante l'attivazione di NF- $\kappa$ B e p38 MAPK (**Figura 8**). Queste evidenze hanno indotto ad ipotizzare che NK4 potesse essere coinvolto nella risposta infiammatoria, perciò la proteina derivante da questo trascritto è stata identificata come una nuova citochina proinfiammatoria e rinominata IL-32 [100]. Il gene di IL-32 è localizzato sul braccio lungo del cromosoma 16 nel locus 13.3 (16p13.3), è organizzato in otto piccoli esoni e può essere trascritto mediante splicing alternativo in sei varianti (IL-32 $\alpha$ , IL-32 $\beta$ , IL-32 $\delta$ , IL-32 $\gamma$ ,  $\epsilon$  e  $\zeta$ ) [100,101]. Kim e collaboratori hanno inoltre dimostrato che vi è un'espressione costitutiva di IL-32 a livello dei tessuti di diversi organi. Infatti l'analisi con northern blot ha rilevato livelli elevati di produzione di mRNA IL-32 nella milza e nei linfociti del sangue periferico, una moderata espressione nel timo, nell'intestino e nel colon, e una scarsa produzione a livello del tessuto prostatico [100].

Sulla base di queste scoperte è stata formulata l'ipotesi che IL-32 possa avere un ruolo importante nella risposta immune sia innata che acquisita. Questa prospettiva ha guidato

studi recenti, volti ad indagare il ruolo di IL-32 nel processo flogistico che caratterizza numerose patologie infiammatorie croniche.



**Figura 8.** Induzione dell'espressione ed azione pro-infiammatoria di IL-32 (modificata da P. Conti et al. Modulation of autoimmunity by the latest interleukins (with special emphasis on IL-32). Autoimmunity Reviews 2007;6:131-137).

La risposta immunologica innata dipende dal riconoscimento di patterns molecolari propri di agenti patogeni da parte di recettori specifici, tra i quali, quelli meglio caratterizzati sono i recettori Toll-like (TRL) e i domini di oligomerizzazione leganti i nucleotidi (nucleotide-binding oligomerization domain, NOD) [102,103]. Alterazioni di questi recettori ed in particolare di NOD2 potrebbero avere una grande rilevanza clinica, in quanto sembrano predisporre allo sviluppo di malattie infiammatorie croniche, come il Morbo di Crohn, e ad una maggiore suscettibilità nei confronti delle infezioni da Mycobacterium tuberculosis [104,105]. Uno studio, infatti, ha dimostrato che IL-32 sinergizza con i mucopeptidi dei peptidoglicani microbici nel legame specifico con NOD-1 e NOD-2, e stimola la produzione di IL-1 $\beta$  e IL-6, svolgendo così un'azione di difesa antimicrobica e di mantenimento della barriera epiteliale intestinale. Nei pazienti affetti dal Morbo di Crohn che presentano la mutazione 3020insC del gene NOD-2, IL-32 non è in grado di attivare la risposta infiammatoria, con una conseguente maggiore suscettibilità nei confronti delle infezioni a carico dei patogeni intracellulari [104]. Inoltre, recentemente Shioya et al. hanno dimostrato che l'espressione di IL-32 è aumentata nella

mucosa intestinale dei pazienti affetti da Morbo di Crohn e da colite ulcerosa, mediante l'azione di varie citochine tra cui anche TNF- $\alpha$  [106]. Questa scoperta evidenzia la probabile esistenza di un meccanismo di autoamplificazione della risposta infiammatoria, in cui TNF- $\alpha$  promuoverebbe l'espressione epiteliale di IL-32, che a sua volta stimolerebbe la produzione di TNF- $\alpha$  da parte dei monociti. Queste evidenze inducono ed ipotizzare che IL-32 potrebbe avere un ruolo importante nella patogenesi del morbo di Crohn, favorendo il perpetuarsi dell'insulto flogistico.

Il ruolo di IL-32 nella risposta infiammatoria diretta contro i micobatteri è stata studiata da Natea e collaboratori, che hanno analizzato l'espressione in vitro di IL-32 nelle PBMCs esposte al *Mycobacterium tuberculosis* [107]. Gli autori hanno documentato che l'interazione tra il micobatterio e le cellule monocitarie comporta il clivaggio da parte della caspasi-1 del precursore di IL-18, che nella sua forma attivata stimola la produzione di IFN- $\gamma$ , il quale a sua volta è in grado di aumentare l'espressione di IL-32. Questo studio evidenzia quindi un possibile ruolo di IL-32 nel processo infiammatorio di difesa che si sviluppa nell'infezione tubercolotica.

Recentemente, sulla base delle evidenze fino ad ora descritte è stata formulata l'ipotesi che IL-32 possa avere un ruolo importante nelle malattie a patogenesi infiammatoria-autoimmune. Infatti, come già esposto, l'espressione di IL-32 può essere indotta dalla stimolazione di citochine proinfiammatorie a livello delle cellule epiteliali umane che costituiscono il bersaglio di numerose malattie infiammatorie. Inoltre IL-32 è in grado di stimolare la produzione di TNF- $\alpha$ , citochina nota per essere aumentata nelle malattie infiammatorie a componente autoimmune [100]. A queste evidenze si aggiunge la scoperta che IL-32 è specificatamente legata dalla Proteinasi 3 (PR3), una serin-proteasi prodotta dai granulociti neutrofili, la cui espressione è aumentata nei pazienti affetti da artrite reumatoide e da vasculiti caratterizzate dalla produzione di autoanticorpi diretti contro antigeni neutrofilici citoplasmatici (ANCA). Il legame tra IL-32 e PR3 comporta il clivaggio di IL-32 ed un aumento della sua attività pro-infiammatoria. L'inibizione specifica del legame tra IL-32 e PR3 o la neutralizzazione di PR3, potrebbe quindi ridurre gli effetti di IL-32 nelle patologie immuno-correlate [108,109].

Studi recenti hanno indagato il ruolo di IL-32 nella patogenesi dell'artrite reumatoide [110,111]. Questi lavori hanno dimostrato che l'espressione di IL-32 è aumentata a livello del tessuto sinoviale dei pazienti affetti da artrite reumatoide attiva e che la produzione di IL-32 correla positivamente con l'espressione di indici di infiammazione locale (TNF $\alpha$ , IL-18, IL-1 $\beta$ ) e sistemica (VES). Inoltre l'iniezione di IL-32 a livello articolare comporta la stimolazione del processo infiammatorio cellulare e la deplezione del pavimento cartilagineo, probabilmente grazie anche all'induzione della prostaglandina E (PGE-2), fattore capace di esercitare un'azione distruttiva a livello della cartilagine e del tessuto osseo. Quindi, IL-32 associata

anche a TNF- $\alpha$  e IL-18, potrebbe avere un ruolo nella patogenesi dell'artrite reumatoide e potrebbe essere un nuovo target terapeutico nelle malattie autoimmuni.

Il TNF- $\alpha$  è una citochina proinfiammatoria che gioca un ruolo fondamentale nello sviluppo della BPCO e di altre malattie croniche. Infatti, il TNF- $\alpha$  svolge un'importante azione regolatoria nei confronti delle cellule immunitarie (aumenta l'attività citotossica dei leucociti e la funzione delle cellule natural killer), inoltre promuove l'apoptosi e la sintesi delle proteine di fase acuta. Il TNF- $\alpha$  viene sintetizzato da numerose cellule: macrofagi, linfociti B e T, mastociti, cardiomiociti, lipociti e fibroblasti [112]. Il gene che codifica per TNF- $\alpha$  è localizzato sul cromosoma 6p21.3, è lungo circa 3kb, è organizzato in quattro esoni ed è caratterizzato da numerosi polimorfismi [33]. Il TNF- $\alpha$ , alla fine del processo di sintesi, contiene 212 amminoacidi ed è localizzato a livello transmembrana; successivamente subisce un taglio proteolitico da parte della metalloproteasi TACE (Tumor Necrosis Factor Alpha Converting Enzyme), diventando in questo modo una citochina diffusibile. Da un punto di vista strutturale si caratterizza per la presenza di due foglietti  $\beta$  antiparalleli e di due filamenti  $\beta$  antiparalleli che formano la così detta  $\beta$ -struttura "jelli-roll". Il TNF- $\alpha$  si lega a due recettori: il TNF-R1 (TNF receptor type1) e il TNF-R2 (TNF receptor type2) localizzati rispettivamente a livello tissutale e sulle cellule del sistema immunitario [113]. Il legame fra il TNF- $\alpha$  e il rispettivo recettore è responsabile di un cambiamento conformazionale del recettore stesso che permette l'attivazione della cascata citoplasmatica delle MAP-kinasi che, a sua volta, fosforilano la proteina I $\kappa$ B $\alpha$ , normalmente legata al fattore nucleare NF- $\kappa$ B. L'I $\kappa$ B $\alpha$ , in seguito alla fosforilazione, viene degradato e quindi l'NF- $\kappa$ B può migrare nel nucleo e promuovere la trascrizione di elementi infiammatori, proliferativi e antiapoptotici.

Secondo uno studio eseguito da Küçükaycan, il polimorfismo del gene TNF- $\alpha$  +489G/A è strettamente associato con lo sviluppo della BPCO in soggetti di razza caucasica [114]. Questa osservazione evidenzia che il TNF- $\alpha$ , espresso da tale polimorfismo, presenta un'importante attività proinfiammatoria responsabile della suscettibilità alla malattia nei soggetti portatori. Recenti osservazioni indicano che l'espressione di TNF- $\alpha$  possa essere indotta da IL-32 e che a sua volta TNF- $\alpha$  possa indurre l'espressione di IL-32 promuovendo così un meccanismo di autoamplificazione della risposta infiammatoria [110].

Quindi sia l'IL-32 che il TNF- $\alpha$  rivestono un ruolo fondamentale nello sviluppo di malattie infiammatorie croniche, quale la BPCO, in quando stimolano il processo infiammatorio sia a livello locale che a livello sistemico, il quale si perpetua nel tempo grazie a meccanismi di autoamplificazione della risposta immune.

## SCOPO DELLA TESI

La BPCO è una malattia infiammatoria cronica del polmone caratterizzata da una riduzione del flusso aereo espiratorio non completamente reversibile. Nei pazienti con BPCO la risposta infiammatoria è costituita principalmente da macrofagi, neutrofilii e linfociti T CD8+ e si associa ad alterazioni strutturali che coinvolgono tutto l'albero tracheobronchiale fino al parenchima polmonare. Quindi, nella patogenesi della BPCO la risposta immunitaria gioca un ruolo chiave e sembra essere responsabile, in larga parte, del danno parenchimale. L'attivazione flogistica permane nel tempo, conducendo, infatti, alla distruzione e al rimodellamento tissutale, tipici degli stadi più avanzati di malattia. La risposta immune tende inoltre a svincolarsi dai fattori irritanti inalati e a persistere anche quando i fattori di rischio o i fattori causali vengono rimossi. I meccanismi attraverso i quali è sostenuta la perpetuazione della risposta infiammatoria non sono completamente noti e recenti evidenze suggeriscono la possibilità che, nella patogenesi di BPCO, l'autoimmunità giochi un ruolo rilevante.

Recentemente è stata scoperta una nuova citochina denominata IL-32, prodotta dai linfociti T, dalle cellule natural killers, dalle cellule epiteliali polmonari e dai monociti. IL-32 possiede importanti proprietà proinfiammatorie, infatti è in grado di indurre l'espressione del TNF- $\alpha$  attraverso l'attivazione di fattori di trascrizione comuni ad altre citochine in grado di attivare la flogosi. Inoltre, recenti studi dimostrano che IL-32 potrebbe rivestire un ruolo importante in alcune malattie infiammatorie croniche caratterizzate da una componente patogenetica acquisita autoimmune, come l'artrite reumatoide ed il Morbo di Crohn.

L'espressione di IL-32 ed il suo possibile ruolo nella patogenesi della BPCO non sono mai stati indagati. Abbiamo quindi ritenuto particolarmente interessante svolgere questo studio al fine di quantificare l'espressione di IL-32 nel tessuto polmonare periferico di pazienti fumatori con BPCO a diversi stadi di gravità e di confrontarla con l'espressione di IL-32 presente in fumatori con funzionalità respiratoria nella norma ed in soggetti di controllo non fumatori. L'analisi morfometrica è stata condotta per valutare la produzione di IL-32 e di TNF- $\alpha$  nei macrofagi alveolari, nelle pareti alveolari, nei bronchioli e nelle arteriole polmonari e l'espressione di IL-32 è stata correlata alla risposta infiammatoria cellulare e ai parametri clinico-funzionali caratteristici della malattia. Al fine poi di indagare il ruolo della risposta immunitaria nei pazienti affetti da BPCO con deficit di  $\alpha$ 1-antitripsina (AAT), in cui un meccanismo patogenetico noto importante è costituito dallo squilibrio tra proteasi e antiproteasi polmonari, abbiamo quantificato l'espressione di IL-32 nel parenchima polmonare di pazienti con BPCO e deficit di AAT e con BPCO e livelli normali di questa antiproteasi, confrontando quindi questi risultati con quelli ottenuti da soggetti fumatori e non fumatori con funzionalità polmonare nella norma. Inoltre per studiare l'attivazione dei linfociti e la loro organizzazione in follicoli linfoidi, abbiamo quantificato il numero e la distribuzione dei follicoli linfoidi (CD20+)

nei polmoni nativi di soggetti sottoposti a trapianto polmonare per enfisema in stadio avanzato con deficit di AAT e con livelli normali di AAT.

Infine abbiamo quantificato l'espressione di IL-32 nelle cellule dell'espettorato indotto di pazienti affetti da BPCO e l'abbiamo confrontata con quella presente in soggetti fumatori e non fumatori con funzionalità polmonare nella norma, al fine di estendere i dati ottenuti dallo studio sul parenchima polmonare e confrontarli con quelli ottenuti dall'analisi di IL-32 a livello delle cellule delle vie aeree centrali.

# 1. L'ESPRESSIONE DI IL-32 E TNF- $\alpha$ NEL PARENCHIMA POLMONARE DEI PAZIENTI AFFETTI DA BPCO

## MATERIALI E METODI

### CARATTERISTICHE DEI SOGGETTI

Ai fini del nostro studio sono stati selezionati 60 pazienti sottoposti ad intervento chirurgico di trapianto polmonare (monolaterale o bilaterale), di riduzione del volume polmonare (LVRS, Lung Volume Reduction Surgery) in seguito a grave enfisema, oppure di resezione polmonare, per la presenza di un nodulo solitario periferico.

La diagnosi di broncoostruzione è stata posta sulla base del riscontro di un valore dell'indice di Tiffenau, ovvero del rapporto tra il volume d'aria emesso nel primo secondo in un'espiazione forzata e la capacità vitale forzata (VEMS/CVF), minore del 70% in valore assoluto. Tutti i soggetti inclusi nello studio presentavano una reversibilità del VEMS, rispetto al valore basale, inferiore al 12% dopo inalazione di 400  $\mu$ g di un  $\beta$ 2-agonista (salbutamolo).

I soggetti sono stati quindi suddivisi in tre gruppi: il primo gruppo comprendeva 40 fumatori con BPCO (stadio GOLD I, II, III e IV); il secondo gruppo includeva 11 soggetti fumatori, privi di sintomi caratteristici di BPCO e con funzionalità respiratoria nella norma (controlli fumatori); infine il terzo gruppo era costituito da 9 soggetti non fumatori, anch'essi privi di sintomi caratteristici di BPCO e con funzionalità respiratoria nella norma (controlli non fumatori). Durante il mese precedente lo studio, nessuno dei pazienti con BPCO aveva avuto riacutizzazioni, definite come "un incremento della dispnea associato ad un cambiamento nella qualità e/o nella quantità dell'espettorato, tale da richiedere il ricorso al medico o l'ospedalizzazione". Inoltre, nessuno dei soggetti inclusi nello studio, aveva contratto infezioni acute del tratto respiratorio superiore nel mese precedente lo studio. I pazienti affetti da BPCO lieve e moderata (stadio GOLD I e II; VEMS/CVF < 70% e VEMS  $\geq$  50% del teorico) ed i soggetti appartenenti ai gruppi di controllo fumatori e non fumatori non avevano assunto alcuna terapia corticosteroidica (inalatoria e/o sistemica) o antibiotica, durante il mese precedente l'intervento chirurgico né avevano ricevuto broncodilatatori entro le 48 ore precedenti. Tutti i pazienti con BPCO grave invece avevano ricevuto terapia inalatoria con anticolinergici e/o  $\beta$ 2-agonisti e dieci di questi soggetti erano stati trattati con steroidi orali.

Tutti i soggetti erano risultati negativi ai test cutanei ad estratti allergogeni comuni (prick-test), escludendo la presenza di atopica, e tutti avevano un'anamnesi negativa per storia di asma o riniti allergiche.

Lo studio è stato eseguito nel rispetto delle norme stabilite dalla Dichiarazione di Helsinki ed ogni soggetto incluso nello studio ha rilasciato il suo consenso informato.

## **TEST DI FUNZIONALITÀ RESPIRATORIA**

Le prove di funzionalità respiratoria sono state eseguite avvalendosi di uno spirometro a campana collegato ad un computer, secondo tecniche standard. Sono stati calcolati i valori del volume espiratorio massimo al primo secondo di un'espiazione forzata (VEMS), della capacità vitale (CV), della capacità vitale forzata (CVF), del volume residuo (VR) e della capacità polmonare totale (TLC) ed i risultati sono stati espressi come percentuale del valore teorico, utilizzando i valori predetti normali della Comunità Europea du Carbon e de l'Acier (CECA) [37]. Per valutare la reversibilità della limitazione del flusso espiratorio, nei soggetti che hanno mostrato broncoostruzione, sono state ripetute le misure spirometriche, 15-20 minuti dopo inalazione di 400 µg di salbutamolo (β<sub>2</sub>-agonista a breve durata d'azione). Nei soggetti che hanno presentato normale funzionalità respiratoria, invece, è stato eseguito un test di provocazione bronchiale con metacolina per escludere la presenza di asma bronchiale. Tutti i soggetti hanno mostrato una reattività bronchiale nel range della normalità (PD<sub>20</sub> VEMS > 1,44 mg metacolina).

La capacità di diffusione del monossido di carbonio (DLco) è stata misurata avvalendosi della tecnica del singolo respiro. Il valore reale della DLco è stato corretto in base ai valori di emoglobina e monossido di carbonio, ed è stato espresso come percentuale del valore predetto, usando i dati di riferimento rilevati da Cotes [115].

## **IMMUNOISTOCHEMICA E ANALISI MORFOMETRICA**

I campioni di tessuto polmonare prelevati dai 19 pazienti sottoposti a trapianto polmonare per BPCO molto grave, sono stati conservati in condizioni di ischemia fredda, per 60 e 120 minuti rispettivamente in caso di trapianto monolaterale e di trapianto bilaterale. I polmoni espantati sono stati fissati tramite perfusione delle vie aeree con formalina al 10% in tampone fosfato e processati per essere sezionati. I campioni sono stati prelevati da blocchi di tessuto polmonare selezionati per le loro caratteristiche di perfetta conservazione ed adeguata inflazione. In particolare, sono stati prelevati campioni di tessuto larghi e sottili, delle dimensioni di 30 x 25 mm, a livello delle aree subpleuriche dei segmenti apicali e lingulari dei lobi superiori e dei segmenti apicali e basali dei lobi inferiori del polmone sinistro. Inoltre, sono stati prelevati blocchi di tessuto dalle aree polmonari più centrali al fine di raccogliere campioni delle vie aeree segmentarie e dei vasi sanguigni. I campioni del polmone destro sono stati prelevati secondo gli stessi criteri, considerando la lingua come lobo medio.

Per quanto riguarda i pazienti sottoposti a intervento chirurgico di riduzione dei volumi polmonari per enfisema severo (LVRS) o di resezione polmonare per nodulo solitario periferico (in quest'ultimo caso evitando accuratamente le aree direttamente coinvolte dalla neoplasia) sono stati raccolti per ciascun soggetto da quattro a sei prelievi chirurgici. Indicativamente ogni campione raccolto doveva essere prelevato a circa 1 cm dal



marginie pleurico ed avere dimensioni approssimative di 10x10x5 mm. I campioni sono quindi stati immersi in una soluzione di formaldeide al 10% per 4 ore e successivamente in formaldeide al 4% per 16 ore, fino ad ottenere un tempo complessivo di fissaggio in formaldeide di 20 ore. La fase seguente, di disidratazione, è stata ottenuta mediante passaggi consecutivi del campione in alcool, a concentrazioni crescenti, per un tempo complessivo di almeno 4 ore. Infine la procedura di chiarificazione, tale da rendere il campione analizzabile al microscopio ottico e pronto all'inclusione in paraffina, è stata realizzata mediante immersione ripetuta del pezzo chirurgico in xilolo per un tempo complessivo di più di due ore. Successivamente, il campione è stato incluso in paraffina, per consentire il taglio e la conservazione del campione stesso.

Tutti i campioni sono stati quindi tagliati con il microtomo, ottenendo sezioni seriali di 5 µm di spessore, che sono state poi processate per l'analisi immunoistochimica di TNF-α e di IL-32. Infatti, le sezioni, deparaffinate ed idratate, sono state incubate con tampone citrato 5 mM a pH 6.0 in forno a microonde per 30 minuti al fine di esporre l'antigene. Si è proceduto quindi al trattamento delle sezioni con siero di maiale (X0901, Dako) e all'incubazione per 60 minuti con l'anticorpo primario anti TNF-α o anti IL-32 (un anticorpo policlonale prodotto in topo, dal Prof. Dinarello dell'Università del Colorado) alla concentrazione di 0,3 µg/mL.

Le sezioni sono state quindi incubate con il complesso streptavidinabiotina coniugato con fosfatasi alcalina (Strept AB complex/AP, K0391; Dako) per 30 minuti. L'immunoreattività è stata visualizzata mediante trattamento con diamino-benzidina (DAB, Dako). In fine le sezioni sono state contrastate con ematossilina di Mayer. Sono stati eseguiti dei controlli negativi per ligandi aspecifici eventualmente presenti nel sistema, trattando i campioni con lo stesso procedimento ma escludendo l'incubazione con l'anticorpo primario. Tali controlli non hanno rilevato alcun segnale, indicando quindi la buona efficacia del metodo immunoistochimico.

La rilevazione immunoistochimica di TNF-α e di IL-32 ha permesso di quantificare l'espressione di tale citochina nei macrofagi alveolari e nelle cellule delle pareti alveolari. L'analisi microscopica è stata condotta con microscopio Olympus BX41 connesso ad un sistema di registrazione video e collegato ad un sistema computerizzato di analisi dell'immagine (Image-Pro Plus 5; 2005 Media Cybernetics, Inc).

Per quantificare l'espressione di TNF-α e di IL-32 nei macrofagi alveolari, in ogni paziente sono stati valutati, per singolo vetrino, almeno 20 campi microscopici, non consecutivi, ad ingrandimento 630X, al fine di contare almeno 100 macrofagi alveolari. I macrofagi alveolari sono stati identificati su base morfologica come cellule mononucleate o con nucleo leggermente reniforme, generalmente di grosse dimensioni, con citoplasma ben rappresentato e talvolta con forma irregolare, presenti negli spazi alveolari e non adesi alle pareti alveolari. I risultati sono stati espressi sia come numero di macrofagi TNF-α<sup>+</sup> o IL-32<sup>+</sup> per

campo microscopico, sia come percentuale di macrofagi TNF- $\alpha$ <sup>+</sup> o IL-32<sup>+</sup> su macrofagi totali.

Per quantificare l'espressione di TNF- $\alpha$  e di IL-32 nelle cellule dei setti alveolari, in ogni paziente sono stati selezionati 10 campi microscopici ad ingrandimento 630X, non strettamente consecutivi, ma considerati alternativamente. Attraverso il programma di analisi dell'immagine è stata, quindi, misurata la lunghezza dei setti e i risultati sono stati espressi come numero di cellule positive per TNF- $\alpha$  o IL-32 per mm di parete alveolare. L'espressione di TNF- $\alpha$  e di IL-32 è stata inoltre valutata a livello dell'epitelio e del muscolo liscio delle vie aeree periferiche e nella tunica media delle arteriole polmonari. Questa valutazione è stata eseguita mediante l'assegnazione di uno score semiquantitativo pari a 0 quando l'espressione di TNF- $\alpha$  o di IL-32 era pressoché nulla, pari a 1 se l'espressione era debole, pari a 2 quando l'immunoistochimica rivelava una moderata espressione ed infine pari a 3 se l'espressione di TNF- $\alpha$  o di IL-32 era importante.

La microscopia confocale è stata utilizzata per confermare la coespressione di TNF- $\alpha$  /IL-32 e di IL-32/CD8 in sezioni seriali consecutive, usando anticorpi primari contro TNF- $\alpha$ , IL-32 e CD8 (diluiti 1: 30, 1:2000 e 1:50 in tampone fosfato con 5g/L di siero bovino e 1g/L di gelatina, rispettivamente) e anticorpi secondari (IgG di capra anti-topo) coniugati con ALEXA 488 e TEXAS rosso (SIGMA). Il procedimento è stato ripetuto due volte in una stessa sezione usando entrambi gli anticorpi. L'anticorpo primario e l'anticorpo secondario sono stati incubati per 1 ora a temperatura ambiente. I vetrini sono stati lasciati a 4°C e analizzati dopo 24 ore. L'immunofluorescenza è stata valutata con un microscopio confocale (Biorad 2100 Multiphoton; Hercules, CA), usando un laser argon a 488nm combinato con un laser elio-neon a 543 nm per eccitare i fluoro croma verdi (per il TNF- $\alpha$  o il CD8) e rossi (per IL-32), rispettivamente. La fluorescenza emessa è stata quindi rilevata, per il verde con un filtro da 505 a 530 nm e per il rosso con un filtro a 560 nm. Le immagini sono state analizzate con Adobe Photoshop 7.0.

Per approfondire le potenziali correlazioni tra TNF- $\alpha$  e IL-32, in un sottogruppo soggetti è stata effettuata l'analisi immunoistochimica delle cellule positive per fosfo-p38 MAPK e delle cellule infiammatorie infiltranti le pareti alveolari. La fosforilazione di p38 MAPK è stata rilevata grazie all'esposizione degli epitopi cellulari immunoreattivi mediante immersione delle sezioni in 5mM di tampone citrato a pH 6.0 ed incubazione in forno a microonde ad alta potenza per 10 minuti, al fine di esporre l'antigene. Tutti i passaggi seguenti sono stati eseguiti mediante trattamento delle sezioni con tampone TRIZMA maleato (pH 7.6). I siti aspecifici di legame sono stati bloccati usando siero di maiale in diluizione 1:20 (X0901; Dako, Glostrup, Denmark) ed è stato poi applicato un anticorpo primario monoclonale di coniglio anti-fosfo-p38 MAPK (diluizione 1:100; Cell Signaling Technology Inc., USA) mediante incubazione overnight a 4°C in camera umida. Le sezioni sono state poi trattate con il

complesso Avidina-Biotina (ABC-complex kit, Dako), sviluppate con Fast Red e contrastate con ematossilina di Mayer.

Per l'analisi immunohistochimica delle cellule infiammatorie, abbiamo usato anticorpi monoclonali prodotti in cavia, specifici per neutrofili (anti-elastasi M752, Dako Ltd, High Wycombe UK) e cellule CD8<sup>+</sup> (anti-CD8 M7103, Dako). Sono stati quindi valutati 10 campi microscopici non consecutivi e il risultato è stato espresso come numero di cellule positive per fosfo-p38 MAPK, di neutrofili e di cellule CD8<sup>+</sup> per mm di parete alveolare. Questi dati hanno permesso di studiare le eventuali correlazioni tra l'espressione di TNF- $\alpha$  e di IL-32 con l'entità dell'infiltrato infiammatorio e delle cellule positive per fosfo-p38.

Inoltre per valutare la specificità di IL-32 rispetto a patologie a patogenesi autoimmune, è stata valutata la sua espressione anche in patologie polmonari di differenti eziologie. In particolare sono stati esaminati campioni autoptici di due soggetti con asma bronchiale, un soggetto con polmonite virale da Cytomegalovirus e uno con polmonite funginea da *Aspergillus*. L'espressione di IL-32 è stata indagata inoltre in biopsie polmonari di due soggetti con polmonite interstiziale non specifica (NSIP) associata a collagenopatia e in un soggetto affetto da artrite reumatoide con coinvolgimento polmonare.

#### **ANALISI STATISTICA**

Tutti i casi sono stati codificati e le misurazioni sono state eseguite senza essere a conoscenza dei dati clinici e funzionali dei pazienti. I dati di ciascun gruppo sono stati espressi come media ed errore standard della media (SEM) per i dati parametrici o come mediana ed intervallo (range) per i dati non parametrici.

Per determinare le differenze tra i gruppi sono stati utilizzati i seguenti test per confronti multipli: l'analisi della varianza (ANOVA) e il t test di Student per i dati clinici e il test non parametrico di Kruskal Wallis per i dati istologici. Il test U di Mann-Whitney è stato applicato dopo il test di Kruskal Wallis, per valutare, a gruppi di due, i dati istologici. I coefficienti di correlazione tra i parametri morfologici ed i dati clinico-funzionali sono stati calcolati utilizzando il metodo Spearman's rank. Sono stati accettati come significativi valori di probabilità con  $p < 0.05$ .

## RISULTATI

### DATI CLINICI

Le caratteristiche dei soggetti esaminati in questo studio sono riportati in **Tabella 7**. I tre gruppi di pazienti presentavano un'età media simile e la storia di fumo non differiva significativamente tra i soggetti affetti da BPCO ed il gruppo di controllo dei fumatori. Come atteso, sulla base dei criteri di selezione, i pazienti con BPCO presentavano valori di VEMS (% del teorico) e dei rapporti VEMS/CVF (%) significativamente inferiori rispetto al gruppo di controllo dei fumatori e dei non fumatori.

Caratteristiche	BPCO (stadio GOLD I-IV)	Fumatori di controllo	Non Fumatori
Soggetti esaminati (n°)	31M : 9F	11M : 0F	2M : 7F
Età (anni)	60 ± 1	64 ± 2	52 ± 7
Storia di fumo (pack-years)	45 ± 5	47 ± 7	–
VEMS (% del teorico)	39 ± 4*	102 ± 3	108 ± 6
VEMS/CVF (%)	45 ± 3*	79 ± 2	82 ± 2
VR (% del teorico)	159 ± 13 <sup>§</sup>	91 ± 13	–
DLco (% del teorico)	46 ± 2 <sup>^</sup>	74 ± 5	–
PaO <sub>2</sub> (mmHg)	74 ± 3*	88 ± 2	80 ± 3
PaCO <sub>2</sub> (mmHg)	46 ± 2	37 ± 1	37 ± 2

**Tabella 7.** Caratteristiche cliniche dei soggetti.

I valori del volume residuo (VR) sono stati valutati solo in 41 soggetti (34 pazienti con BPCO e 7 Fumatori di controllo). La misurazione della DLco è stata eseguita solo in 33 soggetti (28 BPCO e 5 Fumatori di controllo).

I valori sono espressi come media ± errore standard.

\* Valore significativamente ridotto rispetto a quello dei Fumatori e Non Fumatori (p<0.05).

<sup>§</sup> Valore significativamente aumentato rispetto a quello dei Fumatori (p<0.05).

<sup>^</sup> Valore significativamente ridotto rispetto a quello dei Fumatori (p<0.05).

Il gruppo dei soggetti con BPCO comprendeva 21 pazienti in stadio GOLD IV, 7 in stadio GOLD III, 10 in stadio GOLD II e 2 pazienti in stadio GOLD I. I soggetti fumatori affetti da BPCO presentavano valori di PaO<sub>2</sub> significativamente inferiori rispetto ai controlli e valori di PaCO<sub>2</sub> significativamente superiori. I fumatori affetti da BPCO mostravano segni di iperinflazione alveolare (aumento dei valori di volume residuo) e una alterata capacità di diffusione alveolo-capillare del monossido di carbonio (riduzione della DLco) alle prove di funzionalità polmonare, rispetto al gruppo di controllo dei fumatori. La valutazione dei parametri spirometrici non è stata eseguita nel caso di un solo paziente sottoposto ad intervento chirurgico di trapianto polmonare per BPCO grave, in quanto tracheostomizzato. I pazienti con BPCO lieve/moderata e i soggetti fumatori e non fumatori con funzionalità respiratoria nella norma non hanno ricevuto alcuna terapia antinfiammatoria (ad esempio corticosteroidi per via orale o inalatoria) o antibiotica nel mese precedente l'intervento chirurgico e non sono stati sottoposti a terapia broncodilatatrice nelle 48 ore precedenti. Tutti i soggetti affetti da BPCO severa erano trattati con anticolinergici inalatori e/o β<sub>2</sub>-agonisti/corticosteroidi inalatori, inoltre 10 di questi pazienti assumevano corticosteroidi orali.

## **DATI IMMUNOISTOCHEMICI**

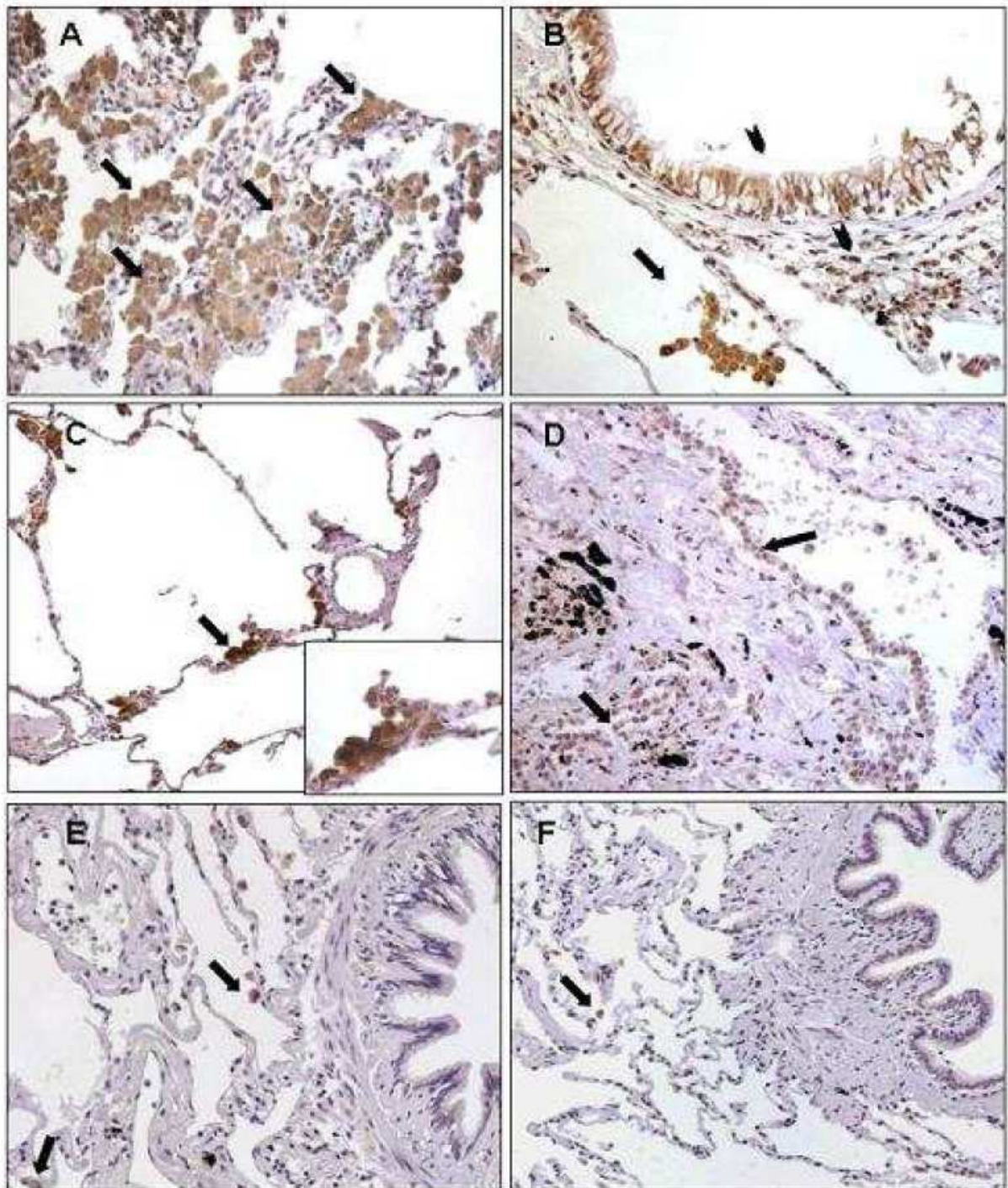
### **IL-32**

L'espressione di IL-32 in questo studio è stata osservata soprattutto nei macrofagi alveolari, nelle pareti alveolari e nell'epitelio delle vie aeree (**Figura 8a-c**). L'immunoreattività per IL-32 è stata rilevata soprattutto a livello citoplasmatico, mostrando una positività sia diffusa che granulare. Inoltre, nei soggetti con BPCO si è evidenziata un'intensa colorazione immunoistochimica a livello del nucleo cellulare, dimostrando così la presenza di IL-32 nel nucleo di numerose cellule, incluse le cellule alveolari cuboidali (**Figura 8c,d**).

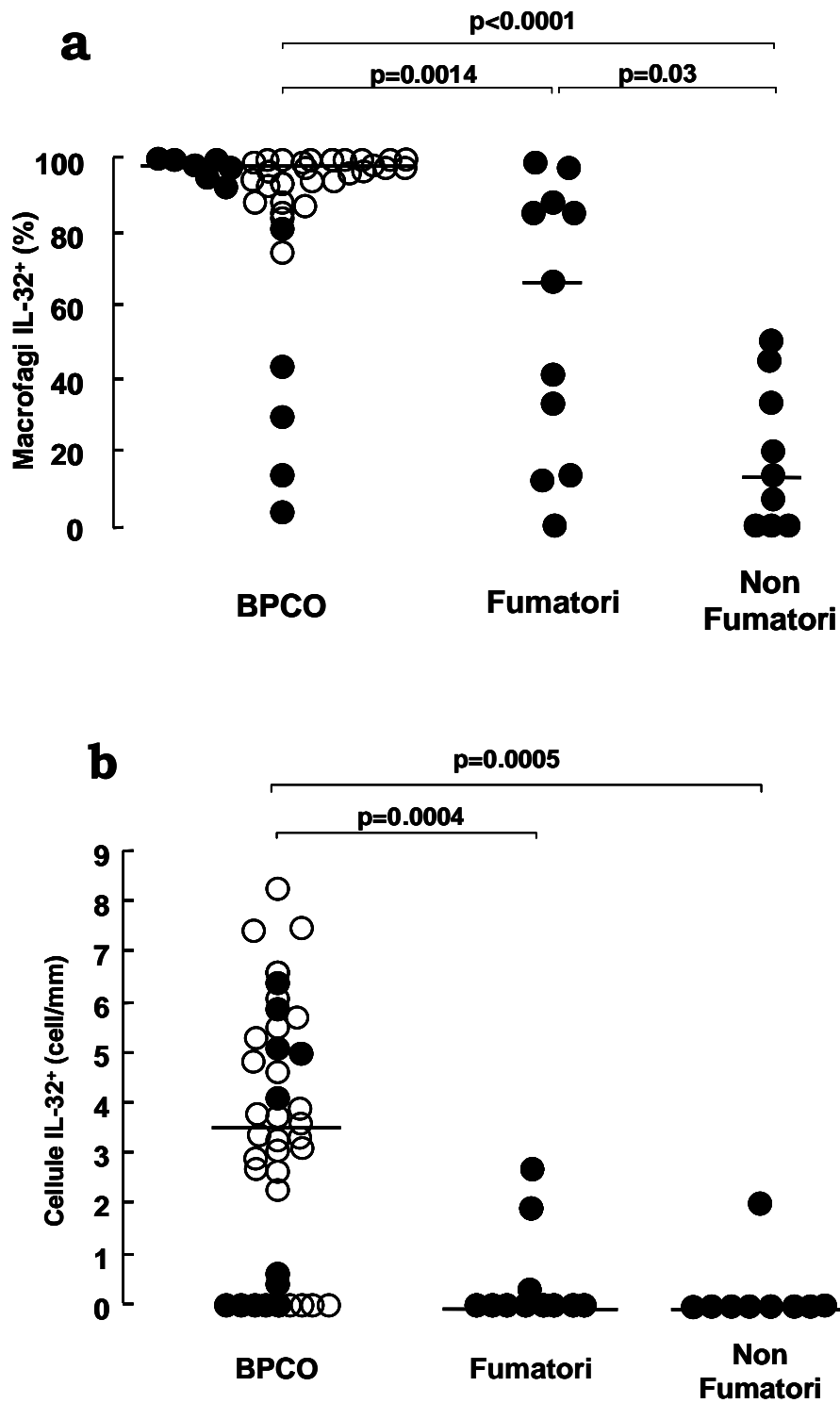
La quantificazione dell'espressione di IL-32 a livello dei macrofagi alveolari ha mostrato una differenza significativa tra i gruppi di soggetti esaminati ( $p < 0.0001$ ). I pazienti con BPCO infatti presentavano una percentuale di macrofagi alveolari positivi per IL-32 aumentata rispetto ai controlli fumatori ( $p = 0.001$ ) e non fumatori ( $p < 0.0001$ ) (**Figura 9a** e **Figura 8a,e**). Inoltre, l'espressione di IL-32 a livello dei macrofagi alveolari era aumentata nei soggetti fumatori con funzionalità polmonare nella norma rispetto ai non fumatori ( $p = 0.03$ , **Figura 9a**). Infine, quando i soggetti con BPCO sono stati suddivisi in base allo stadio di gravità GOLD, si è osservata un'elevata espressione di IL-32 nei pazienti affetti da BPCO grave, mentre i soggetti con BPCO lieve/moderata hanno mostrato livelli bassi di immunoreattività; tuttavia, la differenza tra i soggetti con BPCO grave e quelli con BPCO lieve/moderata non ha raggiunto la significatività statistica ( $p = 0.07$ ).

Nelle pareti alveolari l'espressione di IL-32 era significativamente aumentata nei pazienti affetti da BPCO rispetto sia al gruppo dei controlli fumatori che a quello dei non fumatori

(rispettivamente  $p=0.0004$  e  $p=0.0005$ ) (**Figura 9b**). Nella stessa sede l'espressione di IL-32 non era significativamente diversa nei soggetti di controllo fumatori e non fumatori (**Figura 9b**). Inoltre, la quantificazione di IL-32 a livello dell'epitelio bronchiolare ha dimostrato un aumento di questa citochina nei pazienti con BPCO rispetto ai controlli fumatori ( $p=0.004$ ) e non fumatori ( $p=0.0009$ ) (**Tabella 8 e Figura 8b**).



**Figura 8.** Un'elevata positività citoplasmatica è stata rilevata nei pazienti con BPCO a livello dei macrofagi alveolari (a) e delle cellule epiteliali bronchiali (b). Un'importante reattività è stata riscontrata sia a livello nucleare che citoplasmatico nelle pareti alveolari (ben evidenti nel riquadro a maggiore ingrandimento, 400X) (c). Una positività citoplasmatica è stata rilevata anche a livello delle cellule alveolari cuboidali (d). Esempio di immunistochimica per IL-32 in un soggetto non fumatore: si evidenzia solo una debole positività nei macrofagi (e). Controllo negativo trattato omettendo l'anticorpo primario (f). Ingrandimento originale 200X.



**Figura 9.**

Quantificazione di IL-32 nei macrofagi alveolari e nelle cellule della parete alveolare

Conte individuali per la percentuale di macrofagi alveolari IL-32+ (a) e per il numero di cellule della parete alveolare IL-32+ (b).

I cerchi pieni (●) rappresentano i soggetti con BPCO di grado lieve/moderato, mentre i cerchi vuoti (○) rappresentano i soggetti con BPCO di grado grave/molto grave. Le barre orizzontali rappresentano i valori mediani. I valori della p nelle figure rappresentano l'analisi statistica con il test U di Mann Whitney. Kruskal Wallis test  $p < 0.0001$ .



Nessuna differenza significativa invece è stata osservata nell'espressione di IL-32 a livello delle arteriole polmonari e del muscolo liscio delle vie aeree periferiche nei tre gruppi di soggetti esaminati (**Tabella 8**). Inoltre, l'analisi immunohistochimica non ha evidenziato alcuna differenza nell'espressione di IL-32 tra ex-fumatori e fumatori correnti né a livello alveolare, né bronchiale e neppure a livello delle arteriole polmonari.

	<b>BPCO</b>	<b>Fumatori</b>	<b>Non Fumatori</b>	<b>p</b>
Score per IL-32, epitelio bronchiolare (%)	57 (0-100)	0 (0-58)	0 (0-10)	p<0.02*
Score per IL-32, muscolo liscio bronchiolare (%)	0 (0-66)	0 (0-16)	0 (0-0)	n.s.
Score per IL-32, arteriole polmonari (%)	0 (0-57)	0 (0-0)	0 (0-0)	n.s.

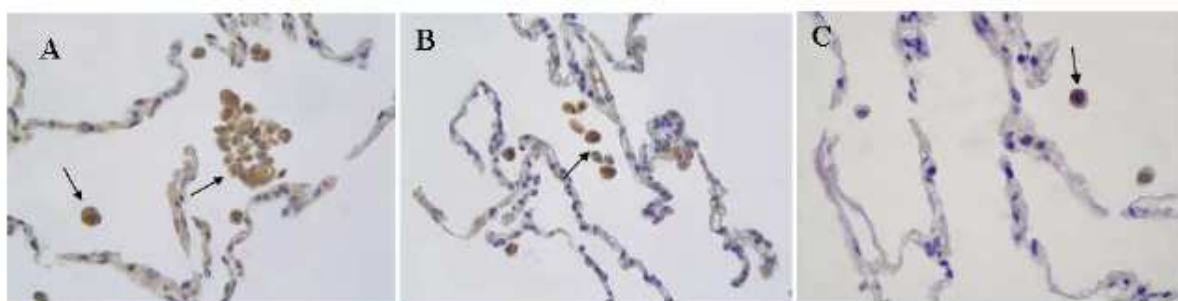
**Tabella 8.** Valutazione semiquantitativa dell'espressione di IL-32 nelle vie aeree periferiche e nelle arteriole polmonari.

I valori sono espressi come: mediana (intervallo).

\* Valore significativamente aumentato nei soggetti con BPCO rispetto ai Fumatori e ai Non Fumatori.

### **TNF- $\alpha$**

Quando sono state analizzate sezioni seriali di tessuto polmonare dello stesso soggetto, l'immunoreattività per TNF- $\alpha$  è risultata concordare con quella per IL-32. Infatti, analogamente ad IL-32, anche l'espressione di TNF- $\alpha$  nei macrofagi alveolari è stata osservata soprattutto a livello citoplasmatico (**Figura 10 e 11**).



**Figura 10.** Fotografia al microscopio ottico di sezioni di campioni chirurgici, che mostrano il parenchima polmonare di: (A) soggetto fumatore con BPCO grave; (B) controllo fumatore; (C) controllo non fumatore. Colorazione immunohistochimica con anticorpo monoclonale diretto contro TNF- $\alpha$ . Ingrandimento 600X.

La freccia indica i macrofagi alveolari positivi alla colorazione specifica per TNF- $\alpha$ .

Tra i gruppi di soggetti esaminati è stata osservata una differenza significativa nella percentuale di macrofagi positivi per TNF-a ( $p < 0.0001$ ). In particolare, i macrofagi TNF-a<sup>+</sup> erano aumentati sia nei fumatori affetti da BPCO che in quelli con funzionalità respiratoria nella norma rispetto ai soggetti non fumatori (rispettivamente  $p < 0.0001$  e  $p = 0.0005$  Figura 12a). Nessuna differenza significativa invece è emersa nella percentuale di macrofagi TNF-a<sup>+</sup> tra i soggetti con BPCO e i controlli fumatori (**Figura 12a**). L'espressione di TNF-a nelle pareti alveolari è risultata aumentata nei soggetti con BPCO rispetto ai non fumatori ( $p = 0.018$ ), mentre nessuna differenza è emersa tra i fumatori affetti da BPCO e i soggetti fumatori con funzionalità polmonare nella norma (**Figura 12b**).

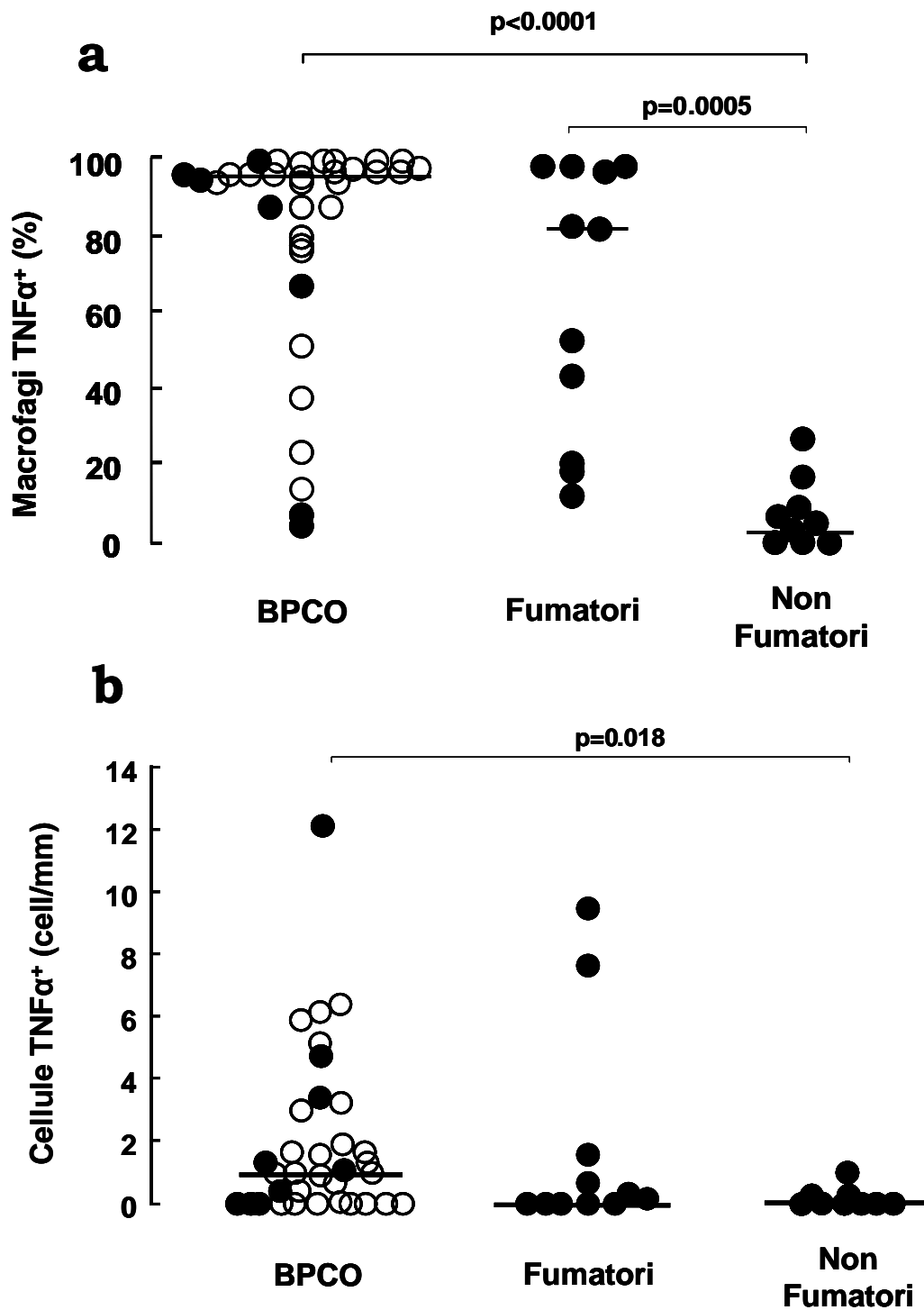
L'immunoreattività per TNF-a è risultata simile a livello delle vie aeree periferiche e delle arteriole polmonari nei tre gruppi di pazienti esaminati (**Tabella 9**). Inoltre non è stata evidenziata alcuna differenza significativa tra ex-fumatori fumatori correnti.

	<b>BPCO</b>	<b>Fumatori</b>	<b>Non Fumatori</b>	<b>p</b>
Score per TNF-a, epitelio bronchiolare (%)	0 (0-100)	0 (0-100)	0 (0-16)	n.s.
Score per TNF-a, muscolo liscio bronchiolare (%)	0 (0-25)	0 (0-33)	0 (0-0)	n.s.
Score per TNF-a, arteriole polmonari (%)	0 (0-0)	0 (0-75)	0 (0-0)	n.s.

**Tabella 9.** Valutazione semiquantitativa dell'espressione di TNF-a nelle vie aeree periferiche e nelle arteriole polmonari.

I valori sono espressi come: mediana (intervallo).

\* Valore significativamente aumentato nei soggetti con BPCO rispetto ai Fumatori e ai Non Fumatori.

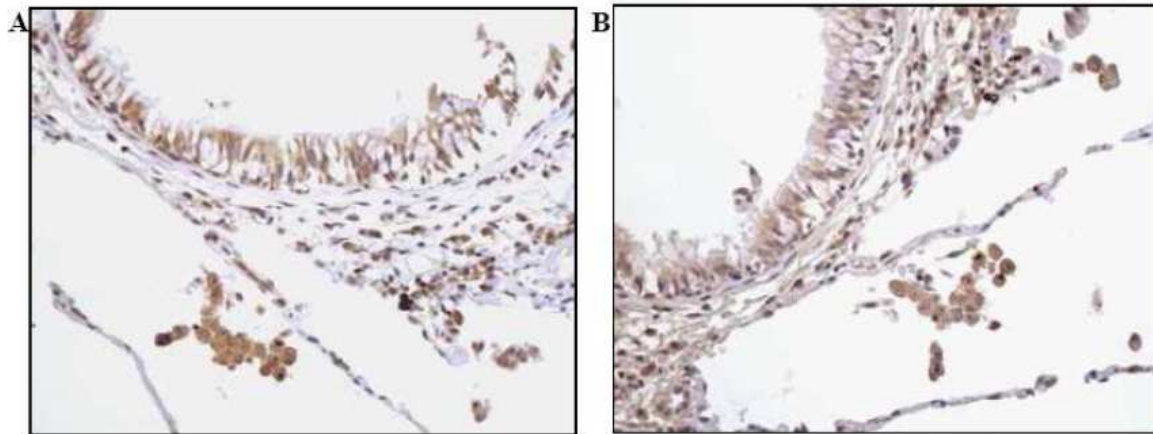


**Figura 12.**

Quantificazione di TNF- $\alpha$  nei macrofagi alveolari e nelle cellule della parete alveolare.

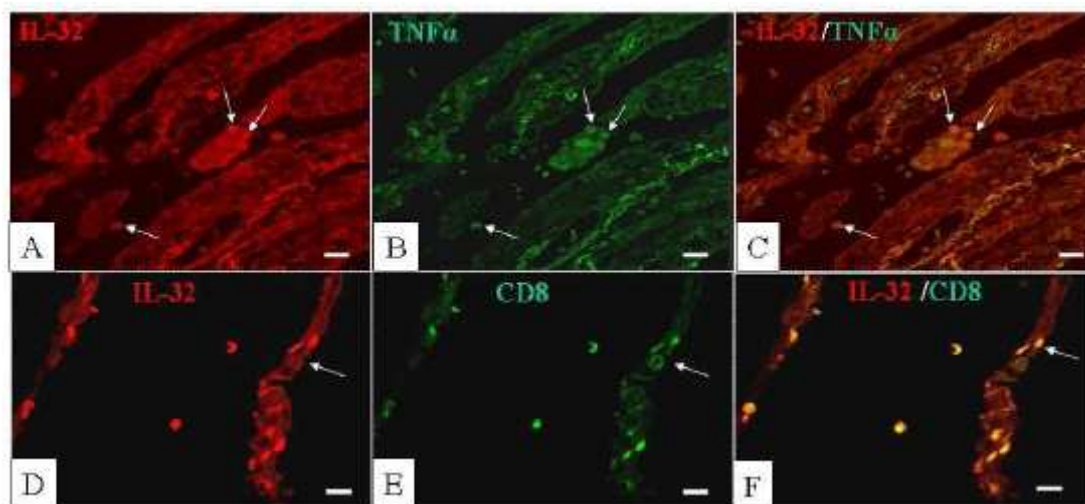
Conte individuali per la percentuale di macrofagi alveolari TNF- $\alpha$ <sup>+</sup> (a) e per il numero di cellule della parete alveolare TNF- $\alpha$ <sup>+</sup> (b) nei fumatori con BPCO, nei soggetti fumatori di controllo e nei non fumatori. I cerchi pieni (●) rappresentano i soggetti con BPCO di grado lieve/moderato, mentre i cerchi vuoti (○) rappresentano i soggetti con BPCO di grado grave/molto grave. Le barre orizzontali rappresentano i valori mediani. I valori della p nelle figure rappresentano l'analisi statistica con il test U di Mann Whitney. Kruskal Wallis test  $p<0.0001$  (a) e  $p=0.05$  (b).

L'analisi immunohistochimica effettuata su sezioni seriali sequenziali di campioni appartenenti a soggetti fumatori con BPCO ha permesso di evidenziare una stretta correlazione tra l'espressione di TNF- $\alpha$  e il-32 (**Figura 13**).



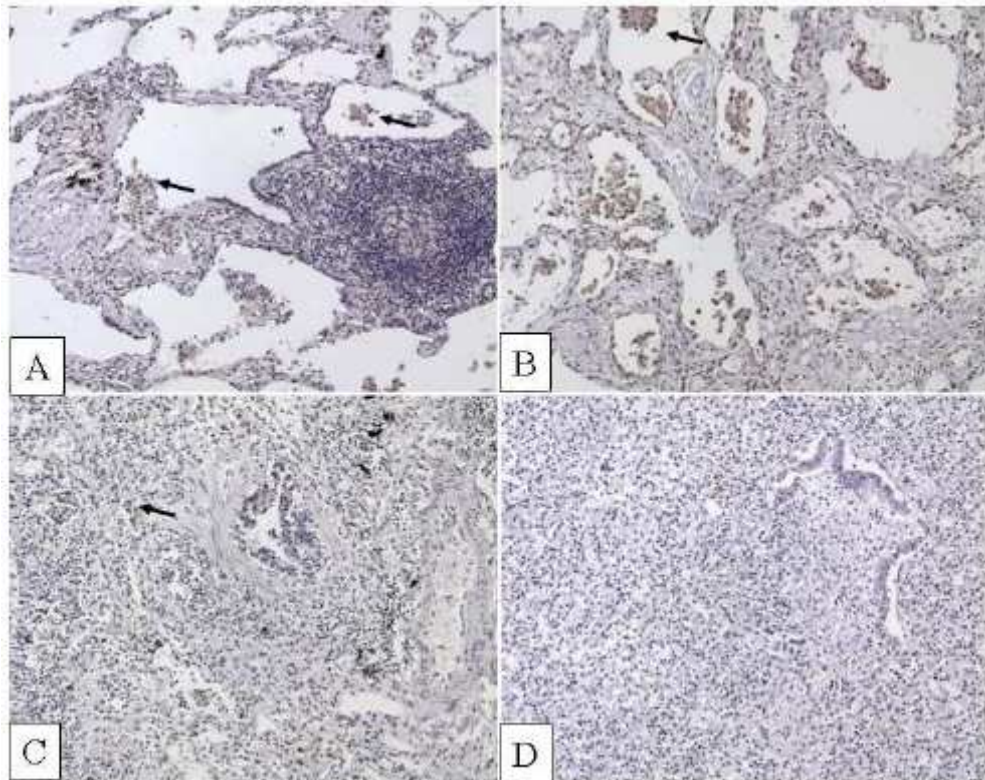
**Figura 13.** Immunohistochimica per sezioni seriali sequenziali di IL-32 (A) e TNF- $\alpha$  negli stadi avanzati di BPCO: le stesse cellule sono positive per entrambi gli anticorpi. Ingrandimento originale 200X.

Questi risultati sono stati ulteriormente confermati mediante microscopia confocale che ha permesso di osservare la co-espressione di IL-32 e TNF- $\alpha$  nei macrofagi e la colocalizzazione nelle pareti alveolari dell'espressione di IL-32 e di CD8 (**Figura 14**).



**Figura 14.** Immunofluorescenza che dimostra la co-espressione di IL-32 (A, in rosso) e TNF- $\alpha$  (B, in verde) negli stessi macrofagi. C) sovrapposizione delle due immagini precedenti. L'immunofluorescenza dimostra anche la presenza di IL-32 (D, in rosso) sulle cellule CD8<sup>+</sup> (E, in verde). (F) sovrapposizione delle due immagini precedenti. Freccetta: cellula CD8<sup>+</sup> che esprime IL-32.

Quando l'espressione di IL-32 è stata valutata nei campioni provenienti da altri disordini infiammatori del polmone, è stato osservato un forte aumento dell'immunoreattività nei soggetti con artrite reumatoide e con polmonite interstiziale non specifica (NSIP) associata a collagenopatia, in particolare a livello dei macrofagi alveolari e delle pareti alveolari. Al contrario una bassa espressione di IL-32, vicina alla negatività, è stata osservata nei soggetti deceduti per attacco grave d'asma bronchiale e per polmonite virale (**Figura 15**).



**Figura 15.** Valutazione dell'espressione di IL-32 in altre patologie infiammatorie del polmone. E'osservabile un importante immunoreattività in soggetti con (A) interessamento polmonare di artrite reumatoide e (B) polmonite interstiziale non specifica associata a collagenopatia. Una debole immunoreattività, limitata a qualche macrofago alveolare, è invece osservabile nel soggetto con asma bronchiale (C), mentre nel soggetto con polmonite virale non si è rilevato alcun segnale (D). Le frecce indicano i macrofagi IL-32<sup>+</sup>.

### **Cellule Infiammatorie e Fosforilazione di p38 MAPK**

Il numero di cellule CD8<sup>+</sup> a livello delle pareti alveolari era significativamente aumentato nei fumatori con BPCO rispetto ai fumatori con funzionalità respiratoria nella norma ( $p=0.002$ ) e ai non fumatori ( $p=0.0002$ ) (**Tabella 10**). Nessuna differenza è stata invece osservata nel numero di neutrofili infiltranti le pareti alveolari nei tre gruppi di soggetti coinvolti nello studio.

Inoltre, i pazienti con BPCO hanno mostrato un numero di macrofagi alveolari fosfo-p38<sup>+</sup> e di cellule fosfo-p38<sup>+</sup> nelle pareti alveolari maggiore rispetto al gruppo dei controlli fumatori ( $p<0.002$ ) e non fumatori ( $p<0.005$ ) (**Tabella 10**).

Infine il numero di cellule CD8<sup>+</sup>, di macrofagi alveolari fosfo-p38<sup>+</sup> e di cellule fosfo-p38<sup>+</sup> presenti nelle pareti alveolari è risultato simile nei fumatori con funzionalità respiratoria nella norma e nei non fumatori.

	<b>BPCO</b>	<b>Fumatori</b>	<b>Non Fumatori</b>	<b>p</b>
Linfociti CD8 <sup>+</sup> (cellule/mm)	7 (2-16)	3 (1-7)	3 (1-4)	<0.005*
Neutrofili (cellule/mm)	4 (1-10)	8 (4-13)	10 (0-14)	n.s.
Macrofagi p38MAPK <sup>+</sup> (%)	33 (0-70)	3 (0-8.4)	4 (1-6)	<0.05 *
Cellule p38 MAPK <sup>+</sup> (cellule/mm)	6 (0-17)	0 (0-0.2)	0 (0-0)	<0.05*

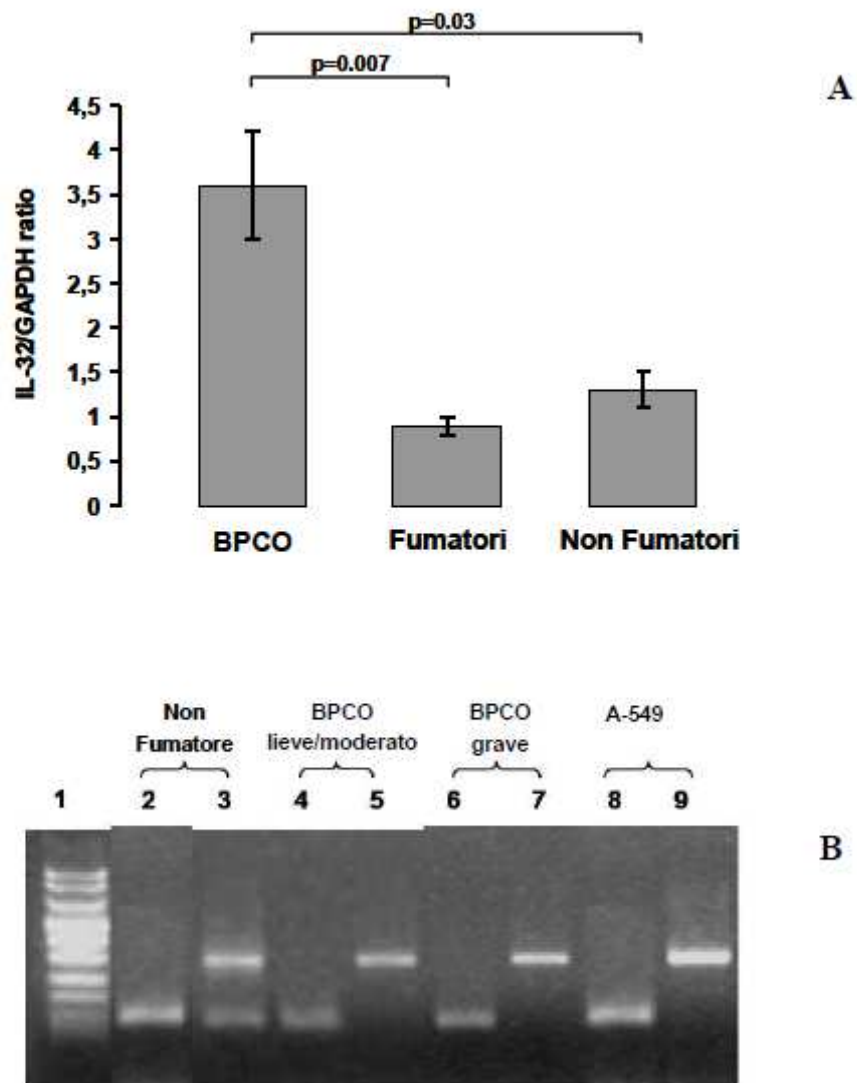
**Tabella 10.** Quantificazione delle cellule infiammatorie e di p38 MAPK nel parenchima polmonare.

I valori sono espressi come: mediana (intervallo).

\* Valori significativamente aumentati nei soggetti con BPCO rispetto ai Fumatori e ai Non Fumatori.

## DATI MOLECOLARI

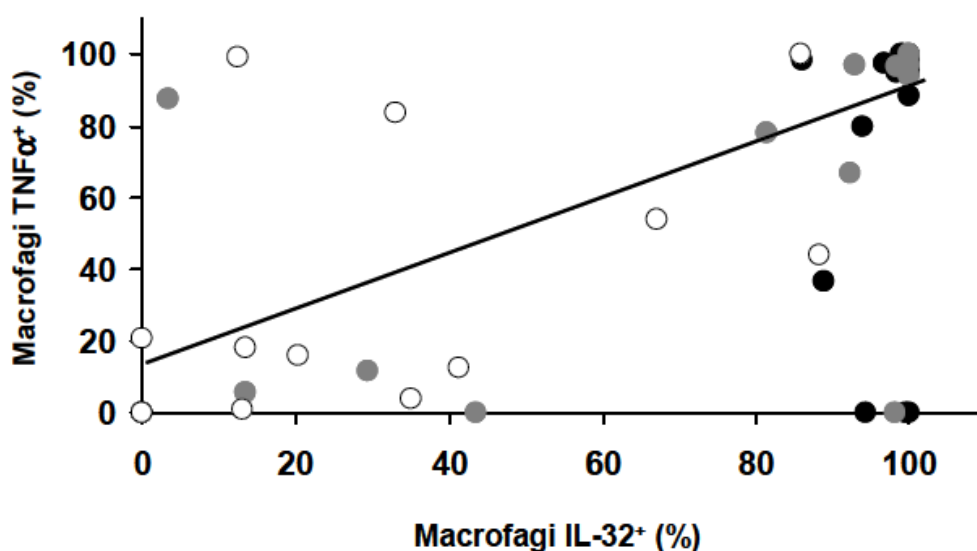
Le indagini immunohistochimiche sono state inoltre confermate dall'analisi molecolare dei livelli di mRNA per IL-32. I risultati hanno mostrato un aumento significativo dei livelli di mRNA per IL-32 nei soggetti con BPCO rispetto sia ai controlli fumatori sia ai controlli non fumatori [rispettivamente: 4 volte ( $p=0.007$ ) e 2.8 volte ( $p=0.03$ )]. Nessuna differenza statistica si è riscontrata tra i due gruppi di controllo fumatori e non fumatori. L'mRNA per IL-32 era costituito per la maggior parte dall'isoforma non- $\alpha$  (isoforme  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$ ) (**Figura 16**).



**Figura 16.** (A) quantificazione dell'espressione dell'mRNA di IL-32 non- $\alpha$  ( $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$ ) in tre gruppi di pazienti (17 con BPCO, 7 controlli fumatori, 6 controlli non fumatori). (B) Risultati dell'immuno-elettroforesi su gel condotta per l'mRNA di IL-32 non- $\alpha$  ( $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$ ) ottenuto da pazienti con BPCO di grado lieve-moderato, BPCO di grado elevato e non fumatori.

## CORRELAZIONI

Quando tutti i soggetti inclusi in questo studio sono stati considerati come un unico gruppo, abbiamo osservato una correlazione positiva tra l'espressione di IL-32 a livello dei macrofagi alveolari e delle pareti alveolari ( $p < 0.0001$ ,  $r = 0.85$ ). Similmente, la percentuale dei macrofagi alveolari TNF- $\alpha^+$  era direttamente correlata al numero di cellule TNF- $\alpha^+$  nelle pareti alveolari ( $p < 0.0001$ ,  $r = 0.5$ ) (**Figura 17**).



**Figura 17.** Relazione tra la percentuale di macrofagi positivi per IL-32 e TNF- $\alpha$  in tutti i soggetti inclusi nello studio. I cerchi vuoti rappresentano il gruppo dei fumatori e quello di controllo non fumatori; i cerchi grigi rappresentano i pazienti affetti da BPCO di grado lieve/moderato, mentre i cerchi neri rappresentano i soggetti con BPCO grave o molto grave.

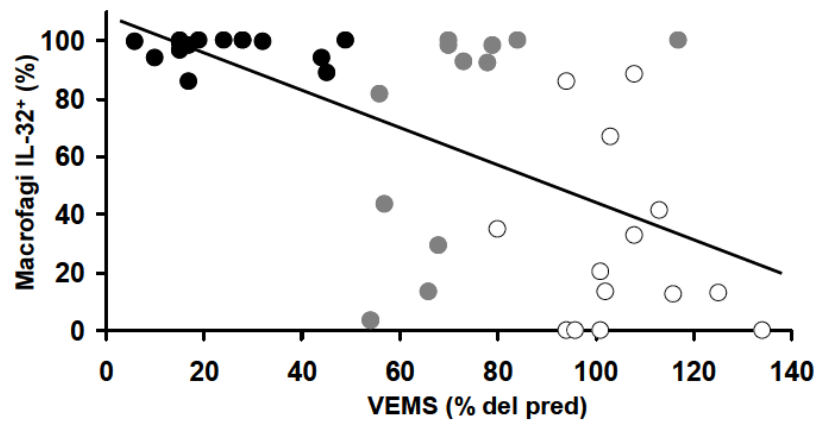
L'espressione di IL-32 sia nei macrofagi alveolari che nelle pareti alveolari era correlata positivamente con la percentuale di macrofagi alveolari TNF- $\alpha^+$  ( $p < 0.0001$ ,  $r = 0.7$  e  $p < 0.0001$ ,  $r = 0.6$  rispettivamente) e con il numero di cellule TNF- $\alpha^+$  nelle pareti alveolari ( $p < 0.0001$ ,  $r = 0.6$  e  $p = 0.0002$ ,  $r = 0.5$  rispettivamente).

Inoltre, è stato evidenziato un rapporto di correlazione diretta tra l'espressione di IL-32 a livello dei macrofagi e delle pareti alveolari ed il numero di cellule CD8 $^+$  presenti nelle pareti alveolari ( $p = 0.01$ ,  $r = 0.44$  e  $p = 0.04$ ,  $r = 0.34$  rispettivamente). Similmente, l'immunoreattività per IL-32 nei macrofagi e nelle pareti alveolari correlava positivamente sia con la percentuale dei macrofagi alveolari fosfo-p38 $^+$  (per entrambi  $p = 0.005$ ,  $r = 0.5$ ) sia con le cellule fosfo-p38 $^+$  nella parete alveolare (per entrambi  $p = 0.0008$ ,  $r = 0.6$ ).

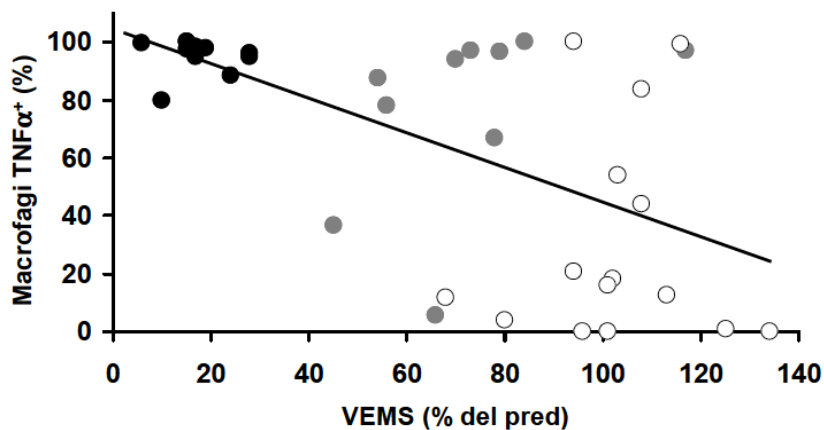
Infine, abbiamo analizzato la relazione tra l'espressione delle citochine oggetto di questo studio e la funzionalità polmonare. L'espressione di IL-32, sia nei macrofagi (**Figura 18**) che nelle pareti alveolari, era negativamente correlata ai valori del VEMS (% del teorico) (per entrambi  $p < 0.0001$ ,  $r = -0.5$ ) e del rapporto VEMS/CVF (%) (per entrambi  $p < 0.0001$ ,  $r = -0.5$ ) e positivamente correlata ai valori di PaCO $_2$  mmHg (per entrambi  $p < 0.05$ ,  $r = 0.3$ ). Inoltre, la percentuale di macrofagi TNF- $\alpha^+$  è risultata essere negativamente correlata con i valori del



VEMS (% del teorico) ( $p=0.0008$ ,  $r=-0.46$ ) (**Figura 19**), e del rapporto VEMS/CVF (%) ( $p<0.0001$ ,  $r=-0.57$ ) e positivamente correlata con i valori di PaCO<sub>2</sub> mmHg ( $p=0.004$ ,  $r=0.4$ ).



**Figura 18.** Correlazione tra i valori del VEMS (% del teorico) e la percentuale di macrofagi alveolari IL-32+. Si può osservare che la funzionalità respiratoria si riduce progressivamente all'aumentare della percentuale dei macrofagi alveolari positivi per IL-32 (correlazione di Spearman). I cerchi vuoti rappresentano il gruppo dei fumatori e quello di controllo non fumatori; i cerchi grigi rappresentano i pazienti affetti da BPCO di grado lieve/moderato, mentre i cerchi neri rappresentano i soggetti con BPCO grave o molto grave.



**Figura 19.** Correlazione tra i valori del VEMS (% del teorico) e la percentuale di macrofagi alveolari TNF- $\alpha$ +. Si può osservare che la funzionalità respiratoria si riduce progressivamente all'aumentare della percentuale dei macrofagi alveolari positivi per TNF- $\alpha$  (correlazione di Spearman). I cerchi vuoti rappresentano il gruppo dei fumatori e quello di controllo non fumatori; i cerchi grigi rappresentano i pazienti affetti da BPCO di grado lieve/moderato, mentre i cerchi neri rappresentano i soggetti con BPCO grave o molto grave.



## **2. L'ESPRESSIONE DI IL-32 NEL PARENCHIMA POLMONARE DEI PAZIENTI AFFETTI DA BPCO CON E SENZA DEFICIT DI ALFA 1 ANTITRIPSINA**

### **MATERIALI E METODI**

Al fine poi di indagare il ruolo della risposta immunitaria nei pazienti affetti da BPCO a patogenesi diversa in questa fase dello studio sono stati esaminati campioni di tessuto polmonare ottenuti da 42 pazienti sottoposti a trapianto polmonare o a riduzione dei volumi polmonari per enfisema grave o ad intervento di resezione polmonare per nodulo periferico solitario: 10 soggetti affetti da BPCO molto grave (GOLD IV) con deficit di AAT, 12 soggetti con BPCO molto grave e normali livelli di AAT (GOLD IV), 11 fumatori di controllo, asintomatici e con funzionalità respiratoria nella norma e 9 non fumatori di controllo, asintomatici e con funzionalità respiratoria nella norma.

I campioni chirurgici sono stati prelevati a livello del parenchima subpleurico, ad adeguata distanza dalle aree interessate dal tumore, fissati in formaldeide al 4% ed inclusi in paraffina. Sono state quindi ricavate sezioni di 5  $\mu$ m di spessore che sono state processate con tecniche di immunistochemical come descritto precedentemente (vedi pag. 44) per valutare l'espressione di IL-32. La rilevazione immunistochemical di IL-32 ha permesso di quantificare l'espressione di tali citochine nei macrofagi alveolari, nelle cellule dei setti alveolari e nei follicoli linfoidi del parenchima polmonare. La quantificazione dell'espressione di IL-32 nei macrofagi alveolari e nelle cellule dei setti alveolari è stata ottenuta mediante le metodiche precedentemente esposte (vedi pag. 44). L'espressione di IL-32 a livello dei follicoli linfoidi è stata quantificata contando il numero di follicoli linfoidi parenchimali positivi per IL-32, considerando come follicolo parenchimale un aggregato di linfociti formato da almeno 50 cellule; i risultati sono stati quindi espressi come follicoli positivi per cm<sup>2</sup> di tessuto esaminato.

### **ANALISI STATISTICA**

I dati sono stati analizzati come descritto precedentemente (vedi pag. 47)

## RISULTATI

Le caratteristiche dei soggetti esaminati in questo studio sono riportati in **Tabella 11**.

I quattro gruppi di pazienti presentavano un'età media simile [BPCO con deficit di AAT: (media±SEM) 53±3 anni; BPCO con normali livelli di AAT: 58±2; controlli fumatori: 64±2 anni; controlli non fumatori: 52±7 anni]] e la storia di fumo non differiva significativamente tra i soggetti affetti da BPCO con deficit di AAT [(media±SEM) 35±8 pack-years], i soggetti BPCO con normali livelli di AAT [43±13] ed il gruppo di controllo dei fumatori [47±7].

Come atteso, sulla base dei criteri di selezione, il volume massimo espirato nel primo secondo (VEMS) era inferiore sia nei pazienti con BPCO e deficit di AAT [(media±SEM) 19±2% del teorico] che nei pazienti con BPCO e livelli normali di AAT [18±2], rispetto ai gruppi di controllo dei fumatori [102±3] e ai non fumatori [108±6][p<0.05 per ogni confronto].

	<b>BPCO con deficit di AAT</b>	<b>BPCO con AAT normale</b>	<b>Fumatori</b>	<b>Non Fumatori</b>
Soggetti (n°)	8M : 2F	8M : 4F	11M : 0F	2M : 7F
Età (anni)	53±3	58±2	64±2	52±7
Storia di fumo (pack-years)	35±8	43±13	47±7	-
VEMS (%teor)	19±2*	18±2*	102±3	108±6
VEMS/CVF (%teor)	35±5*	41±4*	79±2	82±2
RV (%teor)	134±27*°	210±29*°	91±12	97±8
DLco (%teor)	15±2*°	51±9*°	74±5	-
PaO <sub>2</sub> (mmHg)	60.5±3*	74±2*	87.6±2	80±3
PaCO <sub>2</sub> (mmHg)	49±5*	54±2*	37.5±1	37±2

**Tabella 11.** Caratteristiche cliniche dei soggetti.

Valori espressi come media ± SEM.

\* Valori significativamente ridotti rispetto ai controlli fumatori e non fumatori (p<0.01).

° Valori significativamente ridotti rispetto ai soggetti con BPCO e livelli normali di AAT (p<0.01).

Nessuna differenza significativa è stata evidenziata nell'espressione di IL-32 tra i soggetti BPCO con deficit di AAT e quelli con livelli normali di questa antiproteasi. In particolare l'espressione di IL-32 nei macrofagi alveolari e nelle pareti alveolari era significativamente aumentata nei soggetti con BPCO sia con deficit di AAT [mediana (range): 99(86-100)%; 4(0-8.5)cell/mm] che in quelli con livelli normali di AAT [98(89-100)%; 4.2(2.5-7.5)cell/mm] rispetto ai fumatori con funzionalità polmonare nella norma [57(0-99)%; 0(0-3)cell/mm] e ai controlli non fumatori [19(0-48)%; 0(0-2.5)cell/mm] [ $p < 0.005$  per ogni confronto]. I soggetti fumatori hanno mostrato rispetto ai soggetti non fumatori di controllo livelli di espressione di IL-32 simili nelle pareti alveolari, mentre tale espressione è risultata essere aumentata significativamente nei macrofagi alveolari dei soggetti fumatori rispetto ai soggetti non fumatori [ $p = 0.03$ ] (Figura 20 e 21).

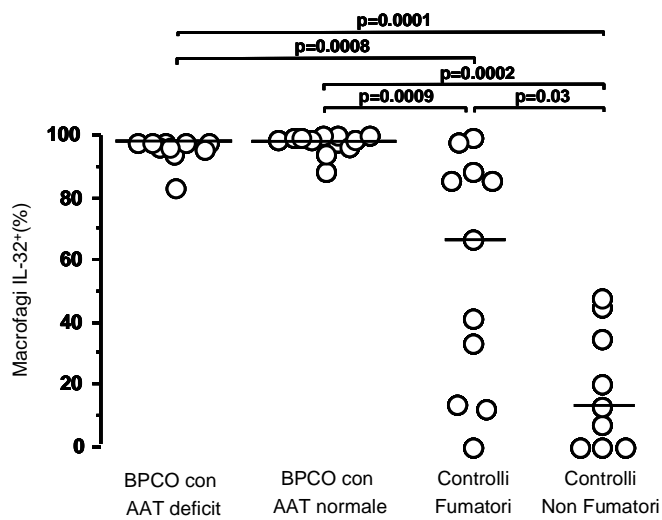


Figura 20. Quantificazione di IL-32 nei macrofagi alveolari.

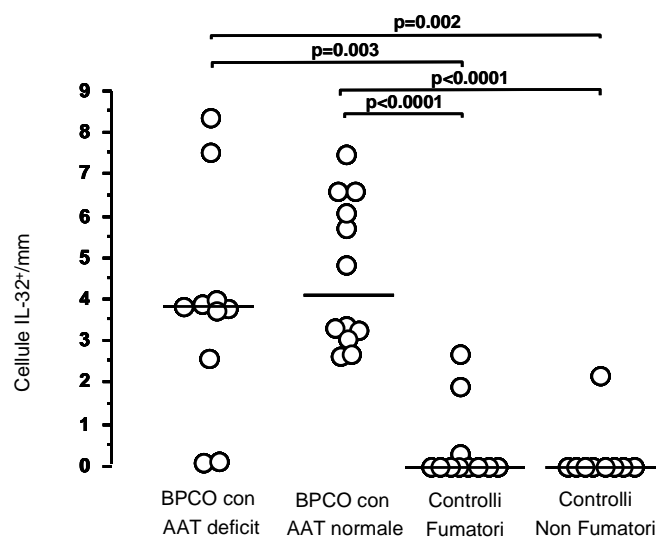
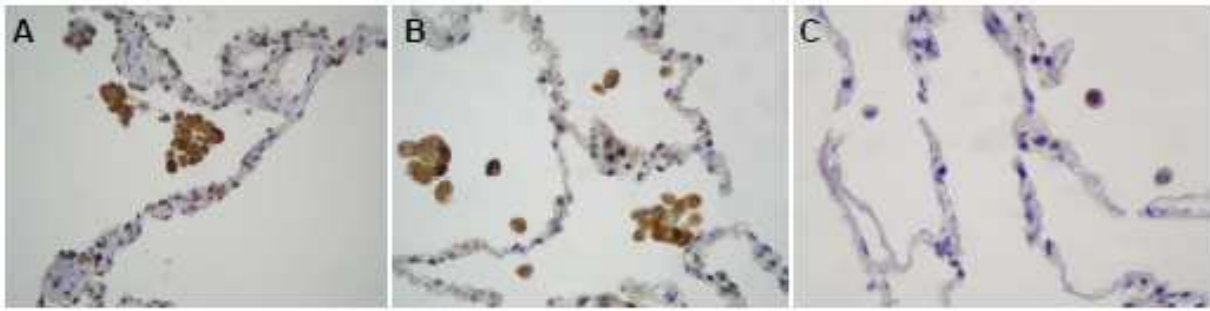
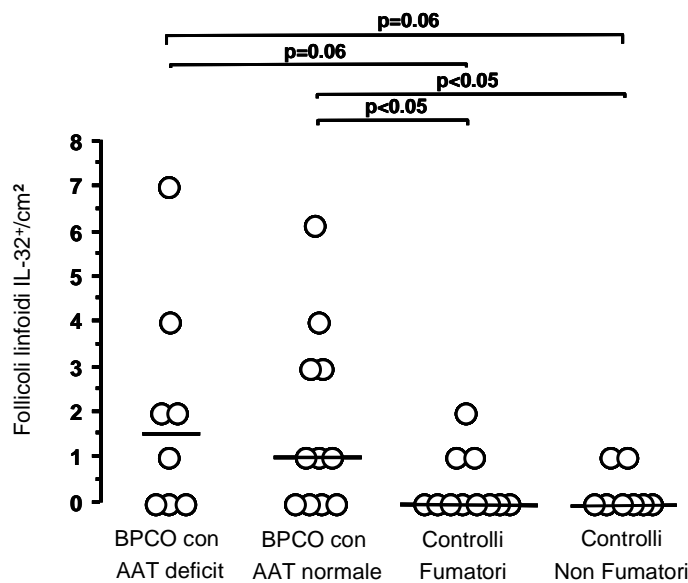


Figura 21. Quantificazione di IL-32 nelle cellule delle pareti alveolari.

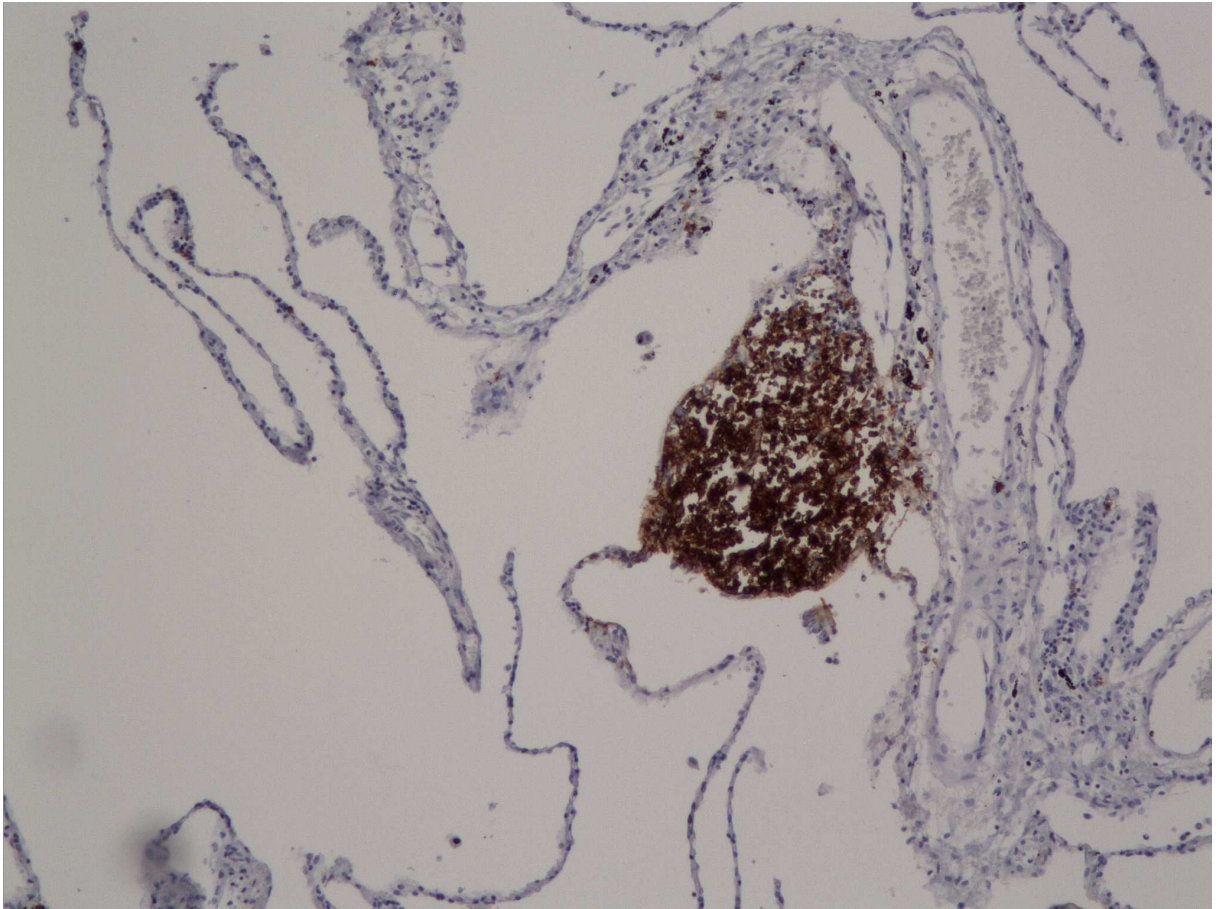


**Figura 22.** Fotografia al microscopio ottico di sezioni di campioni chirurgici che mostrano il parenchima polmonare di: (A) soggetto BPCO con deficit di AAT; (B) soggetto BPCO con livelli di AAT nella norma; (C) soggetto di controllo non fumatore. Colorazione immunostochimica con anticorpo monoclonale diretto contro IL-32. Ingrandimento 600X. La freccia indica i macrofagi alveolari positivi alla colorazione specifica per IL-32.

Nei follicoli linfoidi l'espressione di IL-32 era significativamente aumentata nei soggetti con BPCO con livelli normali di AAT [1(0-6)follo/cm<sup>2</sup>] rispetto ai fumatori [0(0-2)follo/cm<sup>2</sup>] e ai non fumatori di controllo [0(0-1)follo/cm<sup>2</sup>][p<0.05 per ogni confronto]. Un trend simile è stato osservato per i pazienti con deficit di AAT [1(0-6)follo/cm<sup>2</sup>][p<0.06 per ogni confronto]. I soggetti fumatori invece hanno mostrato livelli di espressione di IL-32 simili rispetto ai soggetti non fumatori di controllo nei follicoli linfoidi.



**Figura 23.** Quantificazione di IL-32 nei follicoli linfoidi.



**Figura 24.** Fotografia al microscopio ottico di una sezione di parenchima polmonare di un soggetto affetto da BPCO e deficit di AAT, che mostra un follicolo linfoide parenchimale positivo alla colorazione immunohistochimica con anticorpo monoclonale diretto contro IL-32. Ingrandimento 200X.





### **3. QUANTIFICAZIONE DEI FOLLICOLI LINFOIDI NEL PARENCHIMA POLMARE DEI PAZIENTI AFFETTI DA BPCO CON E SENZA DEFICIT DI ALFA 1 ANTITRIPSINA**

#### **MATERIALI E METODI**

Per studiare l'attivazione dei linfociti e la loro organizzazione in follicoli linfoidi abbiamo esaminato i campioni di tessuto polmonare ottenuti da 36 pazienti sottoposti a trapianto polmonare per enfisema grave: 9 soggetti affetti da BPCO molto grave (GOLD IV) con deficit di AAT e 27 soggetti BPCO molto grave (GOLD IV) con livelli normali di AAT.

I campioni chirurgici sono stati prelevati a livello del parenchima subpleurico, fissati in formaldeide al 4% ed inclusi in paraffina. Sono state quindi ricavate sezioni di 5 µm di spessore, le quali state processate con tecniche di immunistochemica per quantificare i follicoli linfoidi positivi CD20<sup>+</sup>. Per consentire l'esposizione dell'antigene CD20, le sezioni di parenchima polmonare sono state sottoposte per 30 minuti a riscaldamento in microonde con citrato buffer (5 mM/L; pH 6.0). Dopo aver bloccato i siti aspecifici di legame usando siero di coniglio (X0901; Dako, Globstrup, Denmark), è stato applicato l'anticorpo primario anti-CD20 (1:100; Dako, Santa Barbara, CA, U.S.A.), a temperatura ambiente, per 1 ora. Le sezioni sono state quindi incubate con il complesso streptavidina-biotina, coniugato con fosfatasi alcalina (Strept AB complex/AP, K0391; Dako, Globstrup, Denmark), per 30 minuti e colorate con diamino-benzidina (DAB; Dako, Globstrup, Denmark). L'analisi microscopica è stata condotta con microscopio Olympus BX41 connesso ad un sistema di registrazione video e collegato ad un sistema computerizzato di analisi dell'immagine (Image-Pro Plus 5; 2005 Media Cybernetics, Inc).

I follicoli linfoidi sono stati quantificati contando il numero di follicoli linfoidi parenchimali, perivascolari e bronchiolari, considerando come follicolo un aggregato di linfociti formato da almeno 50 cellule CD20 positive; i risultati sono stati quindi espressi come numero di follicoli linfoidi parenchimali e perivascolari per cm<sup>2</sup> di tessuto esaminato e come percentuale di vie aeree associate a follicoli linfoidi per quanto riguarda i follicoli linfoidi bronchiolari.

#### **ANALISI STATISTICA**

I dati sono stati analizzati come descritto precedentemente (vedi pag. 47)

## RISULTATI

Le caratteristiche dei soggetti esaminati in questo studio sono riportati in **Tabella 12**.

I due gruppi di soggetti presentavano un'età media simile [BPCO con deficit di AAT: (media±SEM) 53±3 anni; BPCO con livelli normali di AAT: 57±1], la storia di fumo non differiva significativamente tra i due gruppi di pazienti [(media±SEM) 26±2 pack-years; 42±8] e il volume massimo espirato nel primo secondo (VEMS) era simile in media nei soggetti esaminati [(media±SEM) 19±2% del teorico; 20±2].

	<b>BPCO con deficit di AAT</b>	<b>BPCO con AAT normale</b>
Sesso (n°)	7M : 2F	21M : 6F
Età (anni)	53±3	57±1
Storia di Fumo (pack-years)	26±2	42±8
VEMS (% pred)	19±2	20±2
VEMS/CVF (%)	35±6	38±3

**Tabella 12.** Caratteristiche cliniche dei soggetti.

Valori espressi come media ± SEM.

$p > 0.05$  per tutti i confronti.

I follicoli linfoidi erano quasi assenti nei polmoni sani dei donatori, mentre sia nei pazienti con deficit di AAT che in quelli con livelli normali di questa antiproteasi si è riscontrato un'elevata numerosità di follicoli linfoidi (Figura 25). In particolare il numero totale di follicoli linfoidi era aumentato nei soggetti con deficit di AAT, i quali presentavano un numero di follicoli linfoidi parenchimali più alto rispetto ai soggetti con livelli normali di AAT [mediana(range): 6(2-12) vs 2(0-6) foll/cm<sup>2</sup>;  $p=0.0002$ ]. I follicoli linfoidi perivascolari e bronchiolari erano più numerosi nei pazienti con deficit di AAT rispetto ai soggetti con livelli di AAT nella norma, ma la differenza tra i due gruppi non ha raggiunto la significatività statistica [5(0-24) vs 3(0-8) foll/cm<sup>2</sup>; 33(20-100) vs 20(0-60)%] (**Tabella 13**).



**Figura 25.** Fotografia al microscopio ottico di sezioni di parenchima polmonare, che mostrano (A) un follicolo linfoide parenchimale, (B) un follicolo linfoide perivascolare ed un follicolo linfoide bronchiolare positivi alla colorazione immunohistochimica con anticorpo monoclonale diretto contro CD20. Ingrandimento 200X.

	<b>BPCO con deficit di AAT</b>	<b>BPCO con AAT normale</b>	<b>p</b>
FL parenchimali/cm2	6 (2-12)*	2 (0-6)	0.0002
FL perivascolari/cm2	5 (0-24)	3 (0-8)	n.s.
FL bronchiolari %	33 (20-100)	20 (0-60)	n.s.

**Tabella 13.** Quantificazione dei follicoli linfoidi (FL) parenchimali, perivascolari e bronchiolari. Valori espressi come mediana (range).

\* Valori significativamente aumentati rispetto ai soggetti AATN ( $p < 0.05$ ).



## **4. L'ESPRESSIONE DI IL-32 NELLE CELLULE DELL'ESPETTORATO INDOTTO DEI PAZIENTI AFFETTI DA BPCO**

### **MATERIALI E METODI**

Infine allo scopo di estendere i dati ottenuti dallo studio sul parenchima polmonare abbiamo quantificato l'espressione di IL-32 nelle cellule dell'espettorato indotto di 19 pazienti affetti da BPCO in diversi stadi di gravità (stadio III GOLD), 17 soggetti fumatori con funzionalità polmonare nella norma e 12 non fumatori con funzionalità polmonare nella norma. L'espettorato indotto è stato ottenuto tramite metodiche standardizzate [116]. La soluzione salina ipertonica da nebulizzare è stata tenuta a temperatura ambiente almeno 15 minuti prima della nebulizzazione. Il VEMS e la CVF di base sono stati misurati 3 volte e sono stati registrati i valori migliori; trascorsi 15 minuti dopo la somministrazione di un broncodilatatore a rapida insorgenza (salbutamolo 200 mcg) tramite distanziatore, la spirometria è stata ripetuta ed è stato registrato il valore di VEMS migliore, tra due prove eseguite. Se il paziente presentava un VEMS post-broncodilatatore maggiore del 60% del teorico, si è utilizzata la procedura standard di induzione dell'espettorato; se invece il paziente era ostruito con un VEMS < del 60% del teorico si è utilizzata la procedura alternativa.

#### Procedura standard (VEMS > 60% del teorico)

La procedura ha una durata complessiva di 20 minuti. La soluzione salina al 3% viene nebulizzata e inalata dal soggetto; il VEMS viene quindi misurato dopo 1, 5, 10, 15, 20 minuti. Se durante la manovra il VEMS rimane stabile o diminuisce meno del 10% rispetto al valore iniziale post-broncodilatatore, la concentrazione di soluzione salina viene aumentata dal 3% al 4% dopo 10 minuti e mantenuta tale fino alla fine della procedura; se il VEMS diminuisce tra il 10% ed il 20% rispetto al valore iniziale post-broncodilatatore, si continua a somministrare la soluzione salina al 3%; se il VEMS diminuisce più del 20% rispetto al valore iniziale post-broncodilatatore, la nebulizzazione viene interrotta.

#### Procedura alternativa (VEMS < 60% del teorico)

Anche questa procedura ha una durata complessiva di 20 minuti e viene eseguita mediante l'uso di una soluzione fisiologica (soluzione salina al 0.9%) nebulizzata per i primi 5 minuti. Il VEMS viene quindi misurato dopo 1, 5, 10, 15, 20 minuti. Se dopo i primi 5 minuti il VEMS rimane stabile o diminuisce meno del 10% rispetto al valore iniziale post-broncodilatatore, si inizia la somministrazione di soluzione salina al 3% per i successivi 5 minuti; quindi la concentrazione viene aumentata al 4% e mantenuta tale fino alla fine della

procedura. Se dopo 5 minuti il VEMS scende tra il 10% ed il 20% rispetto al valore iniziale post-broncodilatatore, si continua con la somministrazione di soluzione fisiologica, se il VEMS scende più del 20% rispetto al valore iniziale post-broncodilatatore, si interrompe il test.

Nei pazienti considerati a rischio (con grave ostruzione delle vie aeree o con grave iperreattività bronchiale) il VEMS è stato misurato dopo 30 secondi, 1 minuto, 2 minuti, 4 minuti, 8 minuti ed il paziente è stato invitato ad espettorare dopo 4 e 8 minuti, quindi la procedura è stata interrotta.

Se si assisteva ad una riduzione del VEMS maggiore del 20%, rispetto al valore post-broncodilatatore, o alla comparsa di sintomi di broncoostruzione quali tosse, oppressione toracica, sibili o dispnea, la nebulizzazione di soluzione salina veniva interrotta ed il soggetto trattato con salbutamolo spray.

L'espettorato indotto è stato quindi processato tramite metodiche standard [117] al fine di ottenere un pellet cellulare, diluito ad una concentrazione pari a 300.000 cellule/ml. Questa soluzione è stata citocentrifugata e sono stati preparati 2 vetrini per ogni paziente, processati con tecniche di immunocitochimica per valutare l'espressione di IL-32 come precedentemente esposto (vedi pag. 44). L'analisi microscopica è stata condotta con microscopio Olympus BX41 connesso ad un sistema di registrazione video e collegato ad un sistema computerizzato di analisi dell'immagine (Image-Pro Plus 5; 2005 Media Cybernetics, Inc). I risultati sono stati espressi mediante uno score, calcolato come prodotto della percentuale di cellule IL-32 positive per l'intensità della colorazione, valutata mediante da un punteggio da 1 (bassa intensità) a 3 (alta intensità).

## **ANALISI STATISTICA**

I dati sono stati analizzati come descritto precedentemente (vedi pag. 47)

## RISULTATI

I soggetti reclutati per lo studio dell'espettorato indotto presentavano le seguenti caratteristiche (**Tabella 14**): il gruppo di soggetti affetti da BPCO presentava un'età superiore rispetto agli altri due gruppi ( $71\pm 2$ ;  $p < 0.05$  per ogni confronto) e una storia di fumo simile al gruppo dei fumatori [BPCO: (media $\pm$ SEM)  $44\pm 5$  pack-years; fumatori:  $38\pm 5$ ]. Il gruppo dei fumatori e dei non fumatori sani invece avevano un'età media simile [fumatori (media $\pm$ SEM):  $58\pm 2$ ; non fumatori:  $60\pm 2$ ]. Come atteso, sulla base dei criteri di selezione, il VEMS era inferiore nei pazienti con BPCO [(media $\pm$ SEM)  $71\pm 4\%$  del teorico] rispetto ai fumatori ( $107\pm 3$ ) e ai non fumatori sani ( $116\pm 5$ ) ( $p < 0.05$  per ogni confronto).

	<b>BPCO</b>	<b>Fumatori</b>	<b>Non Fumatori</b>
Sesso (n°)	16M : 3F	8M : 9F	5M : 7F
Età (anni)	$71\pm 2^\circ$	$58\pm 2$	$60\pm 2$
Storia di Fumo (pack-years)	$44\pm 5$	$38\pm 5$	–
VEMS (% pred)	$71\pm 4^*$	$107\pm 3$	$116\pm 5$
VEMS/CVF (%)	$58\pm 2^*$	$82\pm 2$	$89\pm 4$

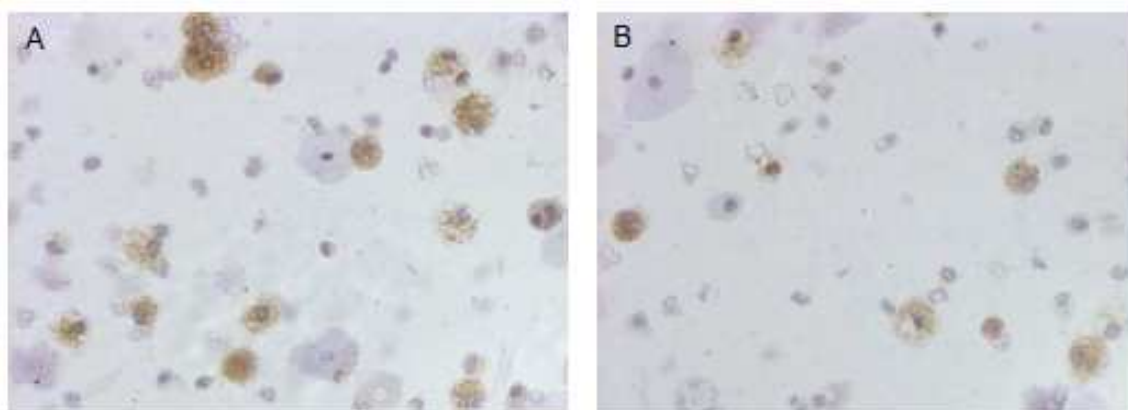
**Tabella 14.** Caratteristiche dei soggetti.

Valori espressi come media  $\pm$  SEM.

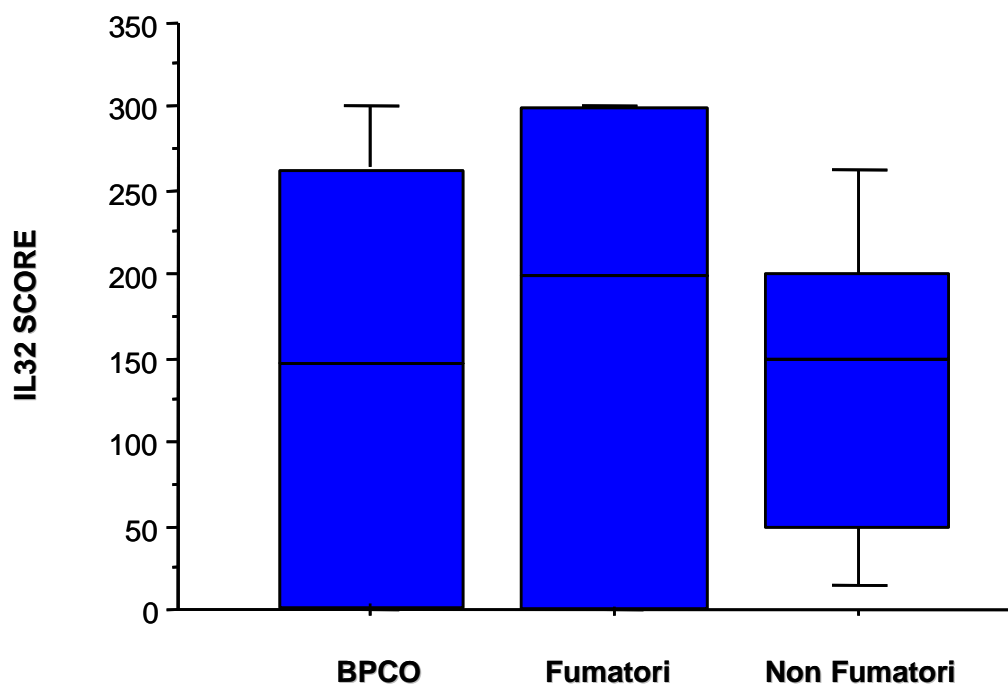
$^\circ$  Valori significativamente aumentati rispetto ai fumatori e non fumatori sani ( $p < 0.05$ ).

$*$  Valori significativamente ridotti rispetto ai fumatori e non fumatori sani ( $p < 0.05$ ).

L'espressione di IL-32 è stata osservata solo a livello dei macrofagi dell'espettorato indotto, soprattutto a livello citoplasmatico (**Figura 26**). I tre gruppi di soggetti presentavano livelli simili di espressione di IL-32 [BPCO mediana (range): 150 (0-260); fumatori: 200 (0-300); non fumatori: 150 (50-200)] (**Figura 27**).



**Figura 26.** Fotografia al microscopio ottico che mostra i macrofagi dell'espettorato indotto positivi alla colorazione immunostochimica con anticorpo monoclonale diretto contro IL-32 di (A) un soggetto affetto da BPCO e (B) di un soggetto fumatore con funzionalità polmonare nella norma. Ingrandimento 600X.



**Figura 27.** Quantificazione dell'espressione di IL-32 nei macrofagi dell'espettorato indotto. IL-32 SCORE (0-300): percentuale di macrofagi IL-32 positivi X intensità della colorazione (1-3).  $p > 0.05$  per tutti i confronti.



## DISCUSSIONE

Lo studio oggetto di questa tesi ha permesso di dimostrare per la prima volta che nel polmone periferico di pazienti affetti da BPCO è presente un'aumentata espressione di IL-32 che risulta direttamente correlata alla produzione di TNF- $\alpha$  e al numero di linfociti T CD8<sup>+</sup> e di cellule fosfo p38<sup>+</sup> presenti nelle pareti alveolari.

Nonostante lo sviluppo della BPCO sia determinato da una complessità di fattori, il ruolo del processo infiammatorio nella patogenesi della malattia è ormai indiscusso. Il più importante fattore di rischio identificato è il fumo di sigaretta, responsabile del processo infiammatorio polmonare [118,119], che normalmente rappresenta una risposta aspecifica agli insulti esterni (risposta innata). Tuttavia non tutti i soggetti fumatori sviluppano la malattia, la quale infatti riconosce nella sua patogenesi fattori di rischio estrinseci (particelle e gas nocivi, primo tra tutti il fumo di sigaretta), ma anche una predisposizione individuale. Una delle ipotesi, proposte per spiegare la diversa suscettibilità allo sviluppo della BPCO nei vari soggetti, riguarda un possibile cambiamento della risposta immunitaria, da innata aspecifica ad una risposta acquisita specifica, associata ad una componente autoimmune [62,88]. Questa ipotesi che è stata avanzata per la prima volta da Agustí e collaboratori ha avuto interessanti sviluppi negli ultimi anni [88]. Infatti studi recenti hanno dimostrato la presenza di autoanticorpi diretti contro l'elastina e di IgG circolanti con alta avidità per le cellule epiteliali polmonari [89,90]. Questi risultati hanno permesso di ipotizzare che nella BPCO venga attivata sia l'immunità cellulo-mediata che quella umorale. In una recente review, pubblicata dal New England Journal of Medicine, Cosío et al. hanno inquadrato i risultati dei vari studi spiegando come i linfociti T possano essere cellule chiave nel promuovere il danno polmonare conseguente al rilascio di autoantigeni liberati in seguito ad esposizione al fumo di sigaretta [91]. Nella BPCO si svilupperebbe quindi una risposta di tipo acquisito diretta contro auto-antigeni polmonari, con tutte le caratteristiche proprie delle risposte di tipo autoimmune.

È opportuno sottolineare come un'aumentata espressione di IL-32 sia stata precedentemente descritta in patologie infiammatorie associate ad una componente autoimmune [110]. Infatti, un'aumentata espressione di questa citochina è stata osservata in pazienti affetti da artrite reumatoide, a livello del tessuto sinoviale, e nella mucosa intestinale di pazienti con Morbo di Crohn, malattie in cui è stata ipotizzata una componente autoimmune [106]. Nel nostro studio abbiamo riscontrato un'intensa espressione di IL-32, oltre che nei pazienti con BPCO, anche nel paziente con interessamento polmonare di artrite reumatoide e nel paziente con quadro di polmonite interstiziale non specifica associato a collagenopatia. Una simile immunoreattività non è stata invece rilevata nei pazienti con asma e polmonite infettiva. Questi risultati suggeriscono che l'IL-32 non sia un segnale

generale attivato in qualsiasi tipo di processo infiammatorio, ma possa rappresentare un segnale specifico della risposta autoimmune.

Lavori precedenti hanno dimostrato che IL-32, attraverso l'attivazione di NFκB e p38 MAPK [100], due fattori di trascrizione intracitoplasmatici, è in grado di stimolare la produzione di TNF-α, considerata una citochina molto importante nelle patologie infiammatorie croniche. Nel nostro studio abbiamo osservato che l'espressione di IL-32 era positivamente correlata sia alla fosforilazione di p38 MAPK, che alla produzione di TNF-α nei macrofagi alveolari. Tutte queste considerazioni, unite all'evidenza che l'attivazione di NFκB è aumentata nella BPCO [120], supportano l'ipotesi che IL-32 possa attivare la produzione di citochine proinfiammatorie, in particolare del TNF-α, e che, nella BPCO, IL-32 e TNF-α abbiano un ruolo chiave nella perpetuazione della risposta immune. Inoltre lo studio oggetto di questa tesi ha dimostrato che nel tessuto polmonare vi è una trascrizione attiva di IL-32 grazie alla rilevazione dell'mRNA per IL-32. I soggetti affetti da BPCO hanno mostrato livelli aumentati delle isoforme IL-32 non-α rispetto ai soggetti di controllo. L'espressione dell'isoforma α invece era prevalente nei fumatori e non fumatori di controllo, mentre è risultata bassa nei soggetti con BPCO. Il ruolo delle diverse isoforme non è noto; tuttavia si può ipotizzare che splicing differenti diano origine a varianti diverse della stessa proteina, le quali potrebbero esercitare una funzione antagonista una sulle altre e viceversa [121,122].

Le osservazioni emerse dallo studio oggetto di questa tesi aggiungono pertanto informazioni interessanti inerenti ai meccanismi patogenetici della BPCO. Il nostro studio, infatti, dimostra un aumento dell'espressione di IL-32 e di TNF-α nei fumatori con BPCO rispetto ai soggetti che, a parità di sigarette fumate, non hanno sviluppato la limitazione al flusso aereo.

Attraverso le indagini di immunistochemica è stata rilevata un'importante immunoreattività per IL-32 soprattutto a livello citoplasmatico, talvolta associata ad una intensa positività nucleare. Il significato della presenza a livello nucleare di IL-32 non è noto, dato che questa citochina è prodotta nel citoplasma cellulare. Tuttavia è possibile ipotizzare che la translocazione di IL-32 all'interno del nucleo influenzi la trascrizione di altre citochine e fattori di crescita, tra cui il TNF-α.

Nel nostro studio siamo stati in grado di dimostrare, mediante microscopia confocale, la co-espressione di IL-32 e TNF-α nei macrofagi e la co-localizzazione di IL-32 e CD8 a livello della parete alveolare. Inoltre, a conferma di quest'ultima osservazione, abbiamo evidenziato una correlazione positiva tra l'espressione di IL-32 e il numero di linfociti T CD8<sup>+</sup> infiltranti le pareti alveolari. Queste evidenze sostengono l'ipotesi che la produzione di IL-32 e TNF-α da parte dei macrofagi e di IL-32 da parte dei linfociti T CD8<sup>+</sup> abbia un ruolo chiave nell'amplificazione del processo infiammatorio caratteristico della malattia.

Lavori precedenti hanno dimostrato che IL-32 non solo possiede proprietà pro-infiammatorie, ma esplica anche un'attività pro-apoptotica nei confronti delle cellule epiteliali. A tal proposito si ricorda che l'estesa apoptosi delle cellule epiteliali alveolari, in assenza di

un'adeguata proliferazione è responsabile della perdita del parenchima polmonare caratteristica dell'enfisema [80,81,123]. Il nostro studio ha evidenziato una correlazione positiva tra l'espressione di IL-32 e il grado di limitazione del flusso aereo; una correlazione simile è stata osservata anche tra l'espressione di TNF- $\alpha$  e i valori dei parametri funzionali. Queste osservazioni avvalorano l'ipotesi che IL-32 e TNF- $\alpha$  possano avere un ruolo importante nella progressione della malattia, mediante la regolazione sia della risposta infiammatoria che del processo apoptotico, entrambi amplificati nei soggetti con BPCO avanzata [61,81,124].

Questa ipotesi è sostenuta dai risultati del nostro studio in cui abbiamo quantificato l'espressione di IL-32 nel parenchima polmonare di pazienti affetti da BPCO molto grave a diversa patogenesi, dimostrando che l'espressione di questa citochina è aumentata nel polmone periferico sia dei pazienti affetti da BPCO molto grave con livelli di AAT nella norma che in quelli con deficit di AAT rispetto ai soggetti di controllo fumatori e non fumatori. IL-32 quindi potrebbe avere un ruolo importante nel regolare le risposte immuni sia nei soggetti con livelli di AAT nella norma, che in quelli con deficit di AAT. L'attivazione dei linfociti e la loro organizzazione in follicoli linfoidi sembra avere un ruolo cruciale nella patogenesi e nella progressione della BPCO. Infatti, Hogg e collaboratori in un importante lavoro hanno dimostrato che la progressione della malattia è direttamente associata al livello del processo infiammatorio presente nella mucosa bronchiale, causato probabilmente da una risposta immune acquisita, la quale è caratterizzata dall'organizzazione delle cellule infiammatorie in follicoli linfoidi [55]. In una parte dello studio oggetto di questa tesi abbiamo quantificato il numero e la distribuzione dei follicoli linfoidi nei polmoni nativi di soggetti sottoposti a trapianto polmonare per enfisema in stadio avanzato, dimostrando che il numero di follicoli linfoidi parenchimali è aumentato soprattutto nei pazienti con deficit di AAT. I risultati dei nostri studi permettono quindi di ipotizzare che in questi soggetti i meccanismi patogenetici possano estendersi aldilà del noto squilibrio tra proteasi e antiproteasi polmonari, coinvolgendo un'importante risposta infiammatoria con una componente autoimmune, in cui l'induzione di IL-32 e la conseguente attivazione linfocitaria potrebbero contribuire alla perpetuazione del danno polmonare.

Questi dati rivoluzionano l'approccio nei confronti degli stadi avanzati della BPCO, che tradizionalmente venivano considerati caratterizzati soltanto da lesioni distruttive. L'osservazione che in questi pazienti il processo infiammatorio è amplificato pone, infatti, le basi per futuri interventi terapeutici anche negli stadi più gravi della malattia.

Infine nel lavoro oggetto di questa tesi abbiamo esteso i dati ottenuti dagli studi di immunoistochimica sul parenchima polmonare, quantificando l'espressione di IL-32 nelle cellule dell'espettorato indotto di pazienti affetti da BPCO e confrontandola con quella presente in soggetti fumatori e non fumatori con funzionalità polmonare nella norma. L'espettorato indotto è una metodica non invasiva utile per studiare i soggetti affetti da

patologie infiammatorie delle vie aeree, in quanto consente di analizzare le cellule e i mediatori infiammatori prelevati a livello delle vie aeree centrali [125,126]. Ci siamo quindi chiesti se IL-32 potesse costituire un biomarker della BPCO, cioè una molecola associata alle alterazioni fisiopatologiche tipiche e utile nel predire l'evoluzione della malattia, analizzabile tramite procedure non invasive. In questa fase dello studio abbiamo dimostrato che l'espressione di IL-32 è elevata a livello delle vie aeree centrali sia dei soggetti affetti da BPCO, che nei fumatori e non fumatori con funzionalità polmonare nella norma. Inoltre non è stata osservata alcuna differenza significativa nell'espressione di IL-32 a livello delle cellule dell'espettorato indotto nei tre gruppi di soggetti esaminati. Questi dati suggeriscono che l'analisi dell'espettorato indotto, quale metodica non invasiva, potrebbe non riflettere accuratamente i meccanismi patogenetici che sono presenti nel polmone profondo. L'analisi di IL-32 come biomarker nell'espettorato indotto sembra quindi per ora non essere una procedura affidabile nell'identificazione precoce della malattia. Interessante sarebbe confrontare negli stessi soggetti l'espressione di IL-32 a livello delle cellule dell'espettorato indotto e a livello delle cellule del lavaggio broncoalveolare, le quali riflettono i processi immunologici presenti nel polmone profondo. Le cellule a livello delle vie aeree centrali infatti potrebbero essere soggette ad una stimolazione infiammatoria diversa rispetto alle cellule del parenchima polmonare.

In conclusione, il nostro lavoro ha dimostrato un importante aumento dell'espressione di IL-32 nel polmone periferico dei pazienti affetti da BPCO rispetto ai soggetti di controllo fumatori e non fumatori, e che IL-32 è legata al processo infiammatorio caratteristico di patologie a componente autoimmune. Inoltre l'espressione di IL-32 è risultata aumentata nel polmone periferico sia dei pazienti affetti da BPCO molto grave con livelli di AAT nella norma che in quelli con deficit di AAT rispetto ai soggetti di controllo fumatori e non fumatori. Questi risultati suggeriscono che IL-32 possa avere un ruolo importante nella persistenza della risposta infiammatoria con caratteristiche autoimmuni, contribuendo alle alterazioni anatomopatologiche tipiche della BPCO. Nei pazienti con deficit di AAT i meccanismi patogenetici sembrano quindi coinvolgere un'importante risposta immunitaria, in cui l'espressione di IL-32 e l'attivazione linfocitaria potrebbero contribuire alla perpetuazione del danno polmonare.

## REFERENZE BIBLIOGRAFICHE

1. Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of COPD, Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) 2008.
2. Luppi F, Fabbri LM: Definizione, classificazione ed eziopatogenesi. In: Rapporto sulla Broncopneumopatia cronica Ostruttiva (BPCO) 2005 De Palma M, Fabbri LM eds Federazione italiana contro le malattie polmonari sociali e la tubercolosi, Milano 2005, pp 10-18.
3. Agusti AG. Systemic effects of chronic obstructive pulmonary disease. Proc Am Thorac Soc 2005;2:367-70.
4. Van Eeden SF, Sin DD. Chronic Obstructive Pulmonary Disease: A Chronic Systemic Inflammatory Disease Respiration 2008;75(2):224-38.
5. Xu X, Weiss ST, Rijcken B, Schouten JP. Smoking changes in smoking habits, and rate of decline in FEV1: new insight into gender differences. Eur Respir J 1994;7(6):1056-61.
6. Silverman EK, Weiss ST, Drazen JM, Chapman HA, Carey V, Campbell EJ et al. Gender-related differences in severe, early-onset chronic obstructive pulmonary disease. Am J Respir Crit Care Med 2000;162(6):2152-8.
7. WHO. World Health Report 2002. Sito web: [www.who.int/whr/2002](http://www.who.int/whr/2002).
8. Scognamiglio A, Matteelli G, Baldacci S, Pistelli F, Carrozzi L, Viegi G. L'epidemiologia della broncopneumopatia cronica ostruttiva. Ann Ist Super Sanità 2003;39:467-484.
9. Sin DD, Man SF. Chronic obstructive pulmonary disease as a risk factor for cardiovascular morbidity and mortality. Proc Am Thorac Soc 2005;2(1):8-11.
10. Neville Woolf. Anatomia Patologica. EdiSES s.r.l. (NA) 2001;pp 245-247.
11. Fletcher C, Peto R. The natural history of chronic airflow obstruction. BMJ 1997;i:1645-1658.
12. Viegi G, Paoletti P, Vellutini M, Carrozzi L, Di Pede F, Baldacci S, Modena P, Pedreschi M, Di Pede C, Giuntini C. Effects of daily cigarette consumption on respiratory symptoms and lung function in a general population sample of North Italian Men. Respiration 1991;58:282-286.
13. Standards for the diagnosis and care of patients with chronic obstructive pulmonary disease. American Thoracic Society. Am J Respir Crit Care Med 1995;152:77S-121S.
14. Viegi G, Matteelli G, Angino A, Scognamiglio A, Baldacci S, Soriano JB, Carrozzi L. The proportional Venn diagram of obstructive lung disease in the Italian general population. Chest 2004;126:1093-1101.
15. Tashkin DP, Detels R, Simmons M, Liu H, Coulson AH, Sayre J, Rokaw S. The UCLA population studies of chronic obstructive respiratory disease: XI. Impact of air pollution and smoking on annual change in forced expiratory volume in one second. Am J Respir Crit Care Med 1994;149:1209-1217.

16. Schikowski T, Sugiri D, Ranft U, Gehring U, Heinrich J, Wichmann HE, Kramer U. Long-term air pollution exposure and living close to busy roads are associated with COPD in women. *Respir Res* 2005;6:152-178.
17. Gryparis A, Forsberg B, Katsouyanni K, Analitis A, Touloumi G, Schwartz J, Samoli E, Medina S, Anderson HR, Niciu EM, Wichmann HE, Kriz B, Kosnik M, Skorkovsky J, Vonk JM, Dortbudak Z. Acute Effects of Ozone on Mortality from the "Air Pollution and Health: A European Approach" Project. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;170:1080-1087.
18. Warwick H, Doig A. Smoke the killer in the kitchen: Indoor air pollution in developing countries. ITDG Publishing, 103-105 Southampton Row, London WC1B HLD, UK 2004: URL: <http://www.itdgpublishing.org.uk>.
19. Ezzati M. Indoor air pollution and health in developing countries. *Lancet* 2005;366(9480):104-6.
20. Smith KR, Metha S, Maeusezahl-Feuz M. Indoor airpollution from household solid fuel use. In: Ezzati M, Loperz, AD, Rodgers M.,Murray CJ, eds. Comparative quantification of health risks: global and regional burden of disease attributable to selected major risk factors. Geneva: World Health Organization; 2004.
21. Mishra V, Dai X, Smith KR, Mika L. Maternal exposure to biomass smoke and reduced birth weight in Zimbabwe. *Ann Epidemiol* 2004;14:740-7.
22. Boman C, Forsberg B, Sandstrom T. Shedding new light on wood smoke: a risk factor for respiratory health. *Eur Respir J* 2006; 27(3):446-7.
23. Oroczo-Levi M, Garcia-Aymerich J, Villar J, Ramirez-Sarmiento A, Anto JM, Gea J. Wood smoke exposure and risk of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir L* 2006;27:542-6.
24. Sezer H, Akkurt I, Guler N, Marakoglu K, Berk S. A case-control study on the effect of exposure to different substances on the development of COPD. *Ann Epidemiol* 2006;16(1):59-62.
25. Balmes J, Becklake M, Blanc P, Henneberger P, Kreiss K, Mapp C, Milton D, Schwartz D, Toren K, Viegi G. American Thoracic Society Statement: Occupational Contribution to the Burden of Airway Disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;167:787-797.
26. Beeckman LA, Wang ML, Petsonk EL, Wagner GR. Rapid declines in FEV1 and subsequent respiratory symptoms, illnesses, and mortality in coal miners in the United States. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163:633-9.
27. Shaheen SO, Barker DJ, Shiell AW, Crocker FJ, Wield GA, Holgate ST. The relationship between pneumonia in early childhood and impaired lung function in late adult life. *Am J Respir Crit Care Med* 1994;149(3 Pt 1):616-9.
28. Prescott E, Lange P, Vestbo J. Socioeconomic status, lung function and admission to hospital for COPD: results from the Copenhagen City Heart Study. *Eur Respir J* 1999;13859:1109-14.

29. Harrison. *Principi di Medicina Interna* 16/e. Mc Graw Hill 2002; Vol 2. pp 1736,1737.
30. Luisetti M, Medaglia S, Tamburnotti C, Zorzetto M. Predisposizione genetica alle BPCO. In "Il volto della BPCO che cambia", vol n. 1, Giuntini C, Grassi G eds UTET 2001: pp 69-80.
31. Smith CA, Harrison DJ. Association between polymorphism in gene for microsomal epoxide hydrolase and susceptibility to emphysema. *Lancet* 1997;350(9078):630-3.
32. Silverman EK, Palmer LJ, Mosley JD, Barth M, Senter JM, Brown A, et al. Genome wide linkage analysis of quantitative spirometric phenotypes in severe early-onset chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Hum Genet* 2002;70(5):1229-39.
33. Huang SL, Su CH, Chang SC. Tumor necrosis factor-alpha gene polymorphism in chronic bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;156(5):1436-9.
34. Barker DJ, Godfrey KM, Fall C, Osmond C, Winter PD, Shaheen SO. Relation of birth weight and childhood respiratory infection to adult lung function and death from chronic obstructive airways disease. *BMJ* 1991;303(6804):671-5.
35. Cosio MG, Cosio Piqueras MG. Pathology of emphysema in chronic obstructive pulmonary disease. *Monaldi Arch Chest Dis* 2000; 55: 124-9.
36. Saetta M, Ghezzo H, Kim WD, King M, Angus GE, Wang NS, Cosio MG. Loss of alveolar attachments in smokers. A morphometric correlate of lung function impairment. *Am Rev Respir Dis* 1985;132:894-900.
37. CECA. 1971. Aide memoir of spirographic practice for examining ventilatory function, 2nd ed. Industrial Health and Medicine, Luxemburg.
38. Scharf SM, Iqbal M, Keller C, Criner G, Lee S, Fessler HE. Hemodynamic characterization of patients with severe emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;166(3):314-22.
39. Burrows B, Kettel LJ, Niden AH, Rabinowitz M, Diener CF. Patterns of cardiovascular dysfunction in chronic obstructive lung disease. *N Engl J Med* 1972 286(17):912-8.
40. Naeije R. Should pulmonary hypertension be treated in chronic obstructive pulmonary disease? In Weir EK, Archer SL, Reeves JT eds. *The diagnosis and treatment of pulmonary hypertension*. Mount Kisco Futura Publishing 1992:209-239.
41. Kessler R, Faller M, Fourgaut G, Mennecier B, Weitzenblum E. Predictive factors of hospitalization for acute exacerbation in series of 64 patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;159(1):158-64.
42. Rabe KF, Hurd S, Anzueto A., Barnes PJ, Buist SA, Calverley P, Fukuchi Y, Jenkins C, Rodriguez-Roisin R, van Weel C, Zielinski J. Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease: GOLD Executive Summary. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;176:532-555.
43. Celli BR, Cote CG, Marin JM, Casanova C, Montes de Oca, Mendez RA, Pinto Plata V, Cabral HJ. The body-mass index, airflow obstruction, dyspnoea, and exercise capacity index in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2004;350:2635-2637.

44. Donaldson GC, Seemungal TA, Bhowmik A, and Wedzicha JA. Relationship between exacerbation frequency and lung function decline in chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 2002;57(10):847-52.
45. Celli BR, Barnes PJ. Exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2007;29:1224-1238.
46. Saetta M, Turato G, Baraldo S, Casoni GL, Bellettato GM, Zuin R, Rea F, Fabbri LM, Papi A. Increased proportion of CD8+ T lymphocytes in the paratracheal lymphnodes of smokers with mild COPD. *Sarcoidosis Vasc Lung Dis* 2003;20:28-32.
47. Saetta M, Di Stefano A, Turato G, Facchini FM, Corbino L, Mapp CE, Maestrelli P, Ciaccia A, Fabbri LM. CD8+ T-lymphocytes in peripheral airways of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157:822-6.
48. Saetta M, Di Stefano A, Maestrelli P, Ferraresso A, Drigo R, Potena A, Ciaccia A, Fabbri LM. Activated T-lymphocytes and macrophages in bronchial mucosa of subjects with chronic bronchitis. *Am Rev Respir Dis* 1993;147:301-6.
49. Di Stefano A, Turato G, Maestrelli P, Mapp CE, Ruggieri MP, Roggeri A, Boschetto P, Fabbri LM, Saetta M. Airflow limitation in chronic bronchitis is associated with T-lymphocyte and macrophage infiltration of the bronchial mucosa. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;153:629-32.
50. Saetta M, Turato G, Maestrelli P, Mapp CE, Fabbri LM. Cellular and structural bases of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163:1304-1309.
51. Saetta M, Turato G, Facchini FM, Corbino L, Lucchini RE, Casoni G, Maestrelli P, Mapp CE, Ciaccia A, Fabbri LM. Inflammatory cells in the bronchial glands of smokers with chronic bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;156:1633-1639.
52. Hogg JC, Macklem PT, Thurlbeck WM. Site and nature of airway obstruction in chronic obstructive lung disease. *N Engl J Med* 1968;278:1355-60.
53. Bosken CH, Wiggs BR, Paré PD, Hogg JC. Small airway dimensions in smokers with obstruction to airflow. *Am Rev Respir Dis* 1990;142:563-70.
54. Cosio M, Ghezzo H, Hogg JC, Corbin R, Loveland M, Dosman J, Macklem PT. The relations between structural changes in small airways and pulmonary-function tests. *N Engl J Med* 1978;298:1277-81.
55. Hogg JC, Chu F, Utokaparch S, Woods R, Elliott WM, Buzatu L, Cherniack RM, Rogers RM, Sciurba FC, Coxson HO, Paré PD. The nature of small airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2004;350:2645-53.
56. Enelow RI, Mohammed AZ, Stoler MH, Liu AN, Young JS, Lou YH and Braciale TJ. Structural and functional consequences of alveolar cell recognition by CD8+ T lymphocytes in experimental lung disease. *J Clin Invest* 1998;102(9):1653-1661.
57. Vlahovic G, Russell ML, Mercer RR, Crapo JD. Cellular and connective tissue changes in alveolar septal walls in emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160:2086-92.



58. Lang MR, Fiaux GW, Gillyooly M, Stewart JA, Hulmes DJ, Lamb D. Collagen content of alveolar wall tissue in emphysematous and nonemphysematous lungs. *Thorax* 1994;49:319-26.
59. Saetta M, Baraldo S, Corbino L, Turato G, Braccioni F, Rea F, Cavalllesco G, Tropeano G, Mapp CE, Maestrelli P, Ciaccia A, Fabbri LM. CD8+ve cells in the lungs of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160:711-7.
60. Grumelli S, Corry DB, Song LZ, Song L, Green L, Huh J, Hacken J, Espada R, Bag R, Lewis DE, Kheradmand F. An immune basis for lung parenchymal destruction in chronic obstructive pulmonary disease and emphysema. *PLoS Med* 2004;1 e8.
61. Retamales I, Elliott WM, Meshi B, Coxson HO, Pare PD, Sciruba FC, Rogers RM, Hayashi S, Hogg JC. Amplification of inflammation in emphysema and its association with latent adenoviral infection. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164:469-73.
62. Cosio MG, Majo J, Cosio MG. Inflammation of the airways and lung parenchyma in COPD: role of T cells. *Chest* 2002;121:160S-165S.
63. Barbera JA, Peinado VI, Santos S. Pulmonary Hipertension in COPD: old and new concept. *Monaldi Arch Cest Dis.* 2000;55:445-9.
64. Vestbo J. Systemic inflammation and progression of COPD. The role of Creactive protein. *Thorax* 2007;62:469-470.
65. Dahl M, Vestbo J, Lange P, Bojesen SE, Tybjaerg-Hansen A and Nordestgaard BG. C-reactive protein as a predictor of prognosis in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;175(3):250-255.
66. Marquis K, Maltais F, Duguay V, et al. The metabolic syndrome in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J Cardiopulm Rehabil* 2005;25:226-32.
67. Sevenoaks M, Stockley R. Chronic obstructive pulmonary disease, inflammation and comorbidity: a common inflammatory phenotype? *Respir Res* 2006;7:70.
68. MacNee W. Pulmonary and systemic oxidant/antioxidant imbalance in chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* 2005;2:50-60.
69. Broekhuizen R, Wouters EF, Creutzberg EC, Schols AM. Raised CRP levels mark metabolic and functional impairment in advanced COPD. *Thorax* 2006;61:17-22.
70. Hodge G, Nairn J, Holmes M, Reynolds PN, Hodge S. Increased intracellular T helper 1 proinflammatory cytokine production in peripheral blood, bronchoalveolar lavage and intraepithelial T cells of COPD subjects. *Clin Exp Immunol* 2007;150(1):22-9.
71. Morrison D et al. Epithelial permeability, inflammation and oxidant stress in the air spaces of smokers. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;159:473-479.
72. Rahman I, Morrison D, Donaldson K, MacNee W. Systemic oxidative stress in asthma, COPD, and smokers. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;154:1055-1060.
73. Rahman I, MacNee W. Role of oxidants/antioxidants in smoking-induced airways diseases. *Free Rad Biol Med* 1996;21:669-681.

74. MacNee W, Rahman I. Is oxidative stress central to the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease? *TRENDS in Molecular Medicine* 2001, Vol.7 No.2.
75. MacNee W. Oxidative stress and lung inflammation in airways disease. *Eur J Pharmacol* 2001;429:195-207.
76. Schaberg T, Haller H, Rau M, Kaiser D, Fassbender M, Lode H. Superoxide anion release induced by platelet-activating factor is increased in human alveolar macrophages from smokers. *Eur Resp J* 1992;5:387-393.
77. Laurent P, Janoff A, Kagan HM. Cigarette smoke blocks cross-linking of elastin in vitro. *Am Rev Respir Dis* 1983;127:189-192.
78. Tuder RM, Petrache I, Elias JA, Voelkel NF, Henson PM. Apoptosis and emphysema: the missing link. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003;28:551-554.
79. Kasahara Y, Tuder RM, Cool CD, Lynch DA, Flores SC, Voelkel NF. Endothelial cell death and decreased expression of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor 2 in emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163:737-744.
80. Kasahara Y, Tuder RM, Taraseviciene-Stewart L, Le cras TD, Abman SH, Hirth P, Ealtenberger J, Voelkel NF. Inhibition of vascular endothelial growth factor receptor causes lung cell apoptosis and emphysema. *J Clin Invest* 2000;106:1311-1319.
81. Calabrese F, Giacometti C, Beghè B, Rea F, Loy M, Zuin R, Marulli G, Baraldo S, Saetta M and Valente M. Marked alveolar apoptosis/proliferation imbalance in end-stage emphysema. *Respiratory Research* 2005;6:14.
82. Pryor WA, Stone K. Oxidants in cigarette smoke. Radicals hydrogen peroxide, peroxyxynitrate and peroxyxynitrite. *ANN N Y Acad Sci* 1993;686:12-27.
83. Elliott WM, Hayashi S, Hogg JC. Immunodetection of adenoviral E1A proteins in human lung-tissue. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1995;12:642-648.
84. Gilmour PS, Rahman I, Hayashi S, Hogg JC, Donaldson K, MacNee W. Adenoviral E1a primes alveolar epithelial cell to PM10-induced transcription of interleukin-8. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001;281:L598-L606.
85. Higashimoto Y, Elliott WM, Behzad AR, Sedgwich EG, Takei T, Hogg JC, Hayashi S. Inflammatory mediator mRNA expression by adenovirus E1a-transfected bronchial epithelial cells. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;166:200-207.
86. Szulakowski P, Drost E, Jimenez LS, Wickended JA, Crowther AJ, Donaldson K, MacNee W. Role of histone acetylation in transcription regulation and promotion of inflammatory process in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;169:A275.
87. Ito K, Ito M, Elliot WM, et al. Decreased histone deacetylase in chronic obstructive pulmonary disease. *N Eng Med* 2005;352:1967-1976.
88. Agustí A, MacNee W, Donaldson K, Cosío M. Hypothesis: does COPD have an autoimmune component? *Thorax*. 2003;58:832-4.

89. Lee SH, Goswami S, Grudo A, Song LZ, Bandi V, Goodnight-White S, Green L, Hacken-Bitar J, Huh J, Bakaeen F, Coxson H, Cogswell S, Storness-Bliss C, Corry DB & Kheradmand F. Antielastin autoimmunity in tobacco smoking-induced emphysema. *Nat Med* 2007;13:567-569.
90. Feghali-Bostwick CA, Gadgil AS, Otterbein LE, Pilewski JM, Stoner MW, Csizmadia E, Zhang Y, Sciruba FC, Duncan SR. Autoantibodies in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;177:156-63.
91. Cosio MG, Saetta M, Agusti A. Immunologic aspects of chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med*. 2009 Jun 4;360(23):2445-54.
92. Matzinger P. The danger model: a renewed sense of self. *Science* 2002; 296: 301-5.
93. Barcelò B, Pons J, Ferrer JM, Sauleda J, Fuster A, Agustí AG. Phenotypic characterisation of T-lymphocytes in COPD: abnormal CD4+CD25+ regulatory T-lymphocytes response to tobacco smoking. *Eur Respir J* 2008;31:555-62.
94. Pons J, Sauleda J, Ferrer JM, et al. Blunted gamma delta T-lymphocyte response in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2005;25:441-6.
95. Dahl CA, Schall RP, He HL, Cairns JS. Identification of a novel gene expressed in activated natural killer cells and T cells. *J Immunol* 1992;148:597-603.
96. Liu K, Li Y, Prabhu V, et al. Augmentation in expression of activation-induced genes differentiates memory from naïve CD4+ T cells and is a molecular mechanism for enhanced cellular response of memory CD4+ T cells. *J Immunol* 2001;166:7335.
97. Carter KL, Cahir-McFarland E, Kieff E. Epstein-Barr virus-induced changes in B-lymphocyte gene expression. *J Virol* 2002;76:10427-36.
98. Brown J, Matutes E, Singleton A, et al. Lymphopain, a cytotoxic T and natural killer cell-associated cysteine proteinase. *Leukemia* 1998;12:1771-81.
99. Park GH, Choe J, Choo HJ, Park YG, Sohn J, Kim MK. Genome-wide expression profiling of 8-chloroadenosine and 8-chloro-cAMP-treated human neuroblastoma cells using radioactive human cDNA microarray. *Exp Mol Med* 2002;34:184-93.
100. Kim SH, Han SY, Azam T, Yoon DY, Dinarello CA. Interleukin-32: a cytokine and inducer of TNF $\alpha$ . *Immunity* 2005;22:131-142.
101. Dinarello CA, Kim SH. IL-32, a novel cytokine with a possible role in disease. *Ann Rheum Dis* 2006;65(Suppl.3):iii61-4.
102. Beutler B, Jiang Z, Georgel G, Krozat K, Croker B, et al. Genetic analysis of host resistance: Toll-like receptor signalling and immunity at large. *Annu Rev Immunol* 2006;24:353-389.
103. Inohara C, McDonald C, Nunez G. NOD-LRR proteins: Role in host-microbial interactions and inflammatory disease. *Annu Rev Biochem* 2005;74:355-383.
104. Netea MG, Azam T, Ferwerda G, Girardin SE, Walsh M, Park JS, Abraham E, Kim JM, Yoon DY, Dinarello CA, Kim SH. IL-32 synergizes with nucleotide oligomerization domain

- (NOD) 1 and NOD2 ligands for IL-1beta and IL-6 production through a caspase 1-dependent mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102(45):16309-14.
105. Ferwerda G, Girardin SE, Kulberg B, le Bourhis L, de Jong DJ, et al. NOD2 and Toll-like receptors are non-redundant recognition systems of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Path* 2005;1:279-285.DOI:10.1371/journal.ppat.0010034.
  106. Shioya M, Nishida A, Yagi Y, Ogawa A, Tsujikawa T, Kim-Mitsuyama S, Takayanagi A, Shimizu N, Fujiyama Y, Andoh A. Epithelial overexpression of interleukin-32alpha in inflammatory bowel disease. *Clin Exp Immunol* 2007;149:480-6.
  107. Netea MG, Azam T, Lewis EC, Joosten LAB, Wang M, Langenberg D, Meng X, Chan ED, Yoon DY, Ottenhoff T, Kim SH, Dinarello CA. *Mycobacterium tuberculosis* induces Interleukin-32 production through a Caspase-1/IL-18/Interferon-gamma-dependent mechanism. *PLoS Medicine* 2006;3(8):e277.
  108. Novick D, Rubinstein M, Azam T, Rabinkov A, Dinarello CA, Kim SH. Proteinase 3 is an IL-32 binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103(9):3316-21.
  109. Conti P, Youinou P, Theoharides TC. Modulation of autoimmunity by the latest interleukins (with special emphasis on IL-32). *Autoimmunity Reviews* 2007;6:131-137.
  110. Joosten LA, Netea MG, Kim SH, Yoon DY, Oppers-Walgreen B, Radstake TR, Barrera P, van de Loo FA, Dinarello CA, van den Berg WB. IL-32, a proinflammatory cytokine in rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103(9):3298-303.
  111. Cagnard N, Letourneur F, Essabani A, Devauchelle V, Mistou S, Rapinat A, Decraene C, Fournier C, Chiochia G. Interleukin-32, CCL2, PF4F1 and GFD10 are the only cytokine/chemokine genes differentially expressed by in vitro cultured rheumatoid and osteoarthritis fibroblastlike synoviocytes. *Eur Cytokine Netw* 2005;16(4):289-92.
  112. Victor Kim, Thomas J. Rogers, and Gerard J.Ciner. *New Concepts in the Pathobiology of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*. *Proc Am Thorac Soc*. Vol 5. 2008 pp 478-485.
  113. Curfs JHAJ, Meis JFGM, and Hoogkamp-Korstanje JAA. *A Primer on Cytokines: Sources, Receptors, Effects, and Inducers*. *Clinical Microbiology Review*, Oct. 1997, pp. 742-780.
  114. Mehemet Küçükaycan, Michiel Van GKrugten, Herman-Jan Pennings, Tom WJ Huizinga, Wim A Buurman, Mieke A Dentener, and Emiel FM Wouters. Tumor Necrosis Factor-alpha +489G/A gene polymorphism is associated with chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Res*. 2002;3(1):29.
  115. Cotes JE, *Lung function: assessment and application in medicine*, 4<sup>th</sup> ed. Blackwell scientific Publication, Oxford 1979.
  116. Pizzichini E, Pizzichini MMM, Leigh R, Djukanovic R, Sterkz P.J. Safety of sputum induction. *Eur Respir J* 2002;20:Suppl.37,9s-18s.
  117. Efthimiadis A, Spanevello A, Hamid Q, Kellyz MM, Linden M, Louis R, Pizzichini MMM, Pizzichini E, Ronchi C, Van Overveld F, Djukanovic R. Methods of sputum processing for

- cell counts, immunocytochemistry and in situ hybridization. *Eur Respir J* 2002;20:Suppl.37,19s–23s
118. Niewoehner DE, Klienerman J, Rice D. Pathologic changes in the peripheral airways of young cigarette smokers. *N Engl J Med* 1974;291:755-758 .
  119. Cosio MG, Hale KA, Niewoehner DE. Morphologic and morph metric effects of prolonged cigarette smoking on the small airways. *Am Rev Respir Dis* 1980;122:265-21.
  120. Di Stefano A, Caramori G, Oates T, Capelli A, Lusuardi M, Gnemmi I, Ioli F, Chung KF, Donner CF, Barnes PJ, Adcock IM. Increased expression of nuclear factor-kappa B in bronchial biopsies from smokers and patients with COPD. *Eur Respir J* 2002;20:556-63.
  121. Atamas SP. Alternative splice variants of cytokines: making a list. *Life Sci* 1997;61:1105–1112.
  122. Fletcher HA, Owiafe P, Jeffries D, Hill P, Rook GA, Zumla A, Doherty TM, Brookes RH; Vacsel Study Group. Increased expression of mRNA encoding interleukin (IL)-4 and its splice variant IL-4delta2 in cells from contacts of *Mycobacterium tuberculosis*, in the absence of in vitro stimulation. *Immunology* 2004;112:669–673.
  123. Majo J, Ghezzi H, Cosio MG. Lymphocyte population and apoptosis in the lungs of smokers and their relation to emphysema. *Eur Respir J* 2001;17:946-953.
  124. Turato G, Zuin R, Miniati M, Baraldo S, Rea F, Beghé B, Monti S, Formichi B, Boschetto P, Harari S, Papi A, Maestrelli P, Fabbri LM, Saetta M. Airway inflammation in severe chronic obstructive pulmonary disease: relationship with lung function and radiologic emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;166:105-10.
  125. Vignola AM, Rennar SI, Hargreave FE, Fah JV, Bonsignore MR, Djukanovic´ R, et al. Standardised methodology of sputum induction and processing. Future directions. *Eur Respir J Suppl* 2002 Sep;37:51se5s.
  126. Comandini A, Rogliani P, Nunziata A, Cazzola M, Curradi G, Saltini C. Biomarkers of lung damage associated with tobacco smoke in induced sputum. *Respir Med*. 2009 Nov;103(11):1592-613. Epub 2009 Jul 15.